



HAL
open science

Développement d'un modèle prédictif du dépôt d'aérosol chez le macaque et moyens d'administrations associés

Justina Creppy

► To cite this version:

Justina Creppy. Développement d'un modèle prédictif du dépôt d'aérosol chez le macaque et moyens d'administrations associés. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UP-ASQ030 . tel-04725066

HAL Id: tel-04725066

<https://theses.hal.science/tel-04725066v1>

Submitted on 8 Oct 2024

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.

Développement d'un modèle prédictif du dépôt d'aérosols chez le macaque et moyens d'administration associés

*Development of a predictif model of aerosol deposition in macaques
and associated means of administration*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 IFTA Innovation Thérapeutique du Fondamental à
l'Appliqué
Spécialité de doctorat : Immunologie/Biothérapie
Graduate School : Health and Drug Sciences. Référent : Faculté de Pharmacie

Thèse préparée dans les unités de recherche **IDMIT-ImVA-HB & CEPR**,
sous la direction de **Frédéric DUCANCEL**, HDR, Adjoint au Chef de
Département, IDMIT (Infectious Diseases Models for Innovative Therapies),
CEA U1184 Fontenay-aux-Roses, la co-direction de **Laurent VECCELLIO**, HDR,
Ingénieur de recherche, CEPR Inserm U1100 Faculté de Médecine,
Université de Tours

Thèse soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 29 juin 2023, par

Justina CREPPY

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Elias FATTAL Pr, Pharma-D PhD, Université Paris- Saclay	Président
Florence ADER Pr, PU-PH, Université Lyon 1	Rapporteur & Examinatrice
Jean-Christophe DUBUS Pr, PU-PH, Université Aix-Marseille	Rapporteur & Examineur
Branka HORVAT PhD, Directrice de recherche, CIRI Lyon	Examinatrice
Jean-Nicolas TOURNIER Pr agrégé, IRBA Brétigny-sur-Orge	Examineur
Sandrine MARCHAND Pr, Pharma-D PhD, Université de Poitiers	Examinatrice

Titre : Développement d'un modèle prédictif du dépôt d'aérosols chez le macaque et moyens d'administration associés

Mots clés : Nebuliseurs, Aérosols, Modèle alternatif, Macaque, Spores bactériennes, Anticorps thérapeutique inhalé

Résumé : Les aérosols sont des particules présentes dans l'air et qui pénètrent dans les voies respiratoires.

Ces particules peuvent être toxiques ou thérapeutiques. Afin de comprendre leurs effets chez l'Homme, des études précliniques utilisant des modèles animaux comme le Primate Non Humain (PNH), sont essentielles et règlementairement exigées pour les produits administrés par voie respiratoire chez l'Homme. Ces études permettent de prédire le dépôt et l'effet des aérosols dans les voies respiratoires supérieures et inférieures. La voie inhalée étant la porte d'entrée naturelle des pathogènes elle peut être facilement utilisée pour des attaques bioterroristes. Le PNH a été identifié comme un modèle animal pertinent pour les études d'inhalation, compte tenu de sa proximité anatomique et physiologique avec l'Homme. Nous avons étudié les dépôts des aérosols dans ce modèle afin de proposer des outils d'administration appropriés pour des particules pathogènes toxiques ou thérapeutiques. Tout en utilisant le PNH comme modèle préclinique nous avons tenu à respecter la règle des 3 R (Remplacer, Réduire et Raffiner) dans notre étude dont l'objectif principal était de développer un modèle anatomique *in vitro* "3D Cast" des voies respiratoires hautes et basses pour prédire le dépôt d'aérosols radiomarquées chez le macaque.

Pour cela, des impressions en 3D de modèles anatomiques des voies aériennes ont été réalisées à partir de scanners de macaques

adultes *cynomolgus* et ont été couplées à des systèmes simulant la ventilation pulmonaire. Une comparaison entre le dépôt des aérosols radiomarqués dans les modèles anatomiques et le dépôt chez l'animal a été réalisée au moyen d'une méthode par imagerie scintigraphique. Celle-ci a confirmé la pertinence des modèles *in vitro* pour prédire le dépôt *in vivo*. Sur la base de ce modèle anatomique, nous avons ensuite développé trois prototypes de systèmes d'administration d'aérosol pour le PNH. Il s'agissait de concevoir et de tester un dispositif d'administration par inhalation d'aérosols thérapeutiques (anticorps thérapeutiques) et/ou toxiques (spores) permettant de maîtriser le dépôt d'aérosols dans les voies respiratoires, dans des conditions de sécurité biologique de niveau 3 (BSL 3). La quantification du dépôt des aérosols a été réalisée par imagerie gamma caméra et par TEP/TDM chez le macaque sans contamination extérieure, validant ainsi le fonctionnement du prototype innovant. Des essais ont été réalisés avec des spores de *Bacillus atrophaeus* et des anticorps thérapeutiques contre SARS-CoV-2 démontrant la capacité du système nébuliseur prototype à administrer ces aérosols biologiques en quantité suffisante dans les voies respiratoires du macaque.

Title : Development of a predictive model of aerosol deposition in the macaque and associated means of delivery

Keywords : Nebulizers, aerosols, alternative model, macaque, bacterial spores, inhaled therapeutic antibody

Abstract: Aerosols are particles in the air that enter the respiratory tract.

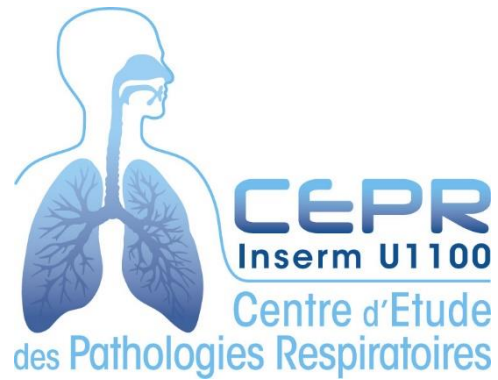
These particles can be toxic or therapeutic. In order to understand their effects on humans, preclinical studies using animal models such as the Non-Human Primate (NHP) are essential. They are required by regulation for products administered by the respiratory route in humans.

These studies are used to predict the deposition and effect of aerosols in the upper and lower respiratory tract. The inhalation route is the natural entry point for pathogens and can be easily used for bioterrorist attacks. Given its anatomical and physiological proximity to humans, the NHP has been identified as a relevant animal model for inhalation studies.

We have studied aerosol deposition in this model to propose appropriate delivery tools for toxic or therapeutic pathogenic particles. While using the NHP as a preclinical model, we were keen to respect the 3Rs rule (Replace, Reduce, and Refine) in our study, the main objective of which was to develop an *in vitro* "3D Cast" anatomical model of the upper and lower airways to predict the deposition of radiolabelled aerosols in the macaque.

For this purpose, 3D cast anatomical models of the airways were made from scans of adult *cynomolgus* macaques and coupled to a system simulating lung ventilation. A scintigraphic imaging method performed a comparison between the deposition of radiolabelled aerosols in the anatomical models and the deposition in animals.

This confirmed the suitability of *in vitro* models for predicting *in vivo* deposition. Based on this anatomical model, we then developed three prototype aerosol delivery systems for the NHP. The aim was to design and test an inhalation delivery device for therapeutic aerosols (therapeutic antibodies) and/or toxic aerosols (spores) to control aerosol deposition in the respiratory tract under BSL 3 conditions. Quantifying aerosol deposition was done by gamma camera imaging and PET/CT in the macaque without external contamination, thus validating the operation of the innovative prototype. Tests were performed with *Bacillus atrophaeus* spores and therapeutic antibodies against SARS-CoV-2, demonstrating the ability of the prototype nebulizer system to deliver these biological aerosols in sufficient quantity to the macaque airways.



Je dédie ce travail à ma tante, le Dr Sophie Creppy et à mon oncle le Dr Dominique D'Almeida, arrachés à mon affection au cours de ces trois années de thèse.

Je le dédie également avec tout mon amour à mes parents, Marie-Yvonne et Philippe qui m'ont donné la vie, la notion d'espérance et de résilience pour avancer malgré les vicissitudes de la vie.

Remerciements

Le travail multidisciplinaire réalisé au cours de ce projet de thèse de 3 ans et demi n'aurait pas pu avoir lieu sans la collaboration du CEPR de Tours, du CEA IDMIT, de l'IRBA, et de la DGA.

Je remercie la DGA et le CEA d'avoir financé ce projet de thèse pendant 3 ans. Egalement, je remercie mes directeurs de thèse d'avoir fait leur maximum pour la prolongation de la thèse (6 mois) par le CEA et l'Université de Tours.

J'adresse d'abord mes remerciements aux responsables des deux institutions de recherche en les personnes du Dr Roger Le Grand, chef du département IDMIT et Dr Nathalie Heuze-Vourc'h directrice adjointe du CEPR :

Dr Le Grand, vous m'avez accueillie lorsque j'ai poussé la porte de votre institut pour la première fois à la recherche d'une thèse de PhD. Je vous remercie pour ce premier accueil chaleureux qui m'a mise sur le chemin conduisant à cette thèse.

Nous avons eu peu d'interactions directes sur l'évolution de ce travail, mais je sais que dans l'ombre vous avez avalisé et favorisé l'installation progressive de la technique d'aérosolisation au CEA. Je vous en remercie.

Dr Heuze-Vourc'h, merci pour votre accueil et celui de votre équipe à Tours. Merci de m'avoir intégrée dans votre équipe avec beaucoup de bienveillance.

À mes directeurs de thèse, il me faudrait probablement une rame de papier A 4 pour échanger sur ces 3 ans et demi de thèse, mais l'heure est à la synthèse. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette recherche.

Vous m'avez tous les deux encadrée chacun dans son domaine de spécialité. Encore merci.

Chaque thèse a son histoire. La mienne a été parsemée d'embûches avec quelques moments où nous avons recueilli les fruits de notre labeur commun, sous la forme de la reconnaissance par la communauté scientifique et technique. Je retiens qu'elle nous a conduits à deux brevets, un article publié, un autre en cours de soumission et un prix sur la règle des 3R. Je vous en remercie.

Recevez individuellement l'expression de ma profonde et éternelle gratitude :

Dr Frédéric DUCANCEL, je vous remercie pour nos interactions. Merci pour vos différents conseils pour améliorer mon travail. Merci d'avoir eu la lourde tâche de vous occuper, en plus, des aspects administratifs complexes et chronophages sur un sujet sensible et d'intérêt pour tous. Je vous remercie du fond du cœur pour ce que j'ai appris à vos côtés.

Dr Laurent VECCELLIO, j'ai demandé un jour à une de vos anciennes collaboratrices quelle formation elle avait réalisé pour travailler plus de dix ans dans le domaine des aérosols. Elle m'a répondu : « Je suis allée à l'école du Dr. Laurent Vecellio ». Cette citation résume Justina avant la thèse, et Justina après la thèse avec un bagage

scientifique non négligeable. En dépit des difficultés qui ont été les miennes, je vous remercie de m'avoir transmis une infime partie de tout votre savoir sur le monde des aérosols, avec une vision optimiste, holistique, novatrice, sans idée préconçue. Vous m'avez poussée dans les congrès auxquels j'ai pu participer avec beaucoup de bonheur, car j'ai pu y rencontrer d'importants chercheurs. A chaque congrès vous étiez à mes côtés avant, pour la préparation, pendant, pour les questions et après pour faire le point. Vous m'avez formée et guidée tout le long de cette thèse toujours avec votre esprit novateur et optimiste. J'ai failli tout arrêter, mais vous m'avez incitée à persévérer. A vous une reconnaissance particulière. Merci de tout mon cœur.

Mes remerciements vont tout particulièrement aux membres du jury que mes maîtres ont choisis avec bonheur.

Au président du jury, Pr. Elias Fattal, je vous remercie de nous faire l'honneur de présider cette thèse.

Aux rapporteurs, Mr le Dr Jean-Christophe Dubus, et Mme le Pr Florence Ader, je vous remercie pour la lourde tâche que vous avez acceptée de prendre en relisant et commentant ce travail long et complexe. Humblement, je reconnais que vos remarques avisées et votre relecture ont contribué à l'amélioration de ce manuscrit. Je vous en suis reconnaissante.

Aux examinateurs,

Mr le Dr Jean-Nicolas Tournier, je vous remercie spécialement pour votre implication dans ce projet de thèse. Vous avez largement contribué à l'avancée de ce travail de thèse en étant présent aux 5 réunions d'évolution de la thèse, en y apportant vos commentaires pertinents pour la bonne avancée du travail. Surtout, vous avez favorisé la collaboration entre l'IRBA et le CEA. J'ai particulièrement été touchée par votre sympathie, votre ouverture d'esprit, vos encouragements permanents et votre humilité qui n'a d'égal que vos connaissances. Merci entre autres pour toute votre expertise sur la partie bactériologie de cette thèse.

Mme le Dr Branka Horvat, je vous remercie d'accepter d'examiner cette thèse. Elle a été le fruit de votre étroite collaboration de par votre expertise sur les Primates Non Humains et l'infectiologie de façon générale. Merci pour le temps considérable que vous m'avez consacré pour améliorer la revue de la littérature. Vos remarques m'ont été d'une grande aide. Vous m'avez également fait l'honneur de suivre l'évolution de ce travail de thèse et de l'améliorer par vos commentaires. Je vous en remercie.

À Mme le Pr Sandrine Marchand, je vous remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail en y apportant vos critiques constructives.

À mon référent DGA, Mr le Dr Didier Hilaire. Je vous remercie d'avoir été mon tuteur et mon interlocuteur pour la DGA tout au long de ce projet. Merci pour nos échanges riches et votre disponibilité. Merci d'avoir toujours contribué à la valorisation et l'amélioration de ce travail.

Je ne peux oublier de remercier Mme le Dr Emmanuelle Guillot-Combe de l'Agence Innovation Défense, certes absente le jour de la soutenance mais qui a toujours suivi et accompagné le projet avec son engouement et sa bienveillance.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement aux collaborateurs respectifs de ce projet qui m'ont permis d'avoir une vision scientifique que je qualifierais d'holistique en y abordant un large panel de domaines (physique, imagerie, modèles alternatifs, expérimentation animale, nanoparticules, gestion de projet, biologie, santé, etc.) Sans vous, je n'en serais pas là.

À Tours,

Je remercie chaleureusement chaque membre du laboratoire du CEPR et la PST-A avec qui j'ai eu de riches interactions scientifiques et humaines. Merci de m'avoir nourrie scientifiquement et humainement. Vous avez toujours été présents pour répondre à mes nombreuses questions et pour me former dans le vaste monde des aérosols et de l'expérimentation animale. Vous formez un noyau soudé, fédérateur, d'une grande gentillesse et d'une disponibilité de chaque instant. Ce noyau a rayonné autour de moi durant l'année passée à Tours pour me permettre d'être dans de bonnes dispositions pour réaliser mon travail.

Un GRAND merci spécial à ma collaboratrice qui est devenue aujourd'hui une amie, Mme Maria Cabrera. Tu m'as formée de fond en comble, tu m'as épaulée, tu m'as encouragée tout le long de ce parcours. Toujours avec ton sourire, ton honnêteté, ta bonne humeur et ton efficacité. Infiniment merci. Tu es pour moi une personne précieuse qui a été incontournable pour mener à bien ce projet.

Au CEA -IDMIT de Fontenay - aux Roses,

Je remercie toutes les plateformes qui ont participé, suivi, et contribué à ce projet. Un merci spécial à la plateforme ASW (Animal Science and Welfare), HSS (Hygiène et Sécurité), L2I, L3I, LIBI (en particulier Brice), les directeurs d'études (Cécile et Hélène), et le service administratif, qui m'ont permis de lever les obstacles et de rendre possible la réalisation des premières expériences de nébulisation au CEA.

Merci à vous tous qui m'avez aidé pour la réalisation des expériences.

Un merci spécial à M. Benoit Delache, un collaborateur indispensable dans ce projet de thèse, Delache, le « cerveau » de la science des aérosols à IDMIT. Je pense que tu sais déjà bien ce que tu as représenté dans ce travail et l'infinie gratitude que j'ai pour toi. Sans toi, je n'aurais pas pu réaliser et avancer sur beaucoup d'expériences de ce projet. Tu m'as communiqué ton sens de la pédagogie et la passion qui t'anime quotidiennement pour la science dans le modèle du Primate Non Humain, et surtout ton sens de la transmission qui est primordial. Merci d'être aujourd'hui un ami. Merci pour ton sens de l'humour contagieux.

Je remercie également Asma B. et Quentin S. pour leur aide dans la réalisation des expériences de cette étude.

Un merci spécial au Dr Julien Lemaitre : Julien, ton savoir, ta sympathie et ton côté altruiste sont fortement appréciables. Merci pour ton aide tout au long de cette thèse et pour toute ta contribution à mes deux articles de thèse, surtout pour ton expertise du macaque dans la revue de la littérature.

Dr Thibaut Naninck, j'ai appris qu'avec toi il fallait entreprendre, être efficace, et factuel. Tu es quelqu'un de très aidant et disponible. Je te remercie pour toute ton expertise en imagerie clinique.

Je remercie toutes les personnes d'DIMIT, en particulier mes pairs les doctorants, avec qui j'ai pu échanger durant ce projet de thèse. Nous avons la chance d'être dans un institut scientifique de renom avec un brassage multiculturel et multidisciplinaire, au plan national et international. Celui-ci m'a apporté un bagage et un réseau important pour ma vie future. Merci d'avoir contribué de près ou de loin à ce projet.

A Brétigny-sur-Orge,

Je remercie l'équipe des Drs Olivier Gorge et Jean-Nicolas Tournier d'avoir autorisé la réalisation des expérimentations au sein de votre laboratoire. Merci de votre aide précieuse pour la partie bactériologique de la thèse. Vous avez fait preuve d'engouement pour le projet et sa bonne réalisation. Un merci spécial à Mme Noémie Verguet pour toute son aide précieuse sur la réalisation des expériences de sporulation et d'aérosolisation des spores. Noémie, tu es une personne d'une gentillesse et d'une efficacité fortement appréciables. Tu as toujours été disponible pour répondre à mes nombreuses questions, en m'expliquant et même en me réexpliquant. Reçois ici l'expression de toute ma reconnaissance et de ma sympathie.

A Lyon,

Je remercie l'équipe du Dr Bernard Verrier de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines. Merci pour votre expertise sur les nanoparticules et votre ouverture à collaborer. Je remercie en particulier le Dr Sophie Richard pour son aide précieuse. Nos interactions ont été enrichissantes et formatrices. Je te remercie pour ton accueil chaleureux dans votre laboratoire.

A Paris,

Je remercie la DGA pour le suivi régulier de tous les doctorants dont j'ai fait partie.

Aux doctorants, post-doctorants, chercheurs, ma famille et mes amis, à mes conseillers, à toutes les oreilles attentives que j'ai croisées durant ces 3 ans et demi je vous suis profondément reconnaissante. Je vous dis merci.

A Tours,

Je remercie ma famille Tourangelle qui m'a chaleureusement hébergée durant l'année passée à Tours. Merci infiniment pour tout votre dévouement pour mon bien-être moral et physique durant ce long parcours du combattant. Un spécial merci à ma tata Gigi et à ma tendre amie Marie C.

A Fontenay-aux Roses,

A toutes les personnes avec qui j'ai souvent échangé au CEA d'IDMIT je vous remercie pour nos interactions et votre bienveillance. Merci en particulier à Gaëlle D., Nadia, Natalia, Candie, Laetitia B., Marco, Mario, Oscar, Rosier, Christelle, Martine, et aux Drs Menu et Zamborlini.

Je ne peux pas remercier spécialement ma tendre et chère amie, Sylvie Keser. Merci pour toutes nos discussions, ton soutien, ton écoute, tes encouragements chaleureux. Ta coordination méticuleuse pour l'envoi et la réception des colis, a été importante pour projet. Je t'en suis reconnaissante.

A mes pairs les doctorants : je vous dis merci pour l'entraide que vous créez dans ce cocon difficile de thésards. Vous avez toujours fait preuve d'écoute. Vos sourires et nos partages m'ont beaucoup aidée malgré ma thèse réalisée en alternance sur deux sites de recherche dans deux villes différentes.

Je remercie particulièrement les membres de mon bureau (thésards et master 2) pour toute leur aide et l'atmosphère saine propice au travail, à l'entraide et à l'épanouissement.

Un spécial merci aux doctorants avec qui j'ai nourri de l'amitié : Andréa, Mohit, Gaëlle, Camille F, Krishna, Stanley et Sonia.

Un GRAND MERCI à mes 05 partenaires avec qui j'ai nourri de la complicité. Merci pour le soutien incommensurable dont j'ai bénéficié. Une gratitude infinie à :

Noémie, « nono » comme j'aime à t'appeler. Nous avons poussé la porte d'IDMIT ensemble pour initier notre thèse le 04 novembre 2019. Merci pour ce parcours débuté ensemble. Tu es une personne discrète, empathique, aidante, douce. Merci pour tout.

A mon TRIO support, mes amies : Alex aux carrés, (Alexandra et Alexa) et Elodie,

D'avoir croisé vos chemins à mon retour de Tours en particulier, a été une grâce et une chance pour moi. Je dirais qu'au début j'ai été une huitre qui s'est progressivement ouverte.

Le mot merci est faible pour exprimer le respect, l'amour, la sympathie, la reconnaissance que j'ai pour vous.

Vos conseils, votre soutien moral, votre aide scientifique, et tant d'autres m'ont énormément aidée. Dans les moments difficiles, vous avez témoigné de votre omniprésence. Au-delà de cela, j'ai énormément appris pour ma vie personnelle de femme qui tente au mieux d'être écoresponsable, engagée, ouverte à l'autre, déterminée, toujours avec bienveillance et humilité face aux challenges du monde actuel et futur.

Grâce à vous, je n'oublierai plus d'être FACTUELLE. Car, de vous, j'ai retenu ce conseil : « Sois factuelle Justina ». Nos moments passés ensemble ont été tout simplement formidables. Je ne sais quoi vous dire d'autre si ce n'est vous redire merci.

Nous entamons, je l'espère une longue et durable amitié pour partager nos peines et nos joies de vie. Je vous souhaite le meilleur dans vos vies professionnelles et personnelles.

A Florian, tu m'as apportée beaucoup sur tous les domaines, culturel, professionnel et scientifique. Échanger avec toi est un véritable régal, tant tes connaissances sont riches et multidimensionnelles. Tu es quelqu'un de discret, de dévoué et empathique. MERCI !

A ma famille et mes amis, mes soutiens, d'Ile de France, Tours, Bordeaux, d'Afrique et d'ailleurs,

Je remercie mon encadrante de Master 2 à l'IRSN, le Dr Tény Ebrahimian. Merci d'avoir cru en moi. Merci pour ton soutien, ta compréhension et ta gentillesse.

Je remercie les Drs A. Fromont et M. Duhamel pour leur bienveillance et leur soins moraux et physiques durant ces 3 ans et demi marqués par la pandémie du SARS-CoV-2. Vous êtes des thérapeutes rares de nos jours. Je vous remercie pour tout.

Merci à Sophie M. et Corine LC, pour toutes nos interactions et vos conseils propices à développer un mental résilient et d'espérance durant ce parcours.

Je remercie ma chère Anne Migan pour sa présence, son soutien et son écoute depuis la classe de 3^{ème}.

Pr Ongeri, je vous remercie pour votre dévouement, votre écoute et vos précieux conseils avec objectivité et empathie.

Pour tout ceux que j'aurais oubliés ici, soyez assurés qu'il s'agit du stress de la fin mais j'ai pour vous une gratitude profonde.

Je remercie mes conseillers et amis toujours à l'écoute. Vous aviez été une source inépuisable de soutien de diverses sortes et d'espérance en moi pour cette expérience. Je remercie en particulier mes amis : Rupestre Z, Hugues M., Ghislain A., Victor E., Mukit I, Alex et Livia G., Titi G., Saci I., Alexia D., Christelle T., Lulu D., Georgine A., Emilie P., Carine E., Ayélé A., Lionnel M., Inès EH., Noah C., Djamilah D., Marie-José G., Marie S., Richina A., Uwayo D., Johan A., Christelle E., Sara M., Sabrina A., et Stéphanie F., Dimitri K. et à mon « trio de PACES » (Cécile M. Florence B. et Pauline L.). Vous comptez beaucoup pour moi.

Un merci particulier à Mampianina et à Mr W Chouaib pour leur aide plus que précieuse.

Je remercie particulièrement les membres de l'AFPC qui m'ont beaucoup apporté en particulier le Dr Tessier, père Antoine, et ma propriétaire, le Dr Alix C. pour son hospitalité, sa disponibilité et son logement. Merci pour votre présence dans ma vie et votre regard constamment optimiste sur la vie au quotidien.

À mes grandes sœurs de cœurs, qui ne cessent de témoigner leur amour dans ma vie et leurs encouragements indéfectibles : Houda, Barbara, Fadia et Jamila.

Au Dr Allochèmè O., soyez remercié pour votre omniprésence dans ma vie et votre mental olympique d'acier qui me poussent toujours plus haut depuis plus de 15 ans.

À Gildas A., et à Gabriel P. Merci de toujours croire en moi et de m'avoir donné le goût pour la science malgré les difficultés.

Au Pr H. Ahissou, votre savoir et votre humilité n'ont d'égale que votre grande disponibilité et votre sens du service à autrui. Merci pour tout.

À père Mama Mia, merci pour votre présence, votre écoute, votre patience remarquable et vos pieuses pensées positives.

Je remercie tous mes oncles et mes tantes qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours encouragée de près ou de loin. Mon oncle préféré : tonton Patrick, mon parrain tonton JY, mon tonton « mentor » Maddy D, tonton Ayité, tonton Jacques et tonton Joujou ; mes tantes que j'affectionne tant : tante Arame D, Marie José S, Mayo T, Sonia D, Jackie B, Régina C, Gladys H, Agnès A et Fifi.

A mes cousins et cousines Malick, Marieme et Ulysse, merci.

Je remercie ma marraine Gaëlle qui m'a soutenue et encouragée.

A mon unique grand-mère Rita, du haut de tes 93 ans, tu m'inspires et me soutiens. A mon grand-père Justin D'Almeida et Georges Apéléte Creppy, sources intarissables de savoir, de motivation et de réussite, de là où vous êtes, je vous dis merci de veiller sur moi perpétuellement.

Je remercie ma grande sœur adorée Laetitia et son mari Bernard. Merci pour votre omniprésence et vos encouragements. Vous me soutenez malgré mes défauts. Merci d'avoir illuminé ma vie par la petite Gianna Rita.

A mon petit frère Mickael, je sais que tu es fier de moi. Je t'aime mon petit frère malgré les kilomètres qui me séparent des USA.

A Laurent, je t'adresse tous mes remerciements et sois assuré de tout mon amour à ton endroit pour la suite que la vie nous réserve. Merci pour ta présence à mes côtés, même quand je suis loin, malgré les difficultés et mon caractère qui ont pu paraître difficiles à comprendre à certains moments durant ces 3 ans.

Au Pr D P., je ne peux ne pas vous remercier du fond du cœur pour toutes nos interactions et votre soutien légendaire, bienveillant. Merci infiniment pour tout. Gratitude éternelle.

Enfin, le fruit de mon savoir scientifique est la germination du savoir et de la passion pour la recherche de mon oncle adoré le Pr EECK. Sans toi je n'aurais pas tenu. Ton savoir titanique en sciences et dans tous les sujets du monde, est un héritage considérable. Le mot merci est faible pour exprimer ma gratitude.

A mes parents, Philippe et Marie Yvonne vous m'avez inculqué la persévérance, l'amour du travail bien fait et des valeurs de gratitude et le respect profond de l'autre. Sans vous je n'existerais pas. Je ferais tout pour vous rendre fiers.

Table des matières

Table des matières	12
Liste des abréviations	15
Table des figures.....	18
Liste des tableaux.....	23
INTRODUCTION GÉNÉRALE	25
Chapitre I : Généralités et revue de la littérature	29
I.1 Généralités sur le système respiratoire de l'Homme et comparaison avec le Primate Non Humain (PNH).....	29
I.1.1 Généralités sur les voies aériennes des modèles animaux utilisés dans les études d'inhalation.....	31
I.1.2 Détails de l'anatomie fonctionnelle comparée des voies aériennes supérieures de l'Homme et du Primates Non Humain (PNH).....	35
I.1.3 Fonctionnalité des voies aériennes supérieures du PNH et de l'Homme	40
I.1.4 Détails de l'anatomie fonctionnelle et structurale des voies aériennes inférieures du PNH et de l'Homme.....	43
I.1.5 Description microscopique des voies aériennes respiratoires inférieures	55
I.1.6 Les cellules immunitaires du système respiratoire et leurs fonctions de surveillance et de défense du poumon chez l'Homme	57
I.1.7 Les paramètres ventilatoires et les mécanismes physiologiques de la respiration	58
I.1.8 Régulation de la ventilation chez l'Homme.....	60
I.1.9 Étude de l'exploration fonctionnelle respiratoire	65
I.2 Les aérosols	68
I.2.1 Histoire des aérosols : généralités.....	68
I.2.2 Définitions	71
I.2.3 Métrologie <i>in vitro</i> des aérosols.....	73
I.2.4 Métrologie <i>in vivo</i> des aérosols, chez le PNH et chez l'Homme	85
I.2.5 Génération des aérosols (Cf. Revue de la littérature pour le détail)	96
I.2.6 Les différents types de particules d'aérosols	103
I.2.7 Dépôts des aérosols <i>in vivo</i> chez les PNHs et chez l'Homme.....	108
I.3 Pharmaco ou Toxico-cinétique des particules inhalées	115
I.4 Revue de littérature, soumise dans le journal <i>Pharmaceutics</i>	119
Chapitre II: Article publié dans le journal <i>Pharmaceutical Research</i> , « Comparison of Aerosol Deposition Between a Cynomolgus Macaque and a 3D Printed Cast Model of the Animal ».....	159
Chapitre III: Mise au point de systèmes de génération d'aérosols liquides pour administration chez le Primate Non Humain	173

III.1	Objectif principal	173
III.2	Le système de référence Chad Box® pour l'administration d'aérosol de pathogènes chez le PNH	173
III.3	Développement de prototypes originaux de générateurs d'aérosols pour le PNH	177
III.3.1	Cahier des charges.....	178
III.3.2	Description et fonctionnement des prototypes développés	181
III.4	Métrologie des aérosols produits par les prototypes développés.....	195
III.4.1	Mesure de la taille des particules des solutions nébulisées avec les prototypes développés	195
III.4.2	Expérimentation <i>in vitro</i> , à l'aide du modèle 3D Cast de macaque	200
III.4.3	Mesure par imagerie scintigraphique du dépôt des aérosols chez le macaque avec les différents prototypes	205
III.4.4	Dépôts mesurés par imagerie TEP-TDM.....	213
Chapitre IV: Administration par inhalation de spores de <i>Bacillus atrophaeus</i> radiotraccées et d'anticoprs thérapeutiques chez le macaque cynomolgus.....		221
IV.1	Contexte et objectifs	221
IV.2	Introduction.....	222
IV.2.1	Bacille du charbon et risque bioterroriste.....	222
IV.2.2	<i>Bacillus anthracis</i> et la maladie du charbon.....	223
IV.2.3	<i>Bacillus atrophaeus</i>	227
IV.3	Caractérisation du dispositif d'administration d'aérosols pour des spores liquides de <i>Bacillus atrophaeus</i>	229
IV.3.1	Sporulation de <i>Bacillus atrophaeus</i>	229
IV.3.2	Mesure de la viabilité des spores nébulisées : choix du liquide de biocollection des aérosols de spores pour étudier leur agrégation et leur viabilité par le test de survie en Tween20 (0,01%)	230
IV.3.3	Résultats	231
IV.4	Protocole d'aérosolisation et de biocollection des spores de <i>Bacillus atrophaeus</i> et étude de la viabilité des spores après nébulisation.....	232
IV.4.1	Essais à blanc (sans spores)	232
IV.4.2	Nébulisation et biocollection avec les spores de <i>Bacillus atrophaeus</i> : matériels et méthodes.....	234
IV.4.3	Conclusion du protocole d'aérosolisation et de biocollection de spores de <i>Bacillus atrophaeus</i>	238
IV.5	Mesure <i>in vitro</i> de la taille des aérosols de spores de <i>Bacillus atrophaeus</i> par traçage radioactif.....	238
IV.5.1	Matériels et Méthodes.....	239
IV.5.2	Résultats	239
IV.5.3	Conclusion sur la métrologie <i>in vitro</i> d'un aérosol de spore radiotraccée au ¹⁸ F-FDG.	240

IV.6	Inhalation des spores de <i>Bacillus atrophaeus</i> radiomarquées chez le macaque.....	240
IV.6.1	Matériels et méthodes	240
IV.6.2	Mesures du dépôt pulmonaire <i>in vivo</i> chez le macaque.....	243
IV.6.3	Conclusion sur l'aérosolisation de spores bactériennes atténuées chez le macaque à l'aide du prototype Y développé	251
IV.7	Aérosolisation chez le macaque d'un anticorps anti SARS-CoV-2 à l'aide du prototype 2 (Y)	251
IV.7.1	Contexte et objectifs de l'étude	251
IV.7.2	Matériels et Méthodes de l'étude.....	252
IV.7.3	Résultats de l'étude.....	254
IV.7.4	Conclusion sur l'aérosolisation d'anticorps chez le macaque à l'aide du prototype Y développé.....	255
	DISCUSSION GÉNÉRALE DE LA THÈSE.....	257
	CONCLUSION GÉNÉRALE DE LA THÈSE.....	263
	PERSPECTIVES.....	264
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	266
	ANNEXES.....	286

Liste des abréviations

ADME Absorption – Distribution – Métabolisation – Élimination

ADP Aérosols Doseurs Pressurisés

Ag Antigène

AID Agence Innovation Défense

AMM Autorisation de Mise sur le Marché

AVA Anthrax Vaccine Adsorbed

BHI Brain Heart Infusion

BPCO Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

CDC Center for Diseases Control and Prevention

CE Capacité Expiratoire

CFU Colony-Forming Unit

CI Capacité Inspiratoire

CO₂ Dioxyde de carbone

CPT Capacité Pulmonaire Totale

CV : Capacité Vitale

CVF Capacité Vitale Forcée

CT Computer Tomography

CFU Colony Forming Unit

d_{ae} diamètre aérodynamique équivalent

DAMM Diamètre Aérodynamique Médian en Masse

DL₅₀ Dose Létale 50

DGA Direction Générale de l'Armement

DTPA DiethyleneTriaminePentaacetic Acid

EF Edema Factor

EFR Exploration Fonctionnelle Respiratoire

EMA European Medical Agency

ET Extrathoracique

FDA Food and Drug Administration

Fe Fréquence Respiratoire

FDG Fluorodésoxyglucose

GSD Geometric Standard Deviation (Déviation Standard Géométrique)

HFA HydroFluoro-Alcanes

ICPR International Commission on Radiological Protection

IT Intrathoracique

LBA Liquide Broncho Alvéolaire

LCS Liquide cérébro-spinal

LF Lethal Factor

MBq MégaBecquerel

MO Microscopie Optique

MOT Microorganismes et Toxines Hautement Pathogènes

MMAD Mass Median Aerodynamic Diameter

MDI Metered Dose Inhaler

NALT Nasal-Associated Lymphoid System Tissues

NP Nanoparticles

NHP Non-Human Primate

NRBCE Nucléaire Radiologique Biologiques Chimiques Explosifs

OPs Organophosphorés

O₂ Oxygène

Pa O₂ Pression partielle en dioxygène

Pa CO₂ Pression partielle de dioxyde de carbone

PET Positron Emission Tomography

PSM Poste de Sécurité Microbiologique

Q Débit Ventilatoire

3Rs Remplacer, Réduire et Raffiner

ROI Region of Interest

SEM Standard error on the mean

SG Schaedler Gélose

SPECT Single-Photon Emission Computed Tomography (Tomographie par émission monophotonique)

SUV Standardized Uptake Values

TDM Tomodensitométrie

TEP Tomographie par Émission de Positons

UFC Unité Formant Colonie

VA Ventilation Alvéolaire

VAI Voies Aériennes Inférieures

VAR Voies Aériennes Respiratoires

VAS Voies Aériennes Supérieures

Vc Volume courant

VEMS Volume Expiratoire Maximal par Seconde

VRE Volume de Réserve Expiratoire

VRI Volume de Réserve Inspiratoire

Table des figures

Figure 1: Détails de l'anatomie humaine des VAS ou Région extra-thoraciques (ET) (encadré en vert) et des VAI ou Région intrathoracique (IT).....	30
Figure 2 : Coupes sagittales d'anatomie comparée des VAS et VAI des espèces de mammifères (classifiées en rongeurs et non rongeurs) utilisées dans les études d'inhalation en comparaison avec l'Homme (partie gauche de la figure).....	33
Figure 3 : Points positifs et négatifs sur les différentes espèces animales utilisées dans les études d'inhalation d'aérosols.....	34
Figure 4: Coupe frontale des fosses nasales humaines. Les fosses nasales humaines se composent de différents sinus et cornets nasaux [36].....	36
Figure 5 : Anatomie comparée des fosses nasales de l'Homme (A) et du singe (B) d'après Harkema et al., 2012 [24].....	37
Figure 6 : Coupe sagittale des voies aériennes supérieures chez l'Homme, d'après l'atlas d'anatomie du Netter [41]. Les points rouge, jaune et bleu représentent respectivement, le nasopharynx, l'oropharynx et le laryngopharynx. Le triangle noir représente le cartilage cricoïde, qui est un cartilage pharyngé délimitant la fin du pharynx.....	39
Figure 7 : Représentation de la muqueuse olfactive (partie supérieure de la région nasale) et la trajectoire des différentes voies d'administration des médicaments sous formes d'aérosols par voie nasale (flèches bleues claires). Schéma d'après Kappoor et al., 2016 [48].	42
Figure 8: Représentation schématique des feuilletts pleuraux humain d'après Nassra., 2023 [56].	45
Figure 9: Schéma de la segmentation des poumons droit et gauche en différents lobes d'après l'atlas d'anatomie du Netter [41].....	46
Figure 10 : Planche anatomique provenant de la thèse de Nathalie Prot [58] illustrant le lobe pulmonaire gauche (10- A) et le lobe pulmonaire droit (10- B) du macaque cynomolgus. L'illustration a été modifiée en encadrant les différents lobes.....	47
Figure 11 : Représentation schématique de la trachée humaine et les bronches principales droite et gauche (encadrées en bleu) modifiée d'après l'atlas d'anatomie du Netter [41].	49
Figure 12: Représentation schématique de la trachée et des bronches du macaque cynomolgus d'après la thèse de Nathalie Prot [58].....	50
Figure 13 : Segmentation anatomique de l'arbre trachéo-bronchique d'après le modèle de Weibel [64]. Dans la partie supérieure de la figure, la zone de conduction est représentée et dans la partie inférieure, la zone respiratoire.....	53
Figure 14 : Représentation détaillée de l'ultrastructure d'une bronchiole terminale et d'un acinus pulmonaire humain d'après l'atlas d'anatomie du Netter [41].....	54
Figure 15 : Représentation schématique de l'histologie de la région trachéo-bronchique et de la région alvéolaire chez l'humain, après exposition à une particule inhalée.	56
Figure 16: Représentation schématique des différents muscles impliqués dans le mécanisme d'inspiration et d'expiration chez l'Homme, d'après l'atlas anatomique du Netter [41].....	59
Figure 17 : Comparaison des fréquences respiratoires (A) et des volumes courants (B) de différentes espèces de mammifères et de l'Homme, d'après Guillon et al., 2018 [85].	60
Figure 18 : Schéma du contrôle neurologique de la respiration, issu de l'article de Raux et al., 2007 [86].....	61
Figure 19 : Schéma des différents acteurs de la commande respiratoire d'après Raux et al., 2007 [86]. Vt et FR représentent le volume courant et la fréquence respiratoire.....	63
Figure 20: Représentation schématique générale de la régulation de la ventilation pulmonaire schéma modifié d'après Bensouag., 2020 [87].....	64
Figure 21 : Courbe volume-temps après une analyse des volumes respiratoires à l'aide d'un spiromètre.....	66
Figure 22 : Courbe des volumes et des capacités respiratoires chez l'Homme, d'après la thèse du Dr Montigaud [3].	68

Figure 23 : Chronologie et histoire des aérosols thérapeutiques, de l'Égypte ancienne (premières références, datant de 1555 avant JC, photo A), à 1778 : Inhalateur à vapeur d'opium John Mudge (photo B) et à 1858 : Pulvérisateur Sales-Girons (photo C). Images provenant de l'article de Stein et al., 2017 [96].	69
Figure 24 : Appareil à vapeurs d'aérosols inventé par le Pr Lister.	70
Figure 25 : Nébuliseur portable Sales Giron utilisé pour l'inhalation de gouttelettes de liquide dans des pathologies telles que l'asthme, la tuberculose ou les laryngites. Photo d'après Bisgaard et al., 2001 [101].	70
Figure 26 : Courbe de la distribution de la masse d'un aérosol [103].	72
Figure 27 : Schéma modifié d'après Pan et al., 2019 [110] (figure a et b), May et al., 1957 [114] (figure a') et Lin et al., 1997 [111] (b') présentant respectivement les biocollecteurs en milieu liquide de type Impinger AGI-30® (a) et le BioSampler SKC® (b).	75
Figure 28 : Schéma d'après Verreault et al., 2008 [117] décrivant le mécanisme de biocollection sur filtres (28-A). Le schéma 28-B est d'après Pan et al., 2019 [110]. Il illustre les différents mécanismes impliqués dans la biocollection sur filtres.	76
Figure 29 : Principe de collecte de l'échantillonneur d'air cyclonique micro Coriolis® de la société Bertin Technologies® (source Bertin Technologies France).	78
Figure 30 : Schéma de fonctionnement d'un précipitateur électrostatique d'après Pan et al., 2019 [110].	79
Figure 31 : Photo du compteur optique à particules portatif de type Microdust pro Casella®, instrument de mesure portatif pour la détection en temps réel de particules de l'air ambiant (aérosols, poussières, fumées) [127].	80
Figure 32 : Schéma modifié d'après Saaski et al., 2009 [122] décrivant le principe de fonctionnement d'un impacteur en cascade. Les particules d'aérosols sont impactées sur les plateaux ou plaques multiétages de l'impacteur.	81
Figure 33 : Descriptif d'un impacteur en cascade de nouvelle génération, (New Generation Impactor, NGI) d'après Fabian et al., 2009 [120].	82
Figure 34 : Montage expérimental d'un DLPI (utilisé lors d'une expérience de thèse). Les aérosols utilisés sont des aérosols de fluorescéine.	83
Figure 35 : Fonctionnement du ELPI d'après Moasio 1999 [135].	84
Figure 36 : Schéma issu du livre « Thérapie par voie inhalée » [132], détaillant le mode de fonctionnement d'un diffractomètre laser.	85
Figure 37 : Schéma d'après Clarck et Borgström., 2001 [134] [135] expliquant l'application de la scintigraphie par gamma caméra, utilisée chez l'Homme pour évaluer le dépôt in vivo des aérosols dans les VAS et les VAI. Le schéma est illustré pour un aérosol doseur de poudre (Aérosol Doseur de Poudre) mais il peut également s'appliquer à un nébuliseur.	88
Figure 38 : Schéma de la composition d'un radiotraceur.	89
Figure 39 : Principe de fonctionnement de la Tomographie par Émission de Positons, d'après la thèse du Dr Naninck [137].	90
Figure 40 : Exemple d'images de dépôts d'aérosols radiotracés contenant du [¹⁸ F]-FDG, la visualisation et le suivi du dépôt a été réalisé par une technique d'imagerie 3D (TEP/CT) d'après Dabisch et al., 2017 [27]. B : Imagerie scintigraphique planaire (2D) montrant les régions d'intérêts sélectionnées par l'expérimentateur après l'inhalation d'aérosols radiotracés au ^{99m} Tc dans un modèle de macaque Reynard et al., 2022 [148].	95
Figure 41 : Principe de fonctionnement d'un nébuliseur à jet d'air [158].	97
Figure 42 : Schéma d'un système d'administration d'aérosol à l'aide d'un nébuliseur ultrasonique d'après Coste et al., 2018 [153].	98
Figure 43 : Fonctionnement d'un nébuliseur à tamis d'après la thèse du Dr Laurent Vecellio [161].	99
Figure 44 : Schéma du mode de fonctionnement d'un MDI présenté par Dubus et al., 2020 [132].	102
Figure 45 : Fonctionnement et composition d'un DPI d'après Dalby et al., 2006 [169].	103
Figure 46 : Représentation d'une gouttelette de bioaérosol d'après Gollokata et al., 2021 [171].	105

Figure 47 : Représentation des différentes tailles d'aérocontaminants et les 3 mécanismes physiques de dépôts impliqués d'après Labiris et Dolovich., 2003 [11]. Les bioaérosols ont des tailles comprises entre 0,05 et 500 µm.....	106
Figure 48 : Schéma d'après Dhawan et Bismas .,2021 [173] illustrant la trajectoire des particules d'aérosols émises par une personne infectée (émetteur) durant les activités quotidiennes et leur potentielle transmission à un individu exposé.....	107
Figure 49 : Dépôts des particules d'aérosols dans le tractus respiratoire humain en fonction de la taille de l'aérosol.....	109
Figure 50 : Cycle de vie du dépôt de l'aérosol produit et administré par un dispositif d'aérosolisation , schéma d'après Dubus et al., 2020 [132].....	111
Figure 51 : Principaux mécanismes de transport des particules (représentées en rond noirs et gris) dans les voies aériennes humaines, d'après Heyder et Svartengren., 2001 [17].....	113
Figure 52 : Représentation schématique d'après Borghardt, et al., 2015 [193] de la pharmacocinétique d'un aérosol thérapeutique après inhalation.....	117
Figure 53 : Système Chad Box®, d'exposition automatisée aux aérosols pour des Primate Non Humains, modifié d'après Hartings et Roy.,2004 (Hartings and Roy 2004).	174
Figure 54 : Photo du modèle de macaque in vitro 3D Cast installé dans la Chad Box® au CEA-IDMIT pour la mise au point de l'outil d'aérosolisation. Fonctionnement en zone de confinement A3.	176
Figure 55 : Essais des masques oro-nasaux chez le macaque comme interface d'administration d'aérosols.....	182
Figure 56 : Composition de systèmes de nébulisation sélectionnés pour l'administration d'aérosols infectieux ou thérapeutique chez le macaque.....	183
Figure 57 : Photo de l'agencement des outils du prototype fonctionnant avec le nébuliseur pneumatique (prototype 1).....	185
Figure 58 : Composition et fonctionnement des différentes parties du prototype 1.	186
Figure 59 : Exemple de gamme de tailles de particules pouvant être produites avec les différentes versions du nébuliseur pneumatique de la Diffusion technique Française (Document de la Diffusion Technique Française, Saint Etienne, France).	187
Figure 60 : Fonctionnement du prototype pneumatique en phase expiratoire.....	189
Figure 61 : Schéma du fonctionnement du prototype pneumatique.....	189
Figure 62 : Courbe sinusoïdale de l'aérosol produit à concentration constante par le prototype 1. La nébulisation est arrêtée quand la dose cible est atteinte.	190
Figure 63 : Descriptif et fonctionnement du prototype à tamis Y. Le sens du flux de l'aérosol produit par le nébuliseur Aerogen® est représenté sur les figures A et B par la flèche en bleue. La flèche jaune représente le sens du flux d'air des aérosols exhalés.....	192
Figure 64 : Courbe sinusoïdale des rapports inspiration/expiration des prototypes à tamis.	193
Figure 65 : Photo et Description de l'invention prototype T.....	195
Figure 66 : Distribution des particules contenues dans 1 ml d'une suspension de Beclospin®.....	199
Figure 67 : Spores de Bacillus atrophaeus en microscopie optique (MO) (image A), particule de Beclospin® en MO (image B) à un grossissement X 100 et spores de Bacillus anthracis, souche STERNE (image C).....	199
Figure 68 : Essais de montage des prototypes sur le modèle in vitro 3D Cast de macaque.....	201
Figure 69 : Essais d'aérosolisation à l'aide du prototype pneumatique et des aérosols de fluorescéine pour visualiser le dépôt dans le modèle in vitro 3D Cast. Les images représentent (de la gauche vers la droite) les dépôts visibles sur la face (museau) ; la trachée, les filtres représentant les divisions bronchiques, les VAS du macaque et le masque après la nébulisation.....	201
Figure 70 : Images de dépôts par CT (computer tomography) de particules de grandes tailles de nanoparticules iodées avant (image de gauche) et après nébulisation (image de droite).....	202
Figure 71 : Images de dépôts par CT de particules de petites tailles de nanoparticules iodées avant (image de gauche) et après nébulisation (image de droite).....	203

Figure 72 : Images de dépôts d'aérosols radioactifs couplés au Béclospin, pour le prototype pneumatique dans le modèle in vitro 3D Cast de macaque, sur 3 essais. Les régions d'intérêt sont sélectionnées pour estimer le dépôt dans les VAS (entourées en rouge) et les VAI (encadrées en vert).	204
Figure 73 : Schéma expérimental in vivo et in vitro. Nébulisation d'aérosols à l'aide des prototypes développés et quantifications des dépôts par imagerie TEP/CT au CEA-IDMIT.	205
Figure 74 : Essais de nébulisation avec le prototype pneumatique et les prototypes T et Y installés sur la face d'un macaque.	208
Figure 75 : Exemple d'images de dépôts d'aérosols de Beclospin® radiotracés au DTPA- ^{99m} Tc, générés à l'aide du prototype 1 chez trois macaques en position assise dans une chaise de contention.	210
Figure 76 : Visualisation des aérosols générés à l'aide des prototypes par la technique d'imagerie scintigraphique par gamma caméra.	211
Figure 77 : Exemple d'images (TEP/TDM) de dépôt des aérosols dans les voies respiratoires, exprimées en SUV (Standard Uptake Value) après nébulisation d'environ 40 MBq de [¹⁸]–FDG avec le prototype de nébulisation à tamis vibrant de type Y chez un macaque cynomolgus.	216
Figure 78 : Exemple d'images (TEP/TDM) de dépôts d'aérosols (environ 40 MBq de [¹⁸]–FDG), dans les voies respiratoires, nébulisés à l'aide du prototype de nébulisation à tamis vibrant de type T chez le macaque cynomolgus. Les résultats de TEP/TDM sont exprimés en SUV.	217
Figure 79 : Courbes comparatives de la quantification des dépôts d'aérosols entre les prototypes T et Y.	218
Figure 80 : Structure en multicouche de la spore de <i>B. anthracis</i> (B.a) en Microscopie Electronique à Transmission d'après Stewart et al., 2015 [353].	225
Figure 81 : Schéma des étapes du cycle cellulaire d'un bacille : sporulation, germination et croissance végétative, d'après Sella et al., 2015 [356].	226
Figure 82 : Photo en microscopie électronique à transmission d'une spore de <i>Bacillus atrophaeus</i> d'après Sella et al., 2014 [356].	227
Figure 83 : Microscopie électronique à balayage d'une spore de <i>B. atrophaeus</i> . (A)= Cellules végétatives, (B) =cellules végétatives et sporulation et (C) = spores et libération de la spore mature de son compartiment intracellulaire, d'après Strom et al., 2002 [359].	228
Figure 84 : Aspect visuel d'une suspension de spores liquides de <i>Bacillus atrophaeus</i> .	230
Figure 85 : Photos de microscopie électronique de la souche bactérienne sans Tween (photo de gauche), en comparaison à la souche avec le Tween 20 (photo de droite).	231
Figure 86 : Graphique du dénombrement des spores exprimées en CFU/ml dans les 4 tubes d'essais en fonction du temps d'analyse.	231
Figure 87 : Schéma de la position des boîtes de Pétri sous la hotte pour la mesure de la contamination environnementale.	233
Figure 88 : Comparaison du montage expérimental in vitro pour la biocollection de spores de <i>Bacillus atrophaeus</i> à l'aide d'un nébuliseur à tamis (A) et un nébuliseur pneumatique fonctionnant avec un jet d'air humide (B).	235
Figure 89 : Observation des boîtes de Pétri après les mesures d'ambiance sous la hotte à J+24h et J+48h. La Boîte encerclée en rouge témoigne d'une erreur de manipulation.	236
Figure 90 : Exemple de dénombrement (pointillés noirs) de spores de <i>Bacillus atrophaeus</i> après nébulisation et biocollection au BioSampler, J+72 h.	237
Figure 91 : Concentration de <i>Bacillus atrophaeus</i> avant et après aérosolisation (n= 3) pour chaque nébuliseur.	238
Figure 92 : Analyse de la corrélation du MMAD des gouttelettes d'aérosols de spores (histogrammes bleus) et du ¹⁸ F-FDG (histogrammes oranges).	240
Figure 93 : Dispositif expérimental administration d'aérosols de spores chez le macaque.	241
Figure 94 : Aérosolisation de spores bactériennes chez le macaque à l'aide du prototype Y.	244
Figure 95 : Schéma expérimental récapitulatif de l'aérosolisation de spores non pathogènes chez le macaque à l'aide d'un prototype d'administration développé.	245

Figure 96 : Images TEP-TDM de dépôts des aérosols de spores chez un macaque.....	248
Figure 97 : Relation entre les spores mesurées dans les fluides biologiques et les spores calculées à partir de la radioactivité mesurée dans les mêmes fluides biologiques.....	249
Figure 98 : Concentration en spores mesurées dans les fluides biologiques chez les 4 macaques...	250
Figure 99 : Plan expérimental pour l'administration d'anticorps thérapeutique anti-SARS-CoV-2 chez le macaque par nébulisation à l'aide d'un prototype développé et par voie intraveineuse.....	253
Figure 100 : Pourcentage du total des IgG dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) et les écouvillons nasopharyngés. Le groupe traité par voie iv est en rouge et le groupe traité par nébulisation est en bleu. Test t de Mann-Whitney, valeurs de p: * <0,05.....	254
Figure 101 : Comparaison de la concentration systémique d'anticorps anti SARS-CoV-2 par voie intraveineuse et par nébulisation.	255
Figure 102 : Proposition de schéma récapitulatif de la thèse.	266

Liste des tableaux

Tableau 1 : Définition des volumes et des capacités pulmonaires chez un Homme adulte sain de 75kg [3].	67
Tableau 2 : Comparaison des données obtenues en utilisant la technique d'imagerie par gamma caméra et par TEP-TDM pour la visualisation du dépôt d'aérosols dans les modèles de PNH.	91
Tableau 3 : Résumé des caractéristiques des nébuliseurs générant des aérosols liquides et leur utilisation dans les études précliniques chez le PNH.	100
Tableau 4 : Facteurs influençant le dépôt des aérosols dans les poumons, tableau issu de l'article de l'article de Maalej et al., 2009 [178].	108
Tableau 5 : Estimation des zones de dépôts des aérosols chez l'Homme, selon les courbes ICPR [182].	110
Tableau 6 : Résumé des principaux mécanismes qui régissent le dépôt des aérosols dans les voies aériennes.	114
Tableau 7 : Dépôt d'aérosol dans le modèle anatomique avec un aérosol de fluorescéine.	176
Tableau 8 : Récapitulatif du cahier des charges pour le développement de dispositifs de génération d'aérosols chez le macaque. Comparaison avec le système d'administration d'aérosols Chad Box®.	178
Tableau 9 : Résultats granulométriques (moyenne des 3 répliques pour chaque solution).	198
Tableau 10 : Résultats de la quantification des dépôts d'aérosols nébulisés par le prototype 1 chez le macaque.	205
Tableau 11 : Résultats des dépôts d'aérosols obtenus avec la gamma-caméra sur 3 macaques et comparaison des résultats de dépôts avec des nébuliseurs standards commerciaux.	212
Tableau 12 : Résumé de l'administration d'aérosols de 3,9 µm de diamètre moyen chez le macaque cynomolgus, au CEPR et au CEA- IDMIT à l'aide de nébuliseurs à tamis ou pneumatiques.	214
Tableau 13 : Résultats de la quantification des dépôts des aérosols dans les voies aériennes du macaque à partir des prototypes Y (prototype 2) et des prototypes T (prototype 3).	218
Tableau 14 : Résumé du protocole d'aérolisation de spores de ¹⁸ F-FDG chez le macaque.	242
Tableau 15 : Résultats de la quantification TEP-TDM, des aérosols dans les fluides biologiques (* Upper Respiratory Tract (VAS) et LRT**(Lower Respiratory Tract= VAI). Le macaque CIA 101 a été exclu de l'analyse des résultats à cause de son réveil durant la nébulisation.	247
Tableau 16 : Résultats du dénombrement de spores après nébulisation dans les fluides biologiques.	250

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les aérosols (terme inventé par l'Allemand Schmauss en 1920), peuvent être définis comme un ensemble de fines particules solides ou de gouttelettes liquides de différentes formes et tailles présentes dans l'air ou un autre gaz [1] [2-4]. Dans l'air ambiant, la taille des aérosols est comprise entre quelques fractions de nanomètre à 100 μm [2]. Ils ont une vitesse de chute négligeable ce qui fait qu'ils peuvent se disperser plus ou moins loin de leur point d'émission en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Les aérosols véhiculant des molécules biochimiques, ou des micro-organismes vivants tels que des spores de champignons, du pollen, des bactéries et des virus sont dits bioaérosols [5-7]. Les aérosols sont générés par un large éventail de sources naturelles ou anthropiques.

L'Homme sain et l'Homme infecté peuvent aussi émettre des aérosols qui sont générés et diffusés sous formes de microgouttelettes de taille comprise entre 0,01 et 500 μm , [8] lors d'activités physiologique quotidienne telles que la respiration, la toux, les éternuements [9] ou la parole [10]. Ces aérosols sont alors des sources potentielles de contamination interhumaine [8,11].

L'intérêt pour les aérosols s'est considérablement accru au cours des dernières décennies, du fait de leurs nombreux effets néfastes sur la santé (pollution ...), intérêt qui s'est encore amplifié avec l'émergence récente du virus aéroporté SARS-CoV-2 et de ses différents variants.

Enfin, cet intérêt pour ce format et cette voie de transport est majoré parce qu'ils peuvent également servir à disséminer intentionnellement des agents de la menace bioterroriste, à des fins malveillantes pouvant entraîner une incapacité massive ou une morbidité importante chez les personnes atteintes. Roy *et al.*, 2005 dans leur article « Infectious disease aerobiology: aerosol challenge methods [12] concluent que la voie inhalée est la plus probable en cas d'attaque bioterroriste. Une étude récente réalisée par simulation numérique montre qu'une dispersion de 4 g/sec pendant 1 heure de spores de *Bacillus anthracis* dans l'air pourrait contaminer plus de 300 000 personnes et tuer entre 200 000 et 300 000 personnes en fonction des mesures de prophylaxie post-exposition prises : antibiothérapie et/ou vaccination [13].

Il apparaît donc important d'approfondir les connaissances scientifiques sur les aérosols notamment pour développer des contre-mesures-médicales (CMS) efficaces contre les agents biologiques aérosolisés.

Les effets des aérosols sur les muqueuses de l'organisme humain, et tout particulièrement celles des voies aériennes respiratoires supérieures et inférieures, dépendent de deux types de paramètres : les paramètres biophysiques et les paramètres biologiques. Les caractéristiques biophysiques sont intrinsèques à la

dynamique de l'aérosol et le principal paramètre à prendre en compte est le diamètre des particules d'aérosol générées [14-17], ce qui va influencer sur son dépôt dans les voies respiratoires. Les paramètres biologiques concernent la nature de l'agent biologique contenu dans la particule d'aérosol et ceux liés à sa cible aux niveaux de la surface des tissus concernés.

Dans un contexte d'évaluation des effets des bioaérosols sur la santé et de ses traitements associés, il est important de disposer de modèles d'études qui fournissent aux chercheurs un environnement scientifique pertinent pour étudier/comprendre ce format particulier de dissémination, de contamination et/ou d'intoxication.

Pour des raisons éthiques évidentes, l'Homme ne peut contribuer à toutes les étapes nécessaires à l'étude, la compréhension des bioaérosols. Différents modèles *in vivo* ou *in vitro* ont donc été développés. Parmi eux, les modèles *in vivo* (chez l'animal), dont certains ont l'avantage de présenter l'ensemble des systèmes biologiques qui constituent un être vivant complexe.

La plupart des études animales privilégient les rongeurs, les furets, les cobayes, les lapins, les chiens pour l'étude des substances inhalées, compte tenu des aspects réglementaires, du coût de réalisation des essais ou encore de la disponibilité de certaines de ces espèces animales, comme les rongeurs (souris, rats). Toutefois, le système respiratoire de ces espèces, n'est pas suffisamment proche de celui de l'Homme pour constituer un modèle pertinent et prédictif de ce qui sera observé chez l'Homme.

Ainsi, la littérature montre que les modèles animaux à structures respiratoires plus proches de celles de l'Homme comme le porc et le PNH (Primate Non Humain) sont de bons modèles d'études de l'émission et du dépôt des particules de bioaérosols émises et inhalées.

En particulier, le PNH présente une structure, une complexité et une physiologie de l'appareil respiratoire, mais également des mécanismes immunitaires au niveau de ses muqueuses respiratoires similaires à ceux de l'Homme. Il est à ce titre, un modèle animal privilégié, en particulier pour l'étude du dépôt des aérosols [18,19]. De plus, dans le cas des essais précliniques, pour le développement de contre-mesures médicales visant des agents pathogènes à haut risque comme les agents de la menace bioterroriste, « l'Animal Rule » de la Food and Drug Administration (US-FDA) recommande l'utilisation des PNH dans le cas où les études cliniques chez l'Homme sont impossibles pour des raisons éthiques.

Différentes méthodes sont utilisées pour cibler les voies respiratoires chez les macaques (instillation par voie nasale ou intratrachéale, pulvérisation de liquide directement dans la trachée, systèmes d'exposition à des aérosols au niveau de la tête ou du corps entier). Mais elles ne sont pas totalement satisfaisantes pour délivrer une dose d'aérosol contrôlée de manière reproductible. De plus elles ne sont pas directement transférables chez l'humain pour évaluer les contre-mesures. L'objectif de

cette thèse est de développer, à partir d'outils d'administration d'aérosols utilisés en biologie clinique, un système d'administration d'aérosols et les moyens associés pour délivrer et suivre les dépôts des pathogènes ou de contremesures associées, sous formes d'aérosols. La mise au point d'un tel outil vise à obtenir une administration précise et reproductible d'aérosols chez les macaques. De plus, cet outil devrait faciliter le transfert technologique rapide vers des essais cliniques chez l'Homme.

Les travaux de cette thèse ont été effectués au Centre d'Études des Pathologies Respiratoires, (CEPR) de l'Université de Tours, Inserm UMR U1100 et au Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) de Fontenay aux Roses au sein de l'Infrastructure Nationale en Biologie et Santé IDMIT, (Infectious Diseases Models for Innovative Therapies).

Cette thèse, qui s'inscrit dans le contexte du volet B du programme NRBCE (risques Nucléaires, Radiologiques, Biologiques, Chimiques et Explosifs) de l'AID, s'articule autour de 4 parties :

- La première partie concerne la revue de la littérature dans le domaine des aérosols et des PNH. Elle est constituée d'un premier chapitre sur l'anatomie et la fonctionnalité du système respiratoire de l'Homme en comparaison de celui des PNH, en mettant en évidence les différences et similitudes structurelles et fonctionnelles. Un second chapitre aborde le domaine des aérosols en détaillant la métrologie, les outils de génération des aérosols, les mécanismes de suivi des dépôts dans les voies respiratoires et la pharmacocinétique. Cette première partie sera complétée d'un article de synthèse qui résume i) les limites des méthodes d'aérosolisation actuellement utilisées et ii) souligne l'importance de la maîtrise de la dose et sa répartition dans les voies respiratoires pour prédire les effets.
- La deuxième partie de la thèse concerne le développement expérimental d'un modèle anatomique et physiologique *in vitro* du système respiratoire du macaque. En effet, cet outil a été développé dans un contexte de réduction des coûts, de gain de temps et pour répondre à la directive européenne 2010/63 sur la protection des animaux, afin de réduire le nombre d'essais sur les macaques (3Rs).
- La troisième partie de la thèse traite du développement des outils d'administration des aérosols liquides pour contrôler la dose et améliorer le ciblage anatomique dans les voies respiratoires du macaque. Les outils d'administration d'aérosol ont été mis au point à l'aide du modèle anatomique *in vitro* précédemment développé puis ils ont été évalués sur des macaques aux moyens de systèmes d'imagerie de type gamma camera et TEP/CT pour quantifier le dépôt.
- La dernière partie consiste en l'aérosolisation de spores bactériennes de *Bacillus anthracis*, mimant des agents pathogènes de classe IV de type *Bacillus anthracis* (agent de la menace bioterroriste), et l'aérosolisation d'un anticorps thérapeutique développé contre le SARS-CoV-2 en confinement A3 chez le PNH au moyen du système d'aérosolisation développé.

In fine, l'objectif de cette thèse consiste en le développement d'un modèle d'administration de spores chez les macaques pour l'évaluation des contre-mesures médicales existantes ou nouvelles (exemple : vaccin) ainsi que la prévention des menaces biologiques et bioterroristes. Ces recherches sur les aérosols pourront contribuer à l'avancement des connaissances scientifiques et à l'amélioration de la santé humaine.

-

Chapitre I : Généralités et revue de la littérature

I.1 Généralités sur le système respiratoire de l'Homme et comparaison avec le Primate Non Humain (PNH)

Dans ce chapitre, il sera question du système respiratoire (anatomie structurelle et physiologie respiratoire) chez les mammifères. Ensuite nous nous focaliserons sur l'anatomie comparée du Primate Non Humain (PNH) et de l'Homme, cibles des aérosols d'agents biologiques, pathogènes, toxiques ou thérapeutiques. Ces généralités seront suivies d'une comparaison pour mettre en évidence les différences observées dans les études publiées entre le PNH et les autres petits mammifères d'une part et le PNH et l'Homme d'autre part.

La bonne connaissance de l'anatomie et de la physiopathologie du système respiratoire des mammifères est cruciale pour la compréhension des phénomènes d'inhalation et des dépôts de toutes particules dans l'organisme.

Dans le cadre de l'étude des aérosols, les modèles de mammifères sont particulièrement intéressants mais les voies respiratoires présentent des différences importantes entre les espèces, ce qui rend primordial, le choix du modèle animal en fonction de l'objectif des travaux [20,21].

Le système respiratoire a pour rôle principal et fondamental d'apporter l'oxygène (O_2) nécessaire aux cellules et d'éliminer par l'expiration le gaz carbonique (CO_2).

Il est composé de deux parties : les voies aériennes supérieures (VAS) également appelées partie extra-thoracique et les voies aériennes inférieures (VAI), ou partie intrathoracique (IT) (figure 1). Au sein de ce système respiratoire, le nez et la bouche sont les interfaces majeures des échanges d'air entre l'environnement extérieur et l'intérieur de l'organisme.

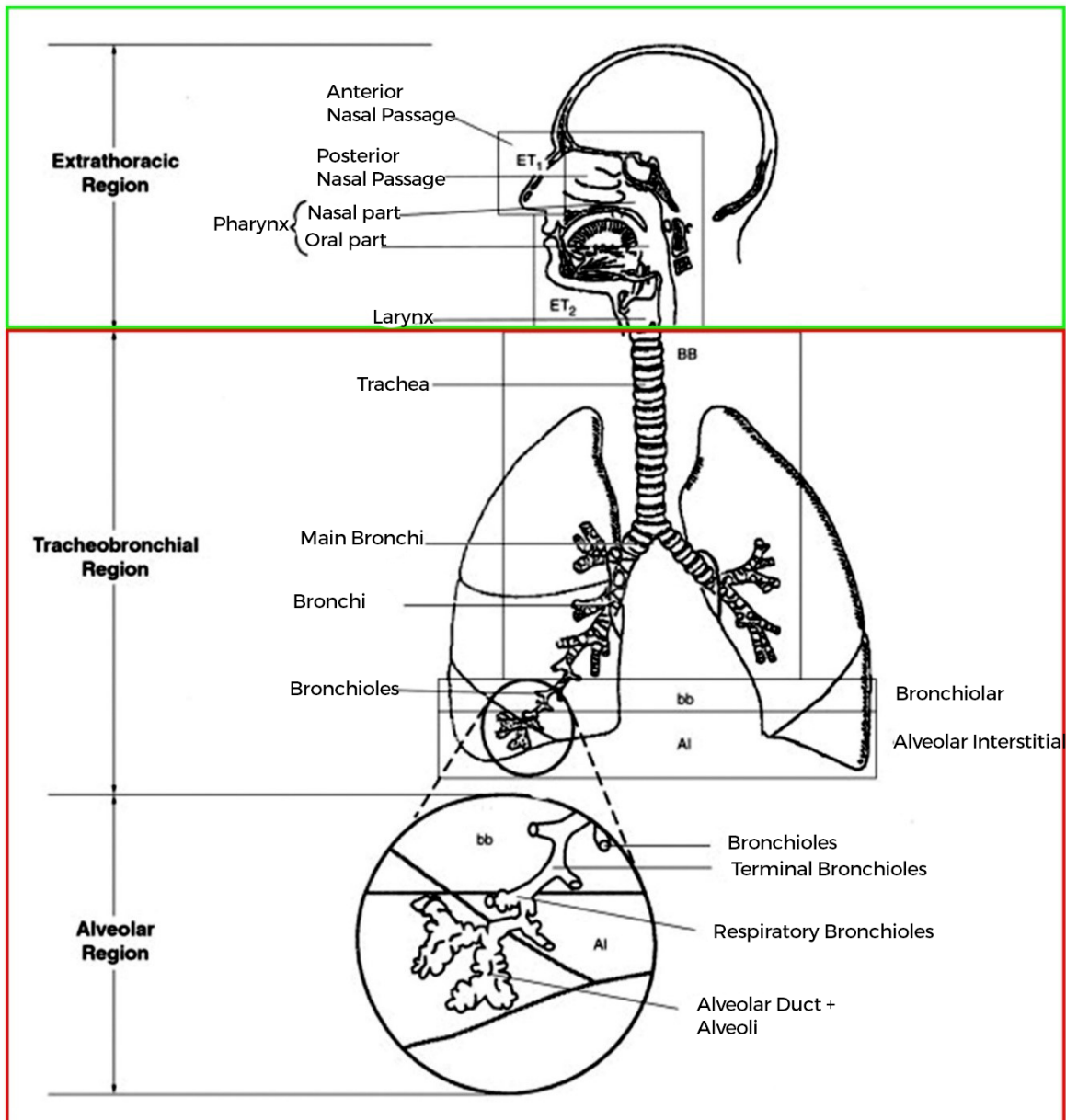


Figure 1: Détails de l'anatomie humaine des VAS ou Région extra-thoraciques (ET) (encadré en vert) et des VAI ou Région intrathoracique (IT).

Les VAI peuvent être compartimentées en zone trachéo-bronchique et zone alvéolaire ou zone de conduction (encadré rouge) d'après Hofmann, 2009 [22].

I.1.1 Généralités sur les voies aériennes des modèles animaux utilisés dans les études d'inhalation

I.1.1.1 Généralités sur les voies aériennes supérieures

Les espèces de mammifères les plus souvent utilisées pour les études d'inhalation sont les rongeurs (rats, souris et lagomorphes) et les non rongeurs, parmi lesquels on trouve les ruminants, les furets, les porcs, les chiens, et les Primates Non Humains (PNHs) [23-26].

Chez les non rongeurs, le PNH est l'espèce la plus proche de l'Homme en termes de système respiratoire et d'évolution phylogénétique. Il est utilisé en particulier dans les études d'inhalation de pharmacologie, d'infectiologie [19], de toxicologie [27] et dans le domaine de la bio défense (Cf. revue de la littérature).

D'un point de vue physiologique, les voies aériennes supérieures des mammifères sont multifonctionnelles avec un rôle respiratoire et un rôle olfactif. L'olfaction est une fonction sensorielle importante pour la vie des rongeurs (souris et rats) qui ont des structures nasales complexes et adaptées à la vie macrosmatique (se dit d'un vertébré dont la partie olfactive du cerveau est très développée). La fonction respiratoire chez les rongeurs est globalement similaire à celle des autres mammifères avec quelques différences anatomiques et physiologiques [28].

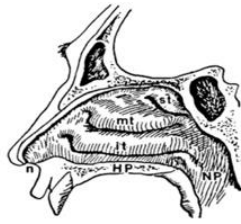
La figure suivante (figure 2) illustre le fait que les voies nasales des mammifères sont séparées en deux parties par un septum. La structure et la complexité anatomique des sinus qui les constituent diffèrent entre les espèces. Associé à cela, les volumes nasaux (ml) et la surface totale des voies nasales exprimée en cm² est proportionnelle à la taille de l'espèce de mammifère, comme présenté dans la figure 2.

La surface et les volumes des voies aériennes supérieures conditionnent les phénomènes de dépôts des aérosols dans les voies aériennes [29].

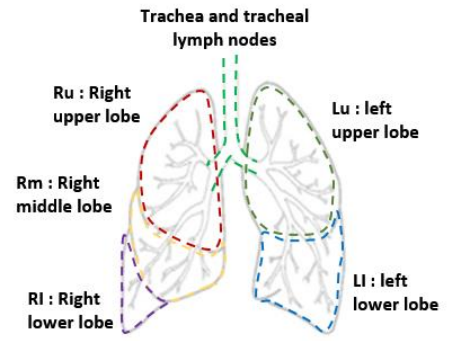
Non Rongeurs

Human

NV : 19 mL ; SA : 181 cm²



St : superior turbinate ; mt : middle turbinate ;
it : inferior turbinate ; HP : hard palate ;
NP : nasopharynx ; n : nostril (naris) ;
NV : nasal volum ; SA : Surface area

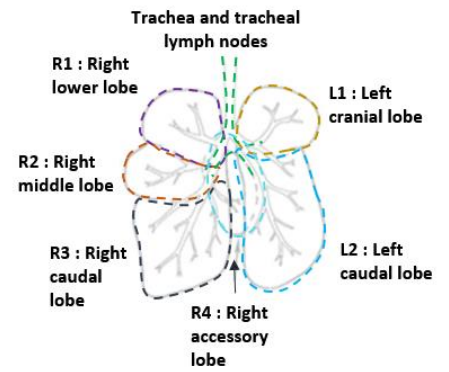


Monkey

NV : 8 mL ; SA : 61,6 cm²



HP : hard palate ; et : ethmoid turbinate(s)
NP : nasopharynx ; n : nostril (naris) ;
NV : nasal volum ; SA : Surface area



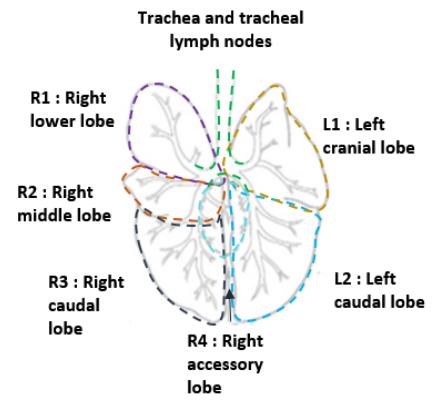
Non Rongeurs

Dog

NV : 20 mL ; SA : 220,7 cm²

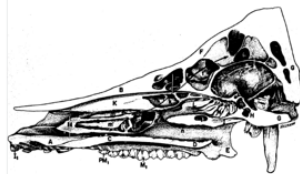


HP : hard palate ; et : ethmoid turbinate(s)
NP : nasopharynx ; n : nostril (naris) ;
NV : nasal volum ; SA : Surface area

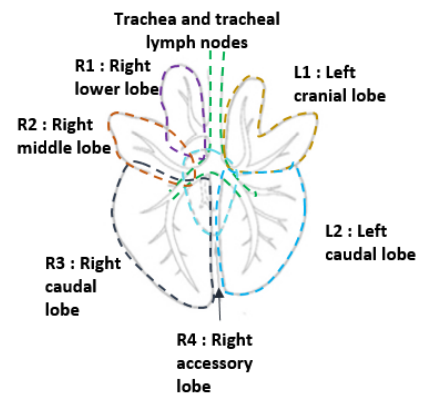


Pig

NV : not defined ; SA : not defined



NV : nasal volum ; SA : Surface area



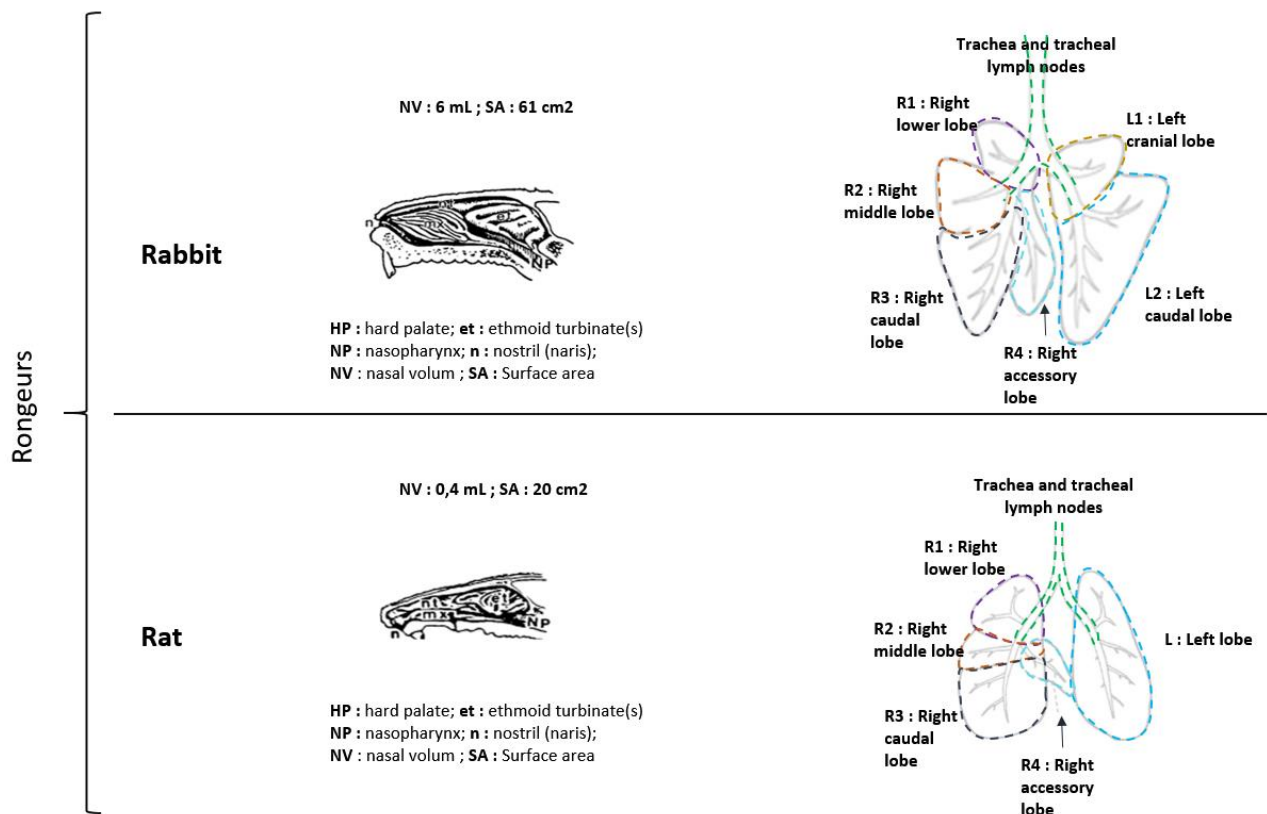


Figure 2 : Coupes sagittales d'anatomie comparée des VAS et VAI des espèces de mammifères (classifiées en rongeurs et non rongeurs) utilisées dans les études d'inhalation en comparaison avec l'Homme (partie gauche de la figure).

Les schémas sont modifiés et issus des études d'Harkema et al., 1991 (rat, rabbit, dog, monkey et Human) [23] et d'Hillmann [30] (domestic pig). Les voies aériennes supérieures se composent de différents sinus et cornets nasaux, qui sont plus complexes pour les petites espèces de mammifères (rongeurs) contrairement aux grandes espèces de mammifères (Homme). Pour chaque espèce à l'exception du porc, les volumes nasaux exprimées en mL et la surface des voies aériennes, exprimée en cm² sont définies selon les données de Emami et al 2018 [28]. La partie droite de la figure montrent des coupes frontales d'anatomie des voies aériennes inférieures [31,32] de différentes espèces de mammifères utilisées dans les études d'inhalation d'aérosols. Les voies aériennes inférieures sont composées des voies aérifères (trachée schématisée en pointillé vert et des bronches irrigant les lobes pulmonaires) et des poumons droits et gauches segmentés en différents lobes (encadrés en différentes couleurs pour chacun des lobes).

I.1.1.2 Généralités sur les voies aériennes inférieures

Les voies aériennes inférieures des mammifères sont constituées de voies aérifères (trachées et bronches) et des poumons possédant une lobation spécifique à chaque espèce de mammifères (Cf. Figure 2). La comparaison de l'anatomie entre les différentes espèces de mammifères utilisées dans les études d'inhalation [33] démontre l'importance de bien connaître les variations anatomiques macroscopiques et microscopiques (structures épithéliales et cellulaires).

Par ailleurs, les auteurs insistent sur les variations physiologiques dans la mesure où leur disposition anatomique, leur présence ou leur absence chez une espèce animale et leur altération peuvent influencer sur le flux d'air nasal, et les phénomènes de dépôts d'une particule inhalée.

La figure 3 d'après Reczyńska *et al.*, 2008 [32] résume les points positifs et les points négatifs dans le choix des différentes espèces animales de mammifères pour les études d'inhalation en comparaison avec l'Homme.

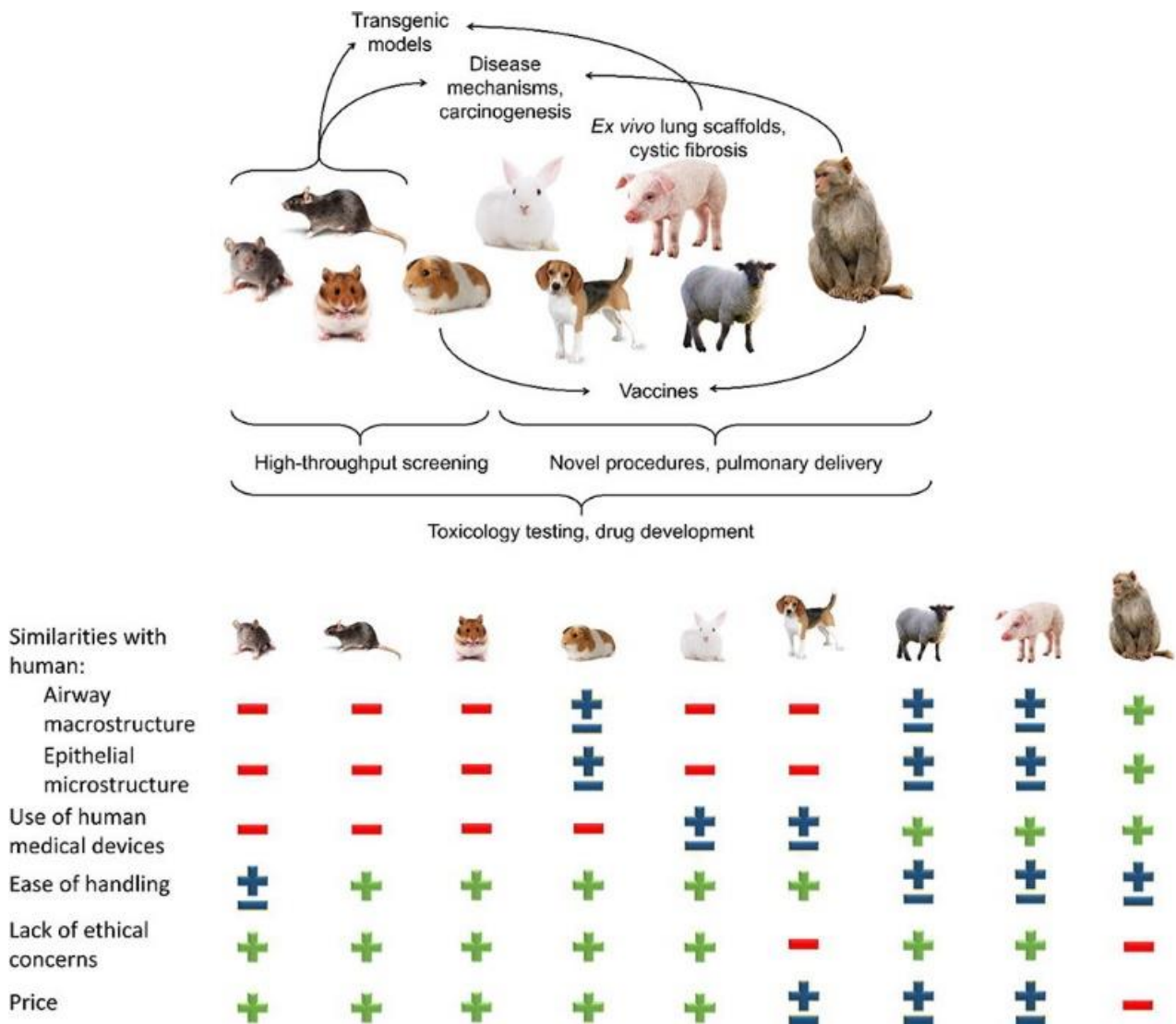


Figure 3 : Points positifs et négatifs sur les différentes espèces animales utilisées dans les études d'inhalation d'aérosols.

Cette figure issue de l'article de Reczyńska *et al.*, 2008 [32] passe en revue les paramètres suivants : macrostructures et microstructures des voies respiratoires, utilisation d'outils d'aérosolisation clinique, facilité d'expérimentation. La figure indique les espèces animales qui ne posent pas de problèmes éthiques particuliers ainsi que leurs coûts d'utilisation.

Après avoir présenté les généralités sur les mammifères utilisés dans les études d'inhalation, il est nécessaire de se focaliser sur les différences structurelles, anatomiques et physiologiques des deux espèces de mammifères les plus proches, en termes d'appareil respiratoire, le Primate Non Humain et l'Homme [25,28,34,35] [23,33].

Ce sont ces différences qui expliqueraient essentiellement les divergences observées dans les résultats d'études de dépôts des aérosols.

I.1.2 Détails de l'anatomie fonctionnelle comparée des voies aériennes supérieures de l'Homme et du Primates Non Humain (PNH)

Chez l'Homme et les PNH, les voies aériennes supérieures (VAS) débutent par le nez (noté n dans la figure 2), les cavités ou fosses nasales et la cavité buccale.

Le nez et la cavité buccale constituent les premiers boucliers de défense de l'organisme contre tous les xénobiotiques inhalés (pathogènes microbiens ou toxiques). En effet, ce sont les premiers organes en contact avec l'extérieur, en dehors de la peau.

I.1.2.1 Description de l'anatomie des fosses nasales du PNH et de l'Homme

Les fosses nasales débutent par le nez qui est creusé au milieu de la face, précisément au sein de l'os maxillaire. Elles se composent de deux orifices appelés narines. Chez le PNH comme chez l'humain, les narines sont parsemées de poils qui ont un rôle de filtration de l'air inhalée. Ainsi, les grosses particules de l'air sont arrêtées à ce niveau.

La cavité des fosses nasales est limitée par une paroi osseuse formée par l'os maxillaire supérieur et l'éthmoïde. De fines lamelles osseuses sont implantées dans cette cavité nasale, il s'agit des cornets.

Ce sont des structures osseuses recouvertes de l'épithélium respiratoire, qui contribuent à augmenter la surface des cavités nasales.

Sur une coupe sagittale de la cavité nasale humaine (Cf. Figure 2,4 et 5), on peut noter trois cornets (turbinates en anglais) qui sont :

- Le **cornet nasal supérieur** (st=**superior turbinate**) au niveau de l'éthmoïde dans lequel on retrouve fusionné le cornet nasal suprême,
- Le **cornet nasal moyen** (mt=**middle turbinate**),
- Le **cornet nasal inférieur** (it=**inferior turbinate**) qui repose sur le processus palatin du maxillaire (hp=**hard palate**).

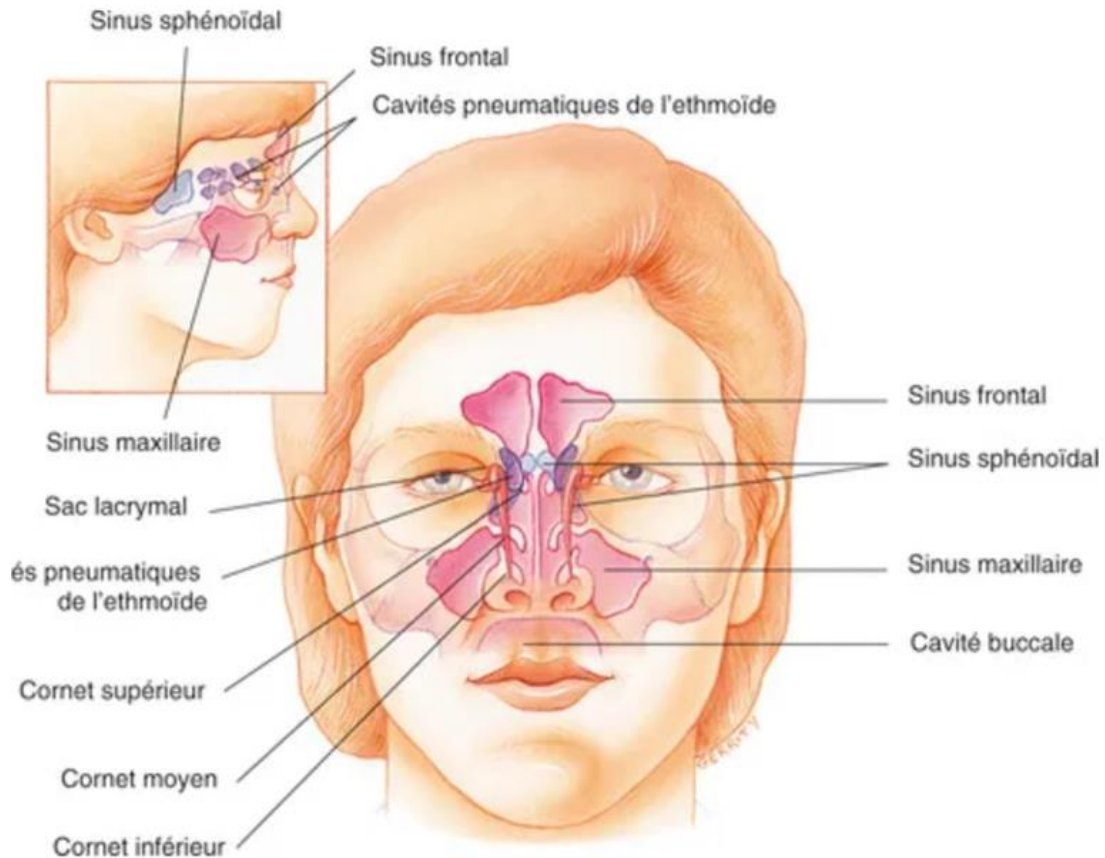


Figure 4: Coupe frontale des fosses nasales humaines. Les fosses nasales humaines se composent de différents sinus et cornets nasaux [36].

A l'inverse de l'humain, le PNH, en particulier l'espèce macaque (espèce de PNH d'élevage la plus utilisée dans les études d'inhalation [33]), a deux cornets nasaux au lieu de 3. Comme le montrent les figures 2 et 5, (5A et 5B), on retrouve chez le macaque :

- Le **cornet ethmoïdal** (et=**ethmoïde turbinate**),
- Le **cornet maxillaire** (mt= **maxiloturbinate**).

L'Homme et le PNH ont des cavités nasales structurellement simples [33] avec pour fonction primordiale la respiration. Les humains et les PNH respirent en général par la bouche et le nez [20,21,23]. Les PNH et l'Homme ont un sens olfactif moins développé que le porc ou le chien, par exemple.

Les surfaces nasales totales des voies aériennes supérieures de l'Homme et du singe sont respectivement de 181 cm² en moyenne et de 61,6 cm² [28,37]. Les volumes nasaux de l'Homme et du singe sont respectivement de 19 ml et 8 ml [28].

Ces volumes et surfaces des cavités nasales du singe adulte correspondraient plutôt aux volumes et surfaces pédiatriques chez l'Homme. Le macaque est décrit dans la littérature comme étant un bon modèle pédiatrique d'étude du dépôt des aérosols [38-40].

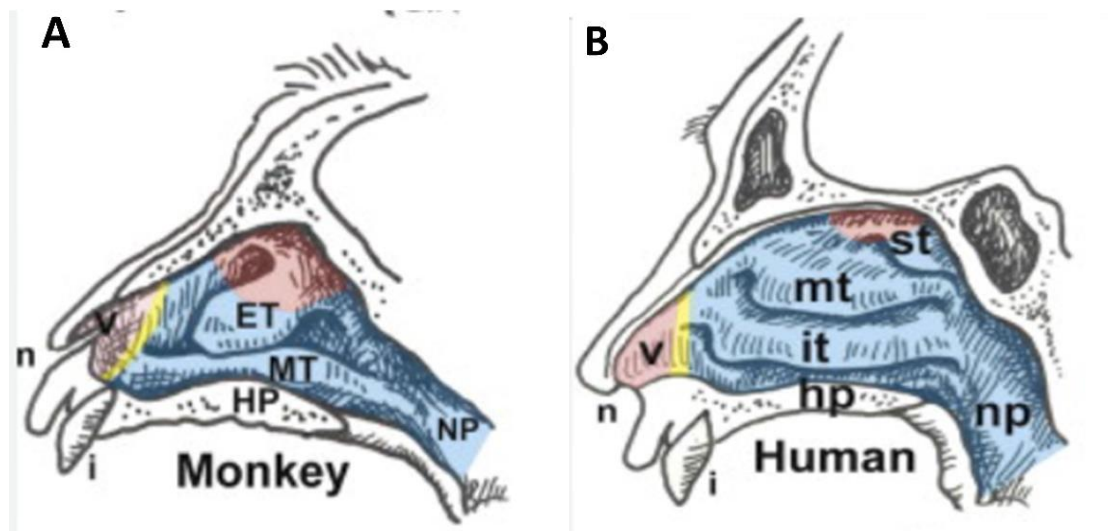


Figure 5 : Anatomie comparée des fosses nasales de l'Homme (A) et du singe (B) d'après Harkema et al., 2012 [24].

I.1.2.2 La bouche ou cavité buccale

La bouche est l'orifice d'entrée commun des systèmes digestifs et respiratoires. L'intérieur de la bouche est tapissé d'une muqueuse buccale protectrice. Elle se compose de différentes parties qui sont la voûte palatine, les gencives, la langue, l'arcade dentaire et le plancher buccal. Elle est limitée en avant par les lèvres, en arrière par l'isthme du gosier et latéralement par les joues (Figure 6).

Dans le prolongement de la bouche, on retrouve le pharynx, le larynx et le début de l'arbre trachéo-bronchique.

I.1.2.3 Le pharynx

Il s'agit d'un carrefour aéro-digestif de constitution musculo-membraneuse, de 15 cm de longueur chez l'Homme, qui assure la communication entre les fosses nasales, le larynx et la cavité buccale. Le pharynx débute précisément au niveau de la face

interne des narines et s'étend jusqu'au niveau du cartilage cricoïde, qui est un cartilage laryngé au-dessus de la trachée (Cf. triangle noir dans la figure 6).

Ce conduit peut se décomposer en 3 régions du haut vers le bas :

- Le **nasopharynx** (point rouge sur la figure 6) ou rhinopharynx ou cavum, se situe en arrière des fosses nasales et du voile du palais ;
- **L'oropharynx** ou **buccopharynx** (point jaune sur la figure 6) se situe en arrière de la cavité buccale ;
- **L'hypopharynx** ou **laryngopharynx** se situe en arrière du larynx (point bleu sur la figure 6).

I.1.2.4 Le larynx

Il s'agit d'un conduit rigide ostéo cartilagineux impliqué dans la respiration assurant le passage de l'air vers la trachée et les poumons. Il sépare la trachée des voies aéro-digestives supérieures [3,24,41]. Il se situe entre le pharynx et la trachée. Le larynx se compose de trois parties : l'épiglotte, les deux cordes vocales et la trachée.

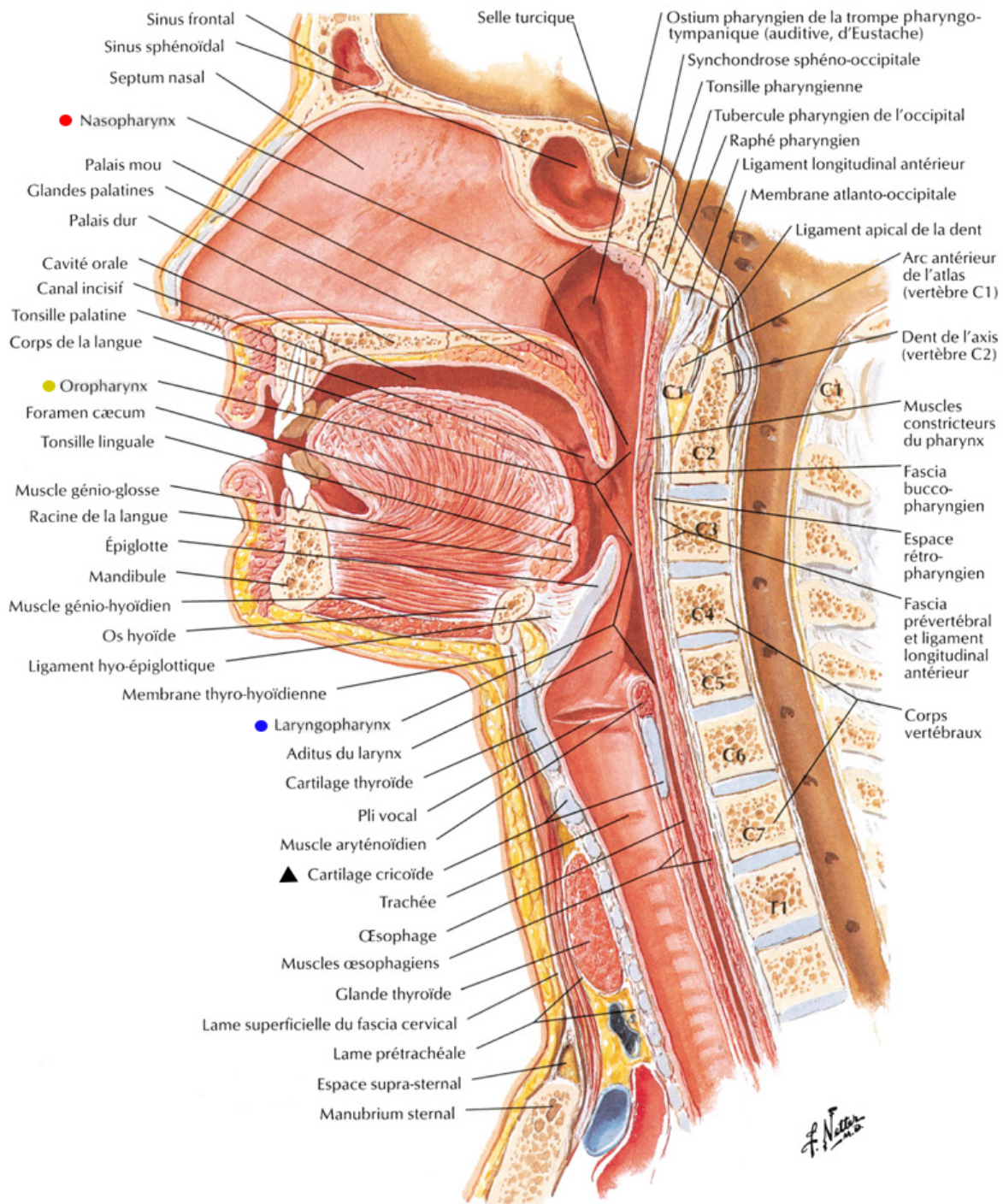


Figure 6 : Coupe sagittale des voies aériennes supérieures chez l'Homme, d'après l'atlas d'anatomie du Netter [41]. Les points rouge, jaune et bleu représentent respectivement, le nasopharynx, l'oropharynx et le laryngopharynx. Le triangle noir représente le cartilage cricoïde, qui est un cartilage pharyngé délimitant la fin du pharynx.

I.1.3 Fonctionnalité des voies aériennes supérieures du PNH et de l'Homme

I.1.3.1 Fonctionnalité des voies nasales chez l'Homme et le PNH

Les fonctions des fosses nasales sont les suivantes :

- Réchauffer et humidifier l'air inhalé

L'air inspiré entre au niveau du vestibule (noté v dans la figure n°2) des fosses nasales et est acheminé vers la cavité nasale. Il est par la suite réchauffé et humidifié au niveau des cornets nasaux. L'air est réchauffé par des phénomènes de biophysiques de mécaniques des fluides grâce à différents mouvements (turbulent ou laminaire) lors des échanges d'air durant l'inspiration et l'expiration. Il s'agit d'une des fonctions physiologiques les plus importantes du nez [42].

- Eliminer les particules déposées grâce à la clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire est assurée par les cellules sécrétrices de mucus et des cellules ciliées (cils vibratiles) de la muqueuse nasale [43,44]. Les sécrétions issues des cellules caliciformes et des glandes submuqueuses composent le mucus qui tapisse l'épithélium de la cavité nasale.

Le mucus est un fluide qui a une composition diversifiée. Il se compose en majorité d'eau et de glycoprotéines (mucines), d'immunoglobulines (IgG) (IgA, IgG2), de lysozyme [45] , d'histamine, d'albumine, de lactoferrines, d'ions et de débris cellulaire [44]. Les cellules immunitaires du mucus, ont un rôle de défense de l'organisme contre des microorganismes entrant dans le tractus respiratoire.

La composition du mucus lui confère des propriétés visqueuses (fluide facilement déplacé par les mouvements des cils vibratiles) et des propriétés élastiques, qui permettent l'expulsion lors d'un éternuement par exemple [46]. En effet, les cellules épithéliales ciliées respiratoires par le mouvement de leurs cils vibratiles unidirectionnels, poussent le mucus dans un mouvement unique vers le nasopharynx. Le mouvement du mucus est rétrograde uniquement dans la région des cornets nasaux inférieurs. La composition protéique du mucus du macaque a des propriétés similaires au mucus humain. Les cils et le tapis muqueux sont donc les deux acteurs de la clairance mucociliaire. La quantité quotidienne de sécrétions physiologiques de mucus chez l'Homme, est faible. Elle varie entre 10 ml et 50 ml [46] en fonction de l'état de la muqueuse nasale.

Les acteurs de ce mécanisme de clairance sont détaillés dans le chapitre III.1.2. « Pollution the nose and sinuses », de Leopold et Donald., 1995 [47] qui indiquent que les particules inhalées avec un diamètre aérodynamique de 9 µm ou plus qui pénètrent dans le nez, vont adhérer aux parois nasales, tandis que celles avec un diamètre compris entre 2 et 9 µm seront déplacées par le courant d'air entrant. Durant cette phase de déplacement, des particules entraînées par le courant d'air entrant dans la cavité nasale, les grosses particules s'accumuleront en surface par un mécanisme

d'impaction au niveau des parois nasales et seront éliminées grâce à la clairance mucociliaire.

- **Assurer le mécanisme d'olfaction chez le PNH et l'Homme**

L'olfaction chez l'Homme est une fonction importante mais non indispensable des fosses nasales par rapport au rôle respiratoire du nez chez l'Homme [28].

La région olfactive se situe dans la partie supérieure de la cavité nasale, au niveau de l'éthmoïde, et représente environ 10 % de la surface totale de la cavité nasale chez l'Homme. Cette région contient des récepteurs olfactifs responsables de l'odorat, ainsi que des glandes séreuses. Comme le montre la figure 7, des aérosols de médicaments peuvent être administrés par voie intranasale dans cette région olfactive en transitant (flèches bleues sur la figure 7) et pénétrant dans le système nerveux central, par les fibres nerveuses olfactives du bulbe olfactif (olfactory nerves sur la figure 7) [48]. Les fibres nerveuses olfactives ont une capacité de renouvellement. Cette voie d'administration est intéressante pour les médicaments dont la biodisponibilité systémique est faible ou qui sont incapables de traverser la barrière hémato-encéphalique.

Histologiquement, chez les deux espèces [49], la muqueuse olfactive peut se diviser en deux parties : (1) l'épithélium olfactif proprement dit contenant différentes cellules (cellules réceptrices et de soutien, des cellules basales reposant sur une membrane basale) et des parties des canaux de la glande de Bowman. La surface de l'épithélium olfactif est recouverte de sécrétions séro-muqueuses. (2) la *lamina propria* contenant des cellules stromales, des éléments de tissu conjonctif, des glandes et des canaux de Bowman, les fascicules du nerf olfactif et les vaisseaux sanguins.

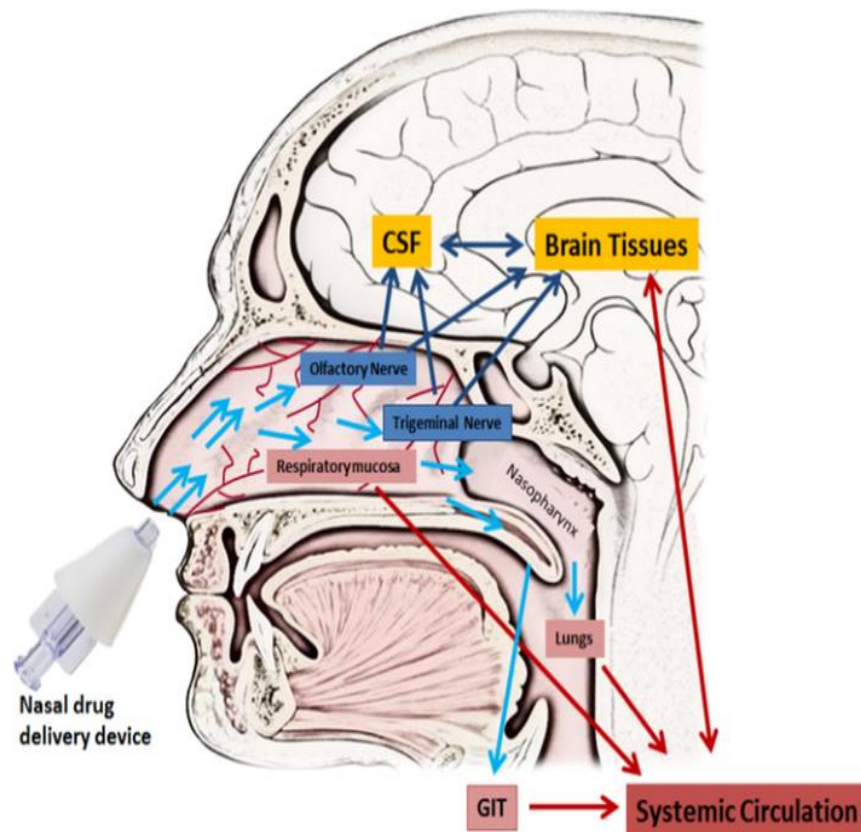


Figure 7 : Représentation de la muqueuse olfactive (partie supérieure de la région nasale) et la trajectoire des différentes voies d'administration des médicaments sous formes d'aérosols par voie nasale (flèches bleues claires). Schéma d'après Kappoor et al., 2016 [48].

La pénétration dans le cerveau par les fibres neuronales olfactives et trigéminales est représentée par les flèches bleues foncées puis la biodistribution dans la circulation sanguine par les flèches rouges. GIT est le tractus gastro-intestinal, CSF est le liquide céphalo-rachidien.

On ne retrouve pas de différences dans le fonctionnement de l'olfaction chez le PNH en comparaison à l'Homme.

I.1.3.2 Fonctionnalité de la cavité buccale

La cavité buccale a un rôle dans la respiration en assurant le passage de l'air inspiré vers le larynx et le pharynx. La bouche a également un rôle dans la digestion et la mastication : la langue permet la gustation des aliments, les dents leur mastication des aliments.

Les singes comme l'espèce macaque possèdent des abajoues qui sont deux poches s'ouvrant dans la bouche. Elles ont un rôle de stockage rapide de la nourriture.

I.1.3.3 Fonctionnalité du pharynx

Après avoir traversé les cavités nasale et buccale, l'air et les particules inhalées cheminent dans le pharynx. Le pharynx est décrit comme étant le lieu anatomique où

s'impactent les particules de grandes tailles en présence des débits d'air élevés [50]. Il est important de noter que l'ouverture ou la fermeture oropharyngée durant l'inhalation influence le dépôt des particules dans les poumons et par conséquent influence l'administration des agents thérapeutiques destinés à soigner des pathologies respiratoires [51].

La partie nasale du pharynx, le nasopharynx, a un rôle de défense liés aux tissus lymphoïdes associés aux muqueuses nasales ou NALT (Nasal Lymphoid Tissue) qui se situent à l'entrée du nasopharynx de l'Homme et des PNH pour assurer un rôle local de défense [52] [43] de l'organisme face aux particules inhalées. En effet, la muqueuse des NALT est composée d'un infiltrat de cellules immunitaires lymphocytaires (lymphocytes T et B) et macrophagique qui confèrent aux voies aériennes supérieures une réponse immunitaire cellulaire. Kuper *et al.*, 1990 [53] indiquent que dans les études d'inhalation précliniques, l'examen des NALT est recommandé pour comprendre la composition et les éventuelles altérations qui peuvent expliquer la physiopathologie des lésions causées par un toxique inhalé.

I.1.3.4 Fonctionnalité du larynx

L'air transite par le larynx pour rejoindre la trachée puis les poumons. Quand l'épiglotte se ferme, cela évite l'intrusion de corps étrangers dans les voies aériennes inférieures. Le larynx est également impliqué dans la phonation. A l'inverse de l'Homme, les cordes vocales des PNH ne servent pas à un langage articulé mais simplement l'émission de vocalises pouvant avoir des significations codées et orienter l'attention des congénères sur une activité ou un évènement précis [54]. Le larynx est placé plus haut chez le PNH, par rapport à l'Homme.

Labiris *et al.*, 2003 [11] affirment que la clairance mucociliaire associée à la géométrie des voies respiratoires, l'humidité et les macrophages alvéolaires jouent un rôle essentiel dans le maintien de la stérilité du poumon et constituent par conséquent des enjeux importants dans l'efficacité thérapeutique des médicaments inhalés.

Tout ce qui précède montre que l'anatomie des voies aériennes supérieures et son fonctionnement, sont quasi-similaires entre l'espèce humaine et le PNH [55] à la différence près des volumes et surfaces nasaux, des quantités produites de mucus, le nombre de cornets (3 cornets chez l'Homme, versus 2 chez le macaque (Cf. Figures 5 A et 5 B), la présence d'abajoues uniquement chez le PNH et la position du larynx.

I.1.4 Détails de l'anatomie fonctionnelle et structurelle des voies aériennes inférieures du PNH et de l'Homme

Chez le PNH, comme chez l'Homme les voies respiratoires inférieures (VAI) sont composées de conduits aérifères (trachée et bronches) et de deux poumons, siège des échanges gazeux (hématose) au niveau alvéolaire.

I.1.4.1 Anatomie des poumons et de la plèvre humaine comparée aux poumons des PNH

Au cours d'une vie, les poumons inhalent en moyenne 300 millions de litres d'air. L'air inspiré est composé principalement d'azote (79 %), d'oxygène (20,9 %), de vapeurs d'eau (0,07 %), et uniquement 0,03 % de CO₂. La composition de l'air expiré ne contient plus que 16% d'oxygène, et 4 % de teneur en CO₂. L'oxygène (O₂) est capté par les cellules du sang, et il est transporté dans les poumons au niveau des alvéoles pulmonaires. Les humains et les singes possèdent deux poumons compartimentés en différents lobes.

I.1.4.1.1 La plèvre

Les poumons sont recouverts de feuillets appelés plèvres. Ils sont logés dans la cage thoracique. La plèvre, située entre les poumons et la paroi thoracique, est une membrane thoracique très mince mais d'une grande solidité composée de deux feuillets. L'un est qualifié de pariétal et tapisse l'intérieur de la cavité thoracique. L'autre feuillet est dit viscéral et se trouve au contact direct des poumons (Figure 8). Les deux feuillets sont séparés par un espace vide appelé cavité ou espace pleurale [56]. Ils peuvent ainsi se déplacer facilement l'un sur l'autre. La plèvre permet notamment de protéger les poumons en atténuant les chocs et en bloquant le passage de certains virus et bactéries. En cas de présence de liquide au sein de cette cavité, on parle de pleurésie. En cas de présence d'air, il s'agit d'un pneumothorax.

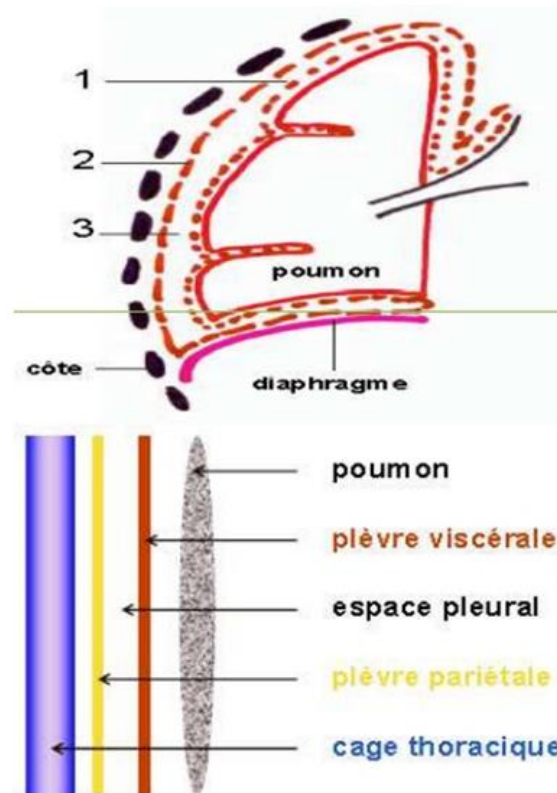


Figure 8: Représentation schématique des feuillets pleuraux humain d'après Nassra., 2023 [56].

I.1.4.1.2 Les poumons

L'anatomie du tractus respiratoire des primates est dichotomique, avec un angle important de séparation entre la bronche principale gauche et la bronche principale droite [23]. Cette architecture pulmonaire rend les poumons des PNH plus proche de ceux des humains et intéressants pour reproduire la distribution des aérosols.

Chez l'Homme, les deux poumons reposent sur le diaphragme et sont segmentés en 5 lobes séparés par des scissures (Cf. Figure 9) :

- **Le poumon gauche** se compose de **deux lobes** : le lobe inférieur et le lobe supérieur divisé par une grande scissure
- **Le poumon droit** se compose de **trois lobes** : le lobe supérieur, le lobe moyen, et le lobe inférieur. Les scissures obliques horizontales divisent les lobes.

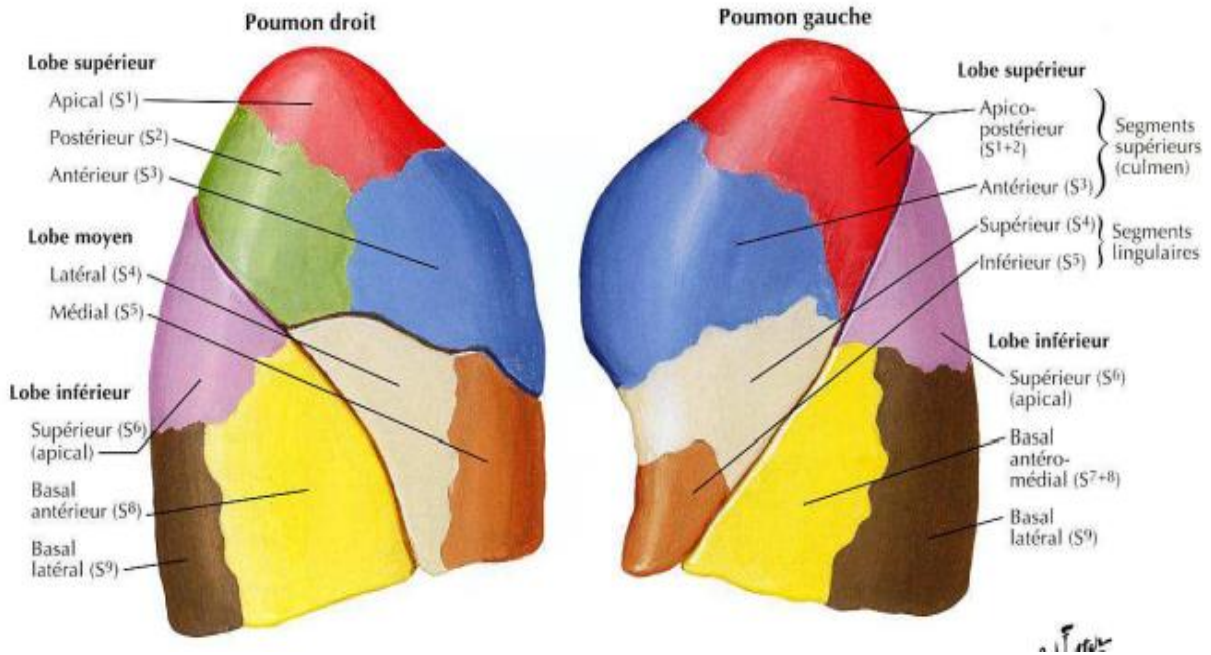
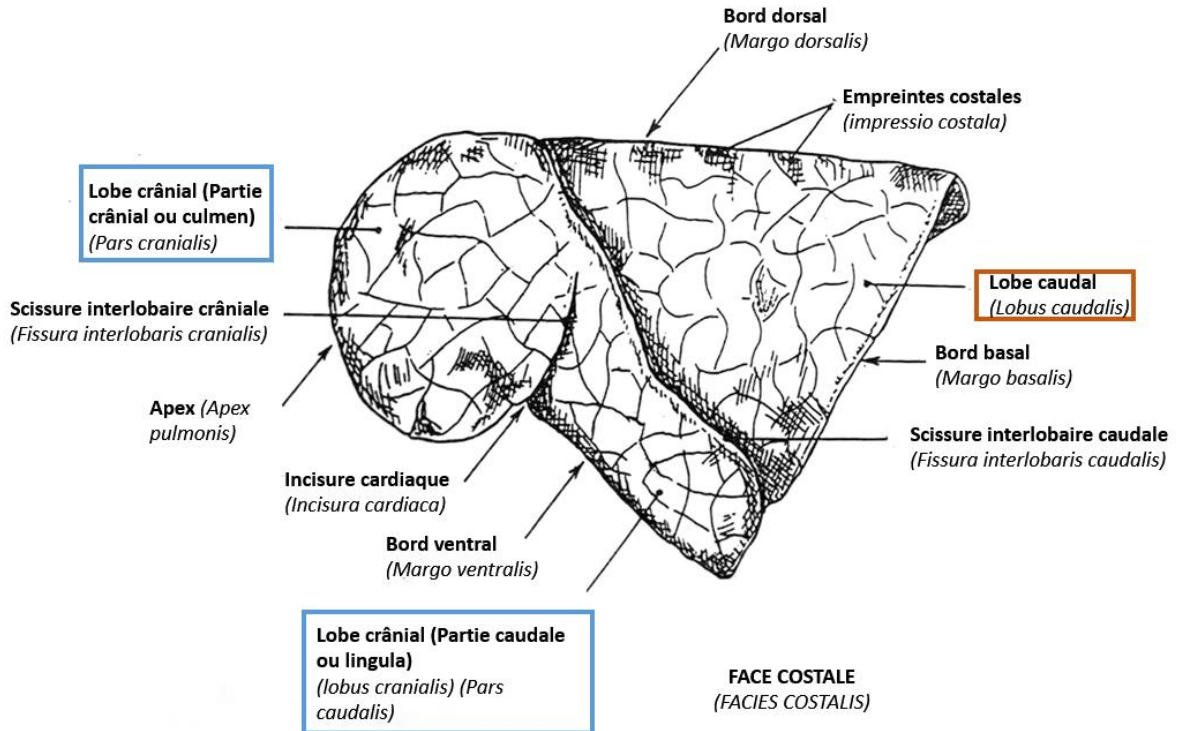


Figure 9: Schéma de la segmentation des poumons droit et gauche en différents lobes d'après l'atlas d'anatomie du Netter [41].

Chez les PNH, les deux poumons sont segmentés en 6 lobes séparés par des scissures [57] :

- Le **poumon gauche** (Cf. Planche anatomique de la figure 10 A), comme chez l'Homme est divisé en **deux lobes** crânial et caudal. La scissure interlobaire caudale gauche se trouve entre ces deux lobes.
- Le **poumon droit** (Cf. Planche anatomique de la figure 10 B), à l'inverse de l'Homme, est découpé en **quatre lobes** distincts : crânial, médian, caudal et accessoire. Chez l'Homme, le lobe accessoire est absent. La scissure interlobaire caudale sépare le lobe moyen du lobe caudal, et la scissure interlobaire crâniale, divise le lobe crânial du lobe moyen gauche.

A



B

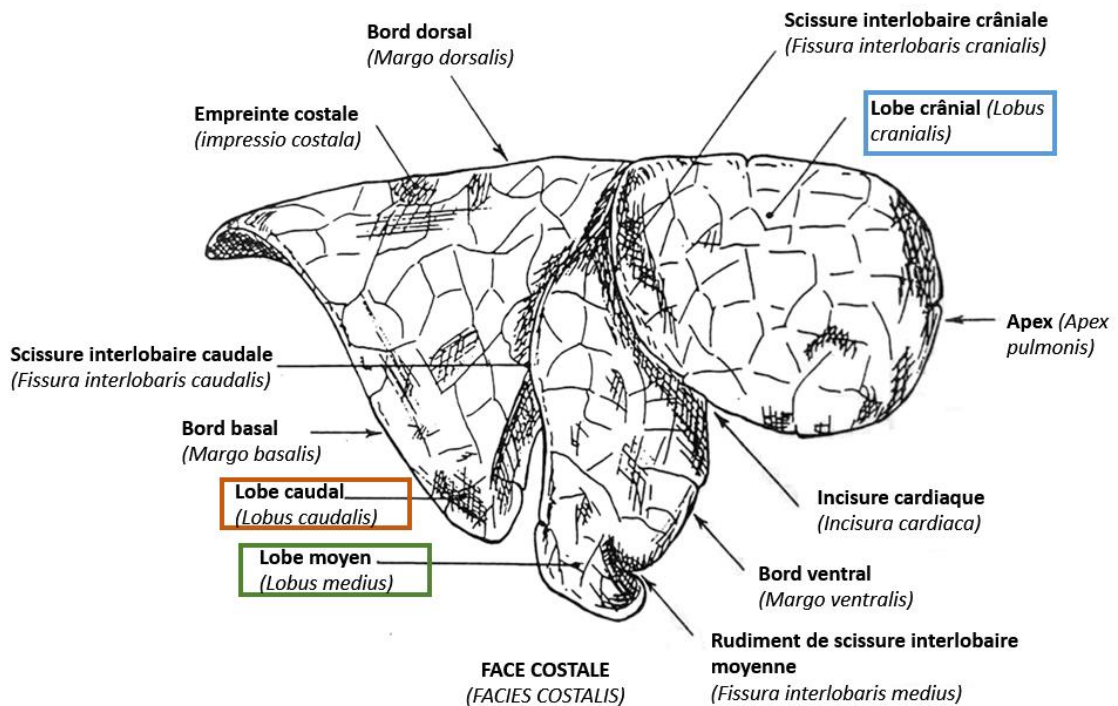


Figure 10 : Planche anatomique provenant de la thèse de Nathalie Prot [58] illustrant le lobe pulmonaire gauche (**10- A**) et le lobe pulmonaire droit (**10- B**) du macaque cynomolgus. L'illustration a été modifiée en encadrant les différents lobes.

Les VAI sont scindées artificiellement en deux régions la région **trachéo-bronchique** composée de la trachée, des bronches, bronchioles et des alvéoles qui constituent les poumons. Au niveau de ses alvéoles pulmonaires, **la région alvéolaire** des poumons est plus en profondeur et est le siège des échanges gazeux.

I.1.4.1.3 La trachée description anatomique et fonctionnalité chez l'Homme et le PNH

Il existe une proportionnalité entre la taille (masse corporelle) des mammifères et la taille de la trachée [59,60].

La trachée de l'Homme est un conduit aérien de forme cylindrique et cartilagineux de 10 à 12 cm de longueur et 2,5 cm de diamètre, constitué de 15 à 20 anneaux cartilagineux en forme de C qui s'empilent et s'unissent par du tissu conjonctif composé de fibres élastiques, et du tissu musculaire lui conférant sa rigidité.

Une partie de la trachée est située au niveau extrathoracique (ET) et l'autre partie au niveau intrathoracique (IT) [2,4,50] (Figure 11).

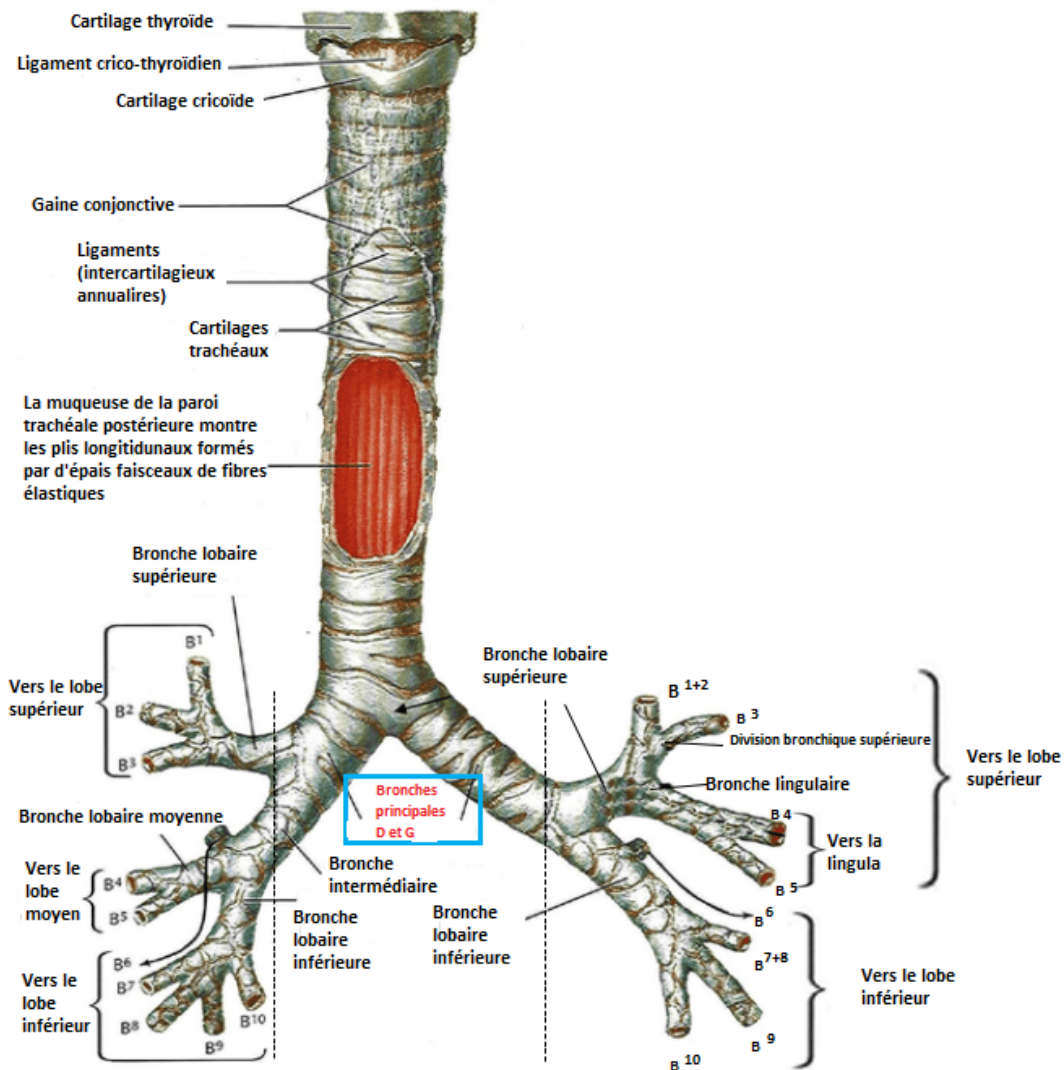


Figure 11 : Représentation schématique de la trachée humaine et les bronches principales droite (D) et gauche (G) (encadrées en bleu) modifiée d'après l'atlas d'anatomie du Netter [41].

Chez l'Homme, l'extrémité finale de la trachée au niveau IT se divise au niveau de la cinquième vertèbre thoracique, en carène (Cf. Figure 11), qui est une crête cartilagineuse interne. La carène est une zone anatomique associée au réflexe important de toux d'après Chang *et al.*, 1999 [61]. Ce réflexe de toux doit être évité lors de l'administration d'un aérosol car il entraîne un rétrécissement de la trachée [50,61]. Enfin, la trachée est aussi impliquée dans la filtration et le réchauffement de l'air inspiré.

Chez le PNH en particulier l'espèce macaque, la trachée à l'âge adulte a une longueur plus courte que celle de l'Homme, avec une taille d'environ 7 cm (du

premier anneau trachéal jusqu'à la bifurcation trachéale). La trachée du macaque est constituée d'un nombre plus important de succession d'anneaux trachéaux (27 à 28 anneaux) en comparaison à l'Homme. Les anneaux trachéaux chez le macaque, se terminent par une bifurcation trachéale à l'origine des bronches principale droite et gauche [58] (Figure 12).

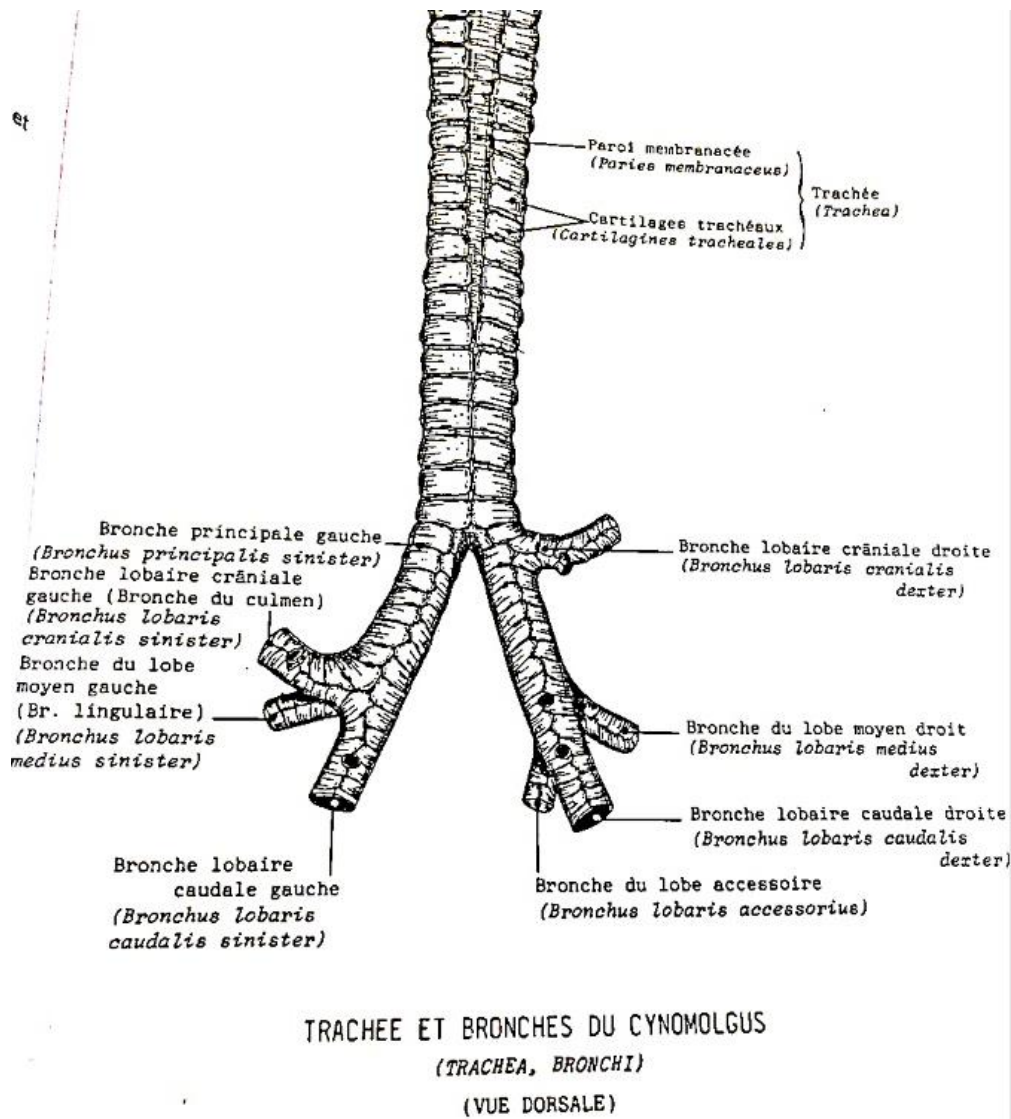


Figure 12: Représentation schématique de la trachée et des bronches du macaque *cynomolgus* d'après la thèse de Nathalie Prot [58].

I.1.4.1.4 Description de la zone bronchique chez l'Homme et le PNH

Chez l'humain, au niveau inférieur, la trachée (point de bifurcation) se divise en deux bronches pulmonaires primaires ou bronches souches. Les bronches principales ou bronches souches assurent la ventilation respectivement du poumon droit et du poumon gauche.

Des **bronches principales gauches** naissent trois bronches lobaires gauche :

- La bronche lobaire droite supérieure,
- La bronche lobaire droite intermédiaire,
- La bronche lobaire droite inférieure.

Des **bronches principales droites** naissent deux bronches lobaires droites :

- La bronche lobaire droite supérieure,
- La bronche lobaire droite inférieure.

L'extrémité inférieure de la trachée du macaque, se segmente aussi en différentes bronches comme représenté sur la figure 12. Comme illustré sur cette figure, contrairement à l'Homme, la **bronche principale droite** du macaque, se divise en quatre bronches lobaires droites qui sont :

- La bronche lobaire crâniale droite,
- La bronche du lobe moyen droit,
- La bronche lobaire caudale droite,
- La bronche du lobe accessoire.

La **bronche principale gauche** se divise aussi en trois bronches lobaires gauches comme chez l'Homme. Il s'agit de :

- La bronche lobaire crâniale,
- La bronche linguale,
- La bronche lobaire caudale gauche.

Les bronches lobaires se divisent en bronches segmentaires, qui correspondent à la systématisation du parenchyme pulmonaire, puis en bronches sous-segmentaires jusqu'aux bronchioles terminales, premières branches des voies respiratoires qui ne contiennent pas de cartilage et qui amènent l'air dans les alvéoles et en plus petites bronches nommées bronchioles puis en acinus au niveau de la bronchiole terminale.

On parle de générations pour ses ramifications des voies respiratoires inférieures. Cette parfaite segmentation géométrique en différentes générations est décrite en détail par

le modèle de Weibel présenté dans la figure 13. Ce modèle, permet de décrire la segmentation morphologique des voies aériennes inférieures humaines [62]. Le PNH possède aussi une structuration pulmonaire en segmentation avec des bronchioles structurées en plusieurs générations [63].

Weibel *et al.*, 1962 [64] divisent l'architecture des voies aériennes humaines en une zone conductive et une zone respiratoire (Cf. Figure 13) au niveau de la segmentation des bronches.

- **La zone conductive** commence au niveau des voies aériennes supérieures, se poursuit par la trachée et s'achève aux bronchioles terminales. La zone de conduction sert au passage de l'air. Elle a également un rôle de filtration de l'air inspiré. Cette zone ne participe pas aux échanges gazeux et constitue donc un espace mort anatomique du tractus respiratoire.
- **La zone respiratoire** à l'inverse de la zone conductive, qui s'en suit à partir de la 16^{ème} divisions (générations) bronchiques, permet les échanges gazeux qui ont lieu au niveau des alvéoles pulmonaires. Cette zone comprend les bronchioles respiratoires, les conduits et sacs alvéolaires [64,65]. Les bronchioles terminales et les espaces aériens adjacents forment les acini, qui sont considérés comme les unités fonctionnelles du poumon. La surface de la zone respiratoire est extensive et peut augmenter jusqu'aux alvéoles et permettre une ventilation collatérale. C'est le cas chez l'Homme et les PNH.

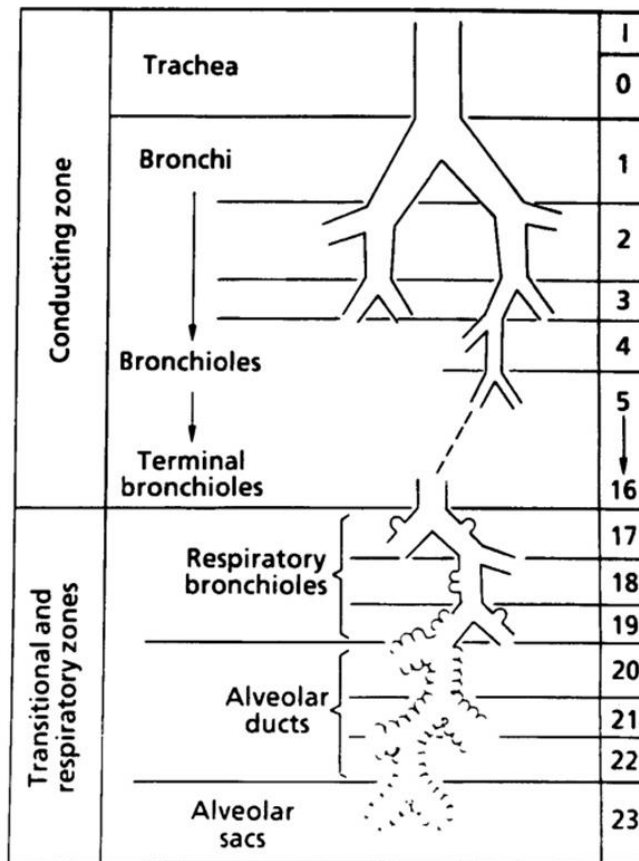


Figure 13 : Segmentation anatomique de l'arbre trachéo-bronchique d'après le modèle de Weibel [64]. Dans la partie supérieure de la figure, la zone de conduction est représentée et dans la partie inférieure, la zone respiratoire.

Cette compartimentation anatomique et fonctionnelle permet d'assurer les échanges gazeux entre l'air extérieur et le sang, en fournissant à l'organisme, l'oxygène (O_2), molécule nécessaire à la respiration cellulaire et en expulsant du dioxyde de carbone (CO_2) comme signature de la respiration des mammifères.

I.1.4.1.5 Description de la zone alvéolaire

L'acinus est lui-même constitué de bronchioles respiratoires et d'éléments fonctionnels (lieu des échanges gazeux) millimétriques : les alvéoles pulmonaires. Les alvéoles sont regroupées en sacs alvéolaires (Figure 14). La partie distale de la zone respiratoire constitue la région alvéolaire. C'est une zone de transition entre les bronchioles terminales et les alvéoles pulmonaires qui viennent s'ouvrir dans les bronchioles respiratoires. Les échanges gazeux avec le sang, se déroulent au niveau des alvéoles pulmonaires.

À l'inspiration au repos, une partie de l'air inhalée parvient aux alvéoles, l'autre partie n'intervient pas dans les échanges alvéolo-capillaires : c'est le volume mort.

L'organisation des petites voies aériennes et des zones d'échanges gazeux est critique en termes de dépôt de particules d'aérosols.

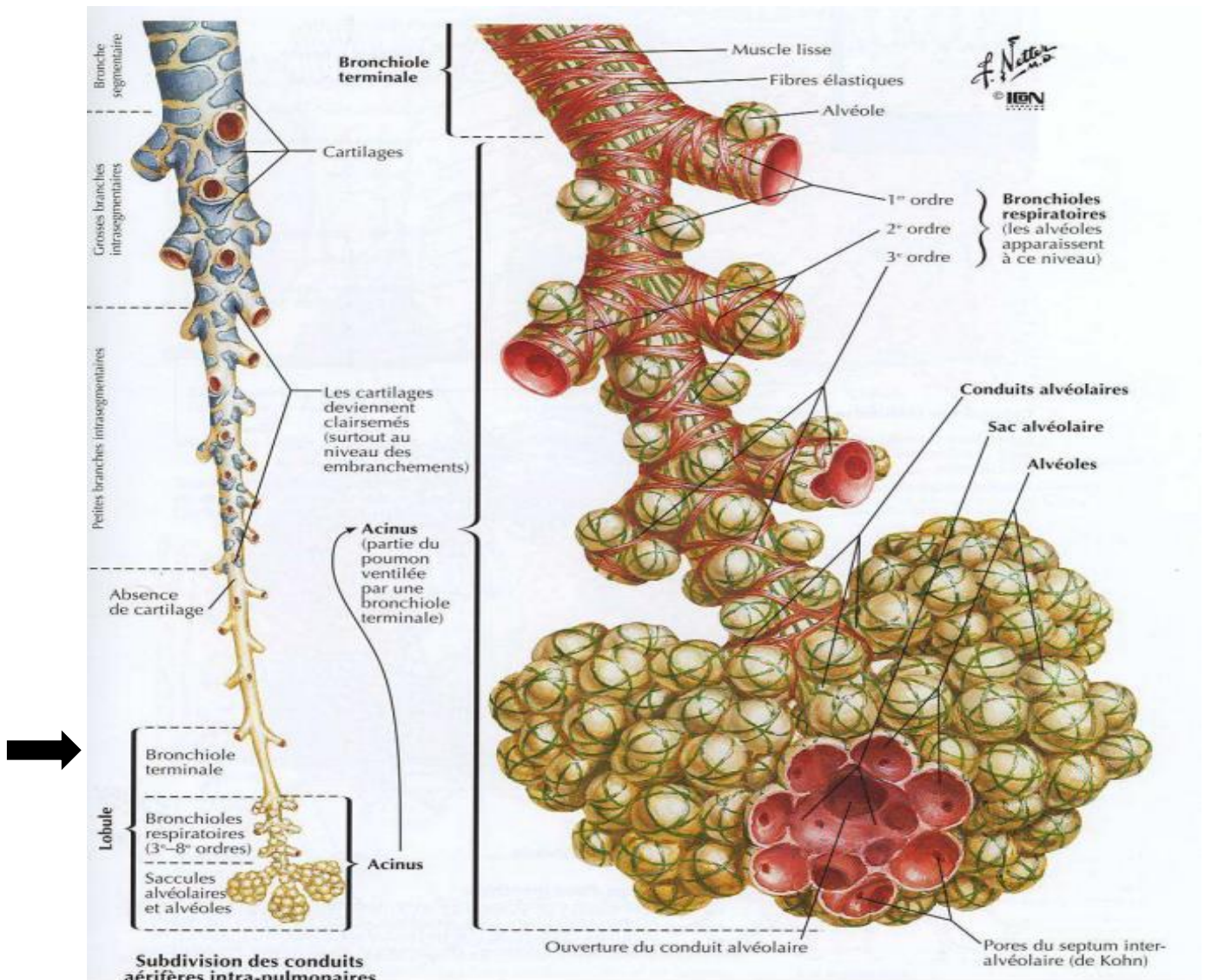


Figure 14 : Représentation détaillée de l'ultrastructure d'une bronchiole terminale et d'un acinus pulmonaire humain d'après l'atlas d'anatomie du Netter [41].

L'acinus pulmonaire représente l'unité d'échange gazeux dans laquelle des différences anatomiques et histologiques ont été observées entre espèces [16]. L'acinus pulmonaire humain est composé de bronchioles respiratoires, d'alvéoles et de conduits alvéolaires. Chez les rongeurs, les bronchioles respiratoires sont absentes ou rudimentaires rendant la comparaison avec l'Homme difficile.

I.1.5 Description microscopique des voies aériennes respiratoires inférieures

I.1.5.1 Épithélium trachéo-bronchique et rôle des cellules épithéliales

L'épithélium de la trachée et des principales voies respiratoires du macaque et de l'Homme est pseudostratifié. L'épithélium composant la surface du tractus trachéo-bronchique des voies respiratoires inférieures a des fonctions sécrétrices de mucus et de surfactant.

Chez l'Homme, cinq types de populations cellulaires, chacune ayant une propriété spécifique, tapissent la surface de la trachée, des bronches et des bronchioles. Ce sont les cellules muqueuses ou caliciformes, couramment appelées les Goblet cells en anglais (encadrées en rouge dans la figure 15), les cellules séreuses, les cellules de Clara [66] et les cellules non ciliées et les cellules ciliées.

- Les cellules caliciformes sécrètent les constituants du mucus cellulaire trachéo-bronchique [67]. Elles sont présentes dans la trachée au nombre de 6000 à 7000.
- Les cellules caliciformes, sont nombreuses dans les bronches segmentaires de l'Homme. Elles se raréfient progressivement et n'existent plus dans les dernières bronchioles.
- Les cellules séreuses et les cellules de Clara sont limitées aux bronchioles terminales où elles représentent 20 % de la population cellulaire [66]. Elles peuvent produire un surfactant bronchiolaire et ont une activité de détoxification.
- Les cellules ciliées et les cellules non ciliées sont des cellules basales ou séreuses (encadrées en violet dans la figure 15). Les cellules ciliées sont présentes dans toutes les voies respiratoires jusqu'aux bronchioles terminales. Dans cet épithélium trachéo-bronchique on retrouve aussi des glandes sous- muqueuses (nommées Secretory gland sur la figure 15). Elles sécrètent aussi le mucus trachéo-bronchique et peuvent être altérées en cas de pathologies respiratoires comme l'asthme et la bronchite chronique (augmentation de la sécrétion des glandes sous-muqueuses), impactant ainsi la trajectoire trachéo-bronchique des particules d'aérosols [68].

Reczyńska *et al.*, 2018 [32] démontrent que l'épithélium pulmonaire des singes et la composition protéique du mucus du macaque sont similaires à ceux des humains. Il peut exister des différences de structures cellulaires entre les espèces de macaque (singes rhésus et *cynomolgus* par exemple).

I.1.5.2 Épithélium alvéolaire et rôle des cellules épithéliales

L'épithélium alvéolaire a un rôle sécrétoire grâce aux cellules alvéolaires nommées pneumocytes de type I et II (encadrées en vert dans la figure 15). Les pneumocytes I recouvrent 90% de la surface alvéolaire totale. Les pneumocytes II synthétisent le surfactant qui est un mélange composé de 85 % de phospholipides, de 5% de lipides et de 10 % de protéines qui tapissent la paroi des alvéoles pulmonaire. La composition du surfactant et son pouvoir de tensioactif permettent d'éviter le collapsus des alvéoles pulmonaires à la fin de chaque expiration en réduisant leur tension de surface [69,70] [3]. Il a donc un rôle de maintien d'une respiration normale. En cas d'altération de l'épithélium alvéolaire, les pneumocytes II peuvent se différencier en pneumocytes I.

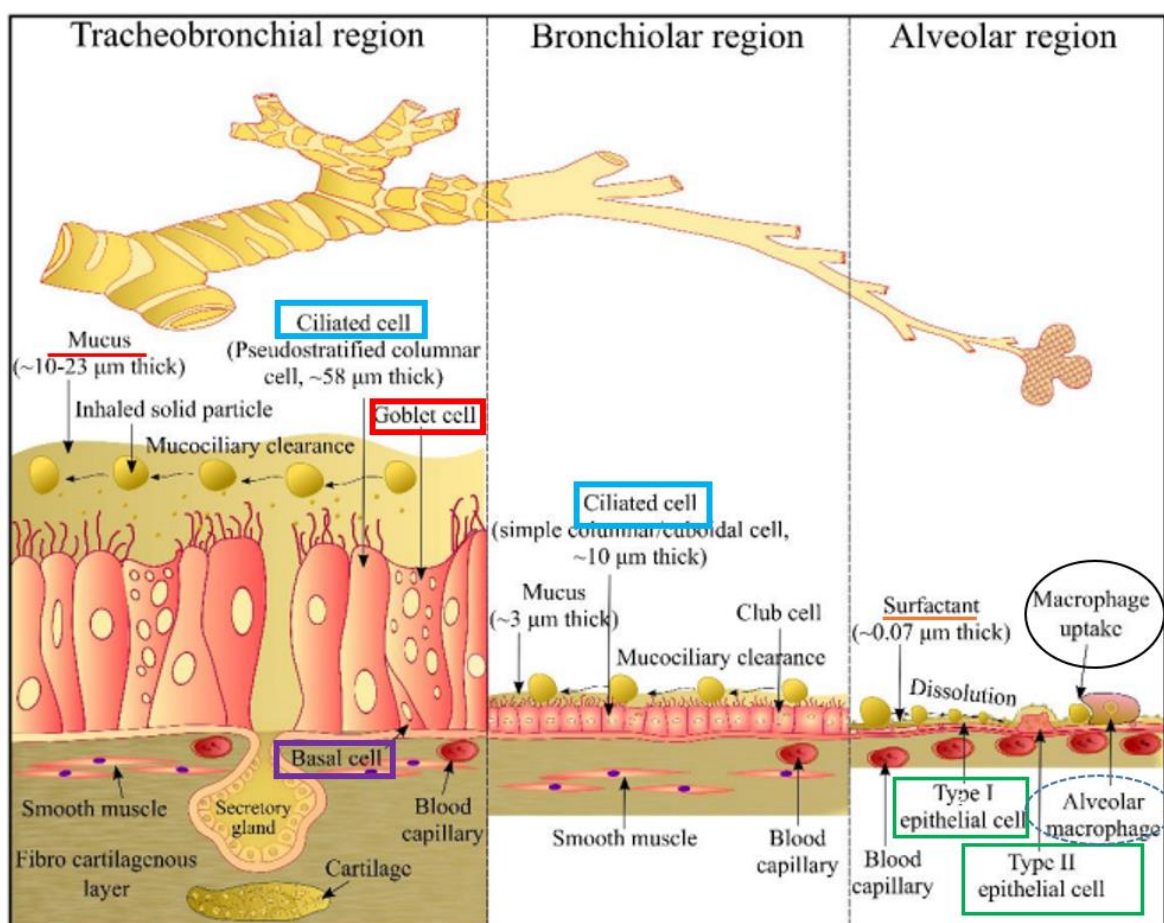


Figure 15 : Représentation schématique de l'histologie de la région trachéo-bronchique et de la région alvéolaire chez l'humain, après exposition à une particule inhalée.

Schéma modifié d'après Eedara et al., 2022 [71].

I.1.6 Les cellules immunitaires du système respiratoire et leurs fonctions de surveillance et de défense du poumon chez l'Homme

Les cellules immunocompétentes de l'appareil respiratoires jouent un rôle important dans la défense du système respiratoire et de l'organisme en général. Ici on se focalisera sur les **macrophages** et les **cellules dendritiques** de la muqueuse respiratoire qui ont un rôle clé de défense du tractus respiratoire. On retrouve aussi dans cette muqueuse respiratoire des cellules à fonction immunitaire comme les éosinophiles et les lymphocytes.

- **Les macrophages**

Chez l'Homme adulte, la fonction macrophagique du poumon est précisément assurée par les macrophages alvéolaires (cercle en pointillée bleue sur la figure 15). Les macrophages sont issus de la différenciation des monocytes pénétrant le poumon. Ils constituent un groupe hétérogène de cellules immunitaires multifonctionnelles. Ces cellules jouent un rôle dans l'immunité innée et adaptative, dans l'internalisation et le mécanisme de phagocytose des corps étrangers (fonction prépondérante des macrophages alvéolaires) [72]. Ils jouent aussi un rôle dans la présentation des antigènes au système immunitaire cellulaire et au système immunitaire humorale [73]. En réalisant un lavage broncho-alvéolaire (LBA) on retrouve dans le liquide de lavage 5 % de lymphocytes et 95 % de macrophages alvéolaires en termes de densité cellulaire.

Les études démontrent que les macrophages alvéolaires ont un rôle primordial de défense face aux infections respiratoires bactériennes, virales ou fongiques [73-77]. Ce rôle peut être altéré dans les infections respiratoires ou en cas de perturbations par des particules inhalées toxiques comme les polluants atmosphériques ou les particules de la fumée de cigarettes [78,79].

- **Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques ont une différenciation dans la sous-muqueuse des voies respiratoires (trachée, bronches, nasopharynx). Elles ont un précurseur commun avec les macrophages alvéolaires. Contrairement aux macrophages alvéolaires elles ont de faibles fonctions de phagocytose mais plutôt un bon rôle de cellules présentatrices d'antigènes (Ag) [73,80]. En fixant et présentant l'Ag, elles entraînent l'activation des lymphocytes T puis la réponse humorale médiée par les lymphocytes B, suite à l'inhalation de particules d'aérosols.

En somme le système respiratoire est doté de moyens de défense de différentes natures. Certains moyens sont de nature mécanique (les mouvements ciliaires, le mucus et le surfactant), d'autres sont immunologiques (les réponses immunitaires médiées par les cellules immunitaires).

I.1.7 Les paramètres ventilatoires et les mécanismes physiologiques de la respiration

I.1.7.1 Généralités et physiologie de la respiration chez les mammifères

Chez les mammifères, la respiration est permise grâce à quatre mécanismes: la ventilation pulmonaire, l'échange d'oxygène et de dioxyde de carbone à travers les alvéoles, le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone et, enfin, les systèmes de régulation neurologiques [20].

Le mouvement inspiratoire permet la pénétration de l'air dans les poumons. L'air inhalé transite dans les voies aériennes conductrices supérieures (nez et bouches) jusqu'aux alvéoles pulmonaires.

La respiration implique la contraction ou le relâchement de différents muscles (figure 16). A l'inspiration, les muscles se contractent et à l'expiration ils se relâchent. Le diaphragme est le principal muscle inspiratoire. Sa contraction entraîne une augmentation de la pression abdominale et de la profondeur et l'élargissement de la cage thoracique.

De plus, les mouvements et la position de la cage thoracique ont aussi un rôle dans ces mécanismes respiratoires [81,82]. En effet, le volume de gaz inhalé lors de la respiration est attribuable à 25 % au mouvement de la cage thoracique et à 75 % au mouvement du diaphragme [81]. L'inclinaison des côtes a également un rôle dans les mouvements respiratoires. En effet, les côtes inclinées vers le bas permettent une augmentation du volume thoracique. Lorsque le diaphragme descend, il entraîne une augmentation du volume courant ou volume minute [81].

Chez l'Homme, la respiration est donc un phénomène séquentiel, cyclique et dynamique impliquant différents muscles principaux et accessoires spécifiques à l'inspiration et à l'expiration.

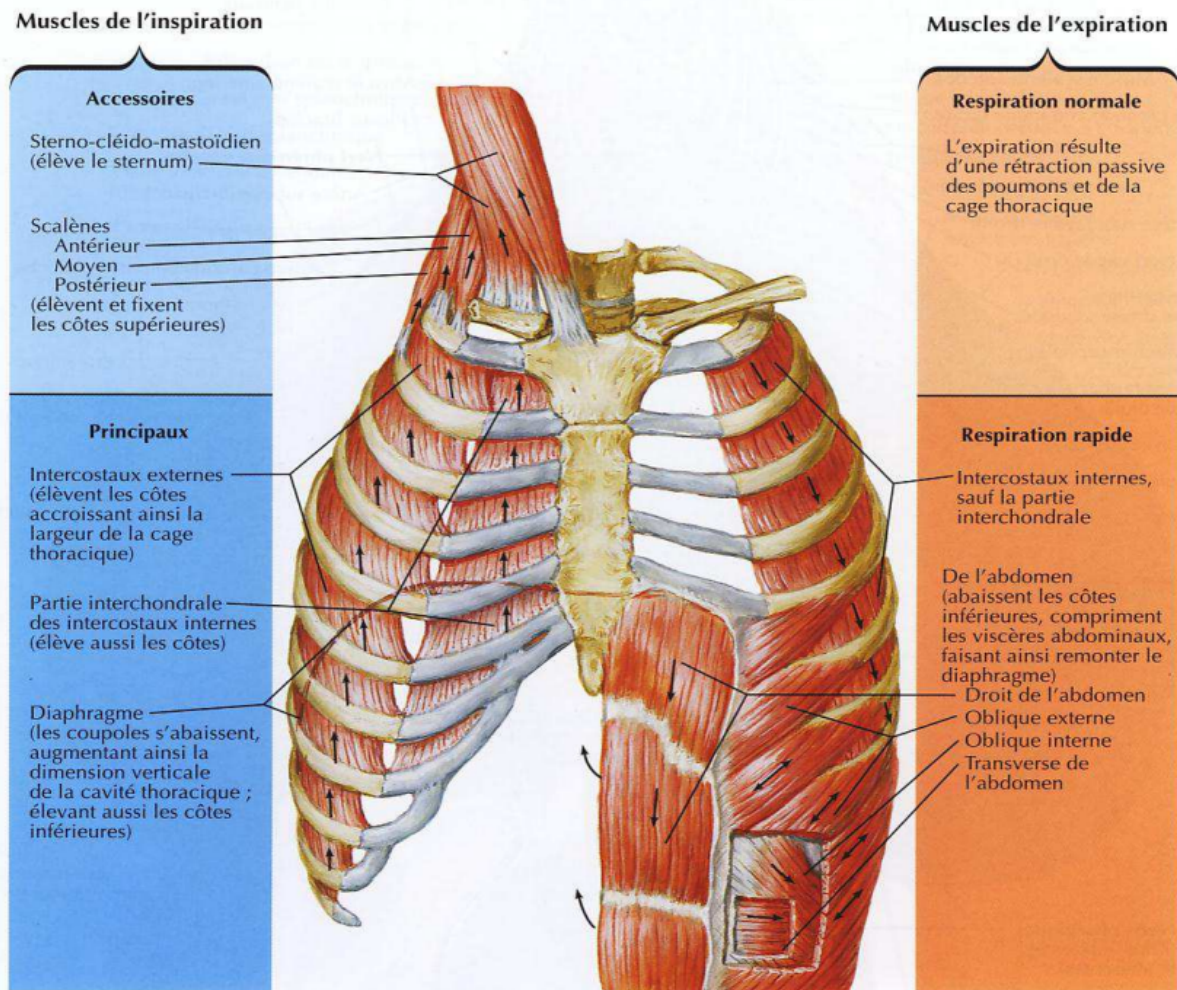


Figure 16: Représentation schématique des différents muscles impliqués dans le mécanisme d'inspiration et d'expiration chez l'Homme, d'après l'atlas anatomique du Netter [41].

Le schéma illustre l'implication des muscles inspiratoires, des muscles expiratoires, des muscles principaux et des muscles accessoires. Le sens du mouvement des muscles durant ces deux phénomènes est illustré par les flèches noires. Lors de l'inspiration chez l'Homme, il y a 6 étapes cycliques qui se produisent :

- Contraction des muscles inspiratoires, le diaphragme s'abaisse vers l'abdomen et la cage thoracique s'élève,
- Expansion et augmentation du volume de la cage thoracique,
- Augmentation des volumes intra pulmonaire,
- Chute de la pression intra pulmonaire jusqu'à -1 mmHg (cette dépression permet la circulation de l'air à l'intérieur des sacs alvéolaires) suite à l'augmentation du volume intra pulmonaire,
- Entrée d'air par la cavité bucco-nasale dans les poumons,
- Début de l'expiration [3,20,83] [3,83].

À l'expiration, les muscles contractés lors de l'inspiration, se relâchent, dans un mouvement inverse.

I.1.7.2 Impact des caractéristiques ventilatoires influençant le dépôt des aérosols: comparaison entre l'Homme et les espèces animales utilisées dans l'étude du dépôt des aérosols

Le choix du bon modèle animal pour l'étude du dépôt des aérosols repose sur les similitudes anatomiques comme le montre le chapitre précédent mais également sur les paramètres de physiologie respiratoire. A ce titre, Guillon *et al.*, 2018 [84] ont comparé le volume courant et la fréquence respiratoire des différentes espèces animales à ceux de l'Homme.

La figure 17, démontre que le volume courant (Tidal volume) augmente avec le poids de l'espèce de mammifères et inversement pour la fréquence respiratoire qui diminue avec le poids [84]. Ces deux paramètres sont importants pour l'extrapolation des résultats non cliniques à l'Homme. Ce schéma de la figure 17 corrobore ce qui est dit ci-dessus à cette limite près que certains animaux de plus petites tailles (cochons et chiens Beagle) sont proches de l'Homme aussi bien pour la fréquence respiratoire que pour le volume courant (Tidal volume).

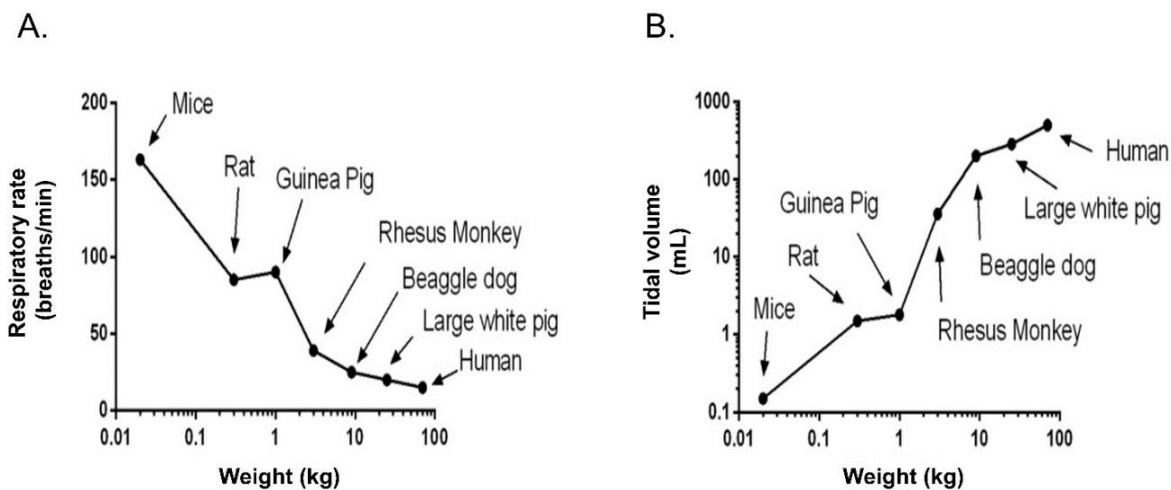


Figure 17 : Comparaison des fréquences respiratoires (A) et des volumes courants (B) de différentes espèces de mammifères et de l'Homme, d'après Guillon *et al.*, 2018 [85].

I.1.8 Régulation de la ventilation chez l'Homme

En fonction des besoins des tissus de l'organisme, la ventilation pulmonaire varie. La régulation de la ventilation est médiée par des formations nerveuses situées au niveau du tronc cérébral, il s'agit des centres respiratoires bulbaires.

I.1.8.1 Contrôle central des centres respiratoires impliqués dans l'inspiration et l'expiration

Comme le décrit la figure qui suit (Figure 18) d'après Raux *et al.*, 2007, [86], la commande respiratoire naît dans le tronc cérébral.

Les centres respiratoires du tronc cérébral sont constitués de fibres nerveuses regroupées en différents amas neuronaux formant des centres nerveux inspiratoires et expiratoires. Ils sont situés au niveau de la face ventrale du pont et du bulbe rachidien du tronc cérébral.

Ces centres commandent et régulent les mouvements musculaires respiratoires d'inspiration et d'expiration. A l'inspiration, les centres respiratoires du tronc cérébral sont stimulés (activation), entraînant la contraction des motoneurones des muscles inspiratoires. A l'expiration la stimulation des neurones inspiratoires s'interrompt, entraînant la stimulation des neurones expiratoires et la contraction des muscles expiratoires. Les muscles inspiratoires (diaphragme, intercostaux, scalènes, sternocléidomastoidiens, abdominaux) sont nommés « pompes » dans la figure numéro 18.

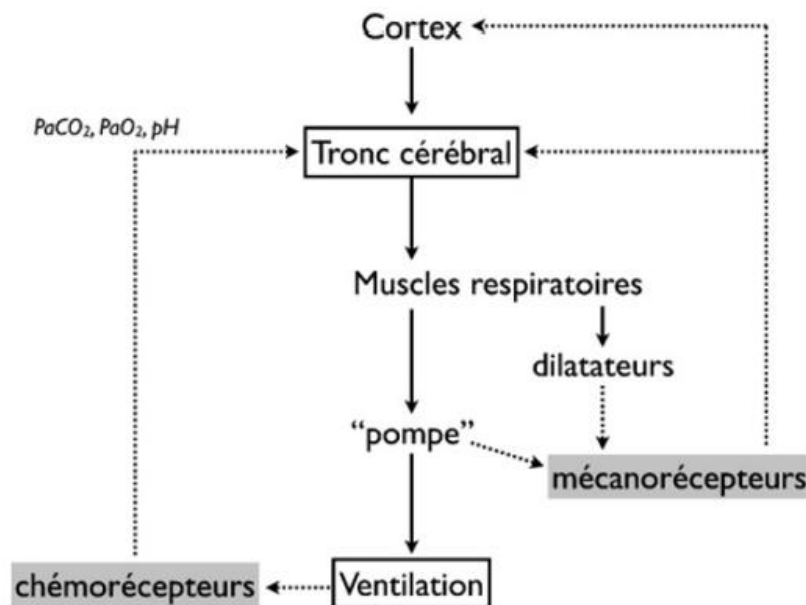


Figure 18 : Schéma du contrôle neurologique de la respiration, issu de l'article de Raux *et al.*, 2007 [86].

Les centres nerveux ont pour autre fonction de contrôler les réflexes respiratoires (étternuements, inspiration forcée, toux) et de moduler la ventilation en fonction des informations chimiques ou mécaniques qui leur sont transmises.

I.1.8.2 Contrôle de l'activité des centres respiratoires par les chémorécepteurs et les mécanorécepteurs

Les centres respiratoires sont eux-mêmes sous le contrôle de chémorécepteurs et de mécanorécepteurs (Cf. Figure 18 et 19) dont ils reçoivent des afférences.

Les afférences métaboliques (ou chimiques) et neuronales naissent au niveau des neurones du tronc cérébral provenant des chémorécepteurs centraux et périphériques (Cf. Figures 19 et 20). Les afférences métaboliques sont sensibles aux variations de pH, de la PaO₂ (Pression partielle de l'Oxygène) et de Pa CO₂ (pression partielle en dioxyde de carbone), du Liquide Cérébrospinal intracérébrale ([86]. Toute augmentation du CO₂, correspondant à une augmentation des ions H⁺ et donc à une baisse du pH, va entraîner de la part des récepteurs centraux une commande vers les centres respiratoires afin d'augmenter la ventilation et d'éliminer le CO₂ en excès et de rétablir le pH.

Les chémorécepteurs centraux sont localisés dans le tronc cérébral et les chémorécepteurs périphériques sont situés au niveau de l'aorte et de la carotide (Cf. Figure 20) [87]. Les chémorécepteurs stimulent les neurones inspiratoires du tronc cérébral qui entraînent la contraction des muscles inspiratoires.

Les centres respiratoires sont également sous le contrôle des afférences respiratoires provenant de mécanorécepteurs situés au niveau pulmonaire (parenchyme pulmonaire), au niveau des muscles respiratoires et dans les bronches. Les mécanorécepteurs ont par exemple un rôle d'adaptation de la ventilation à l'exercice ou de renseignement sur la géométrie du thorax avant un mouvement respiratoire [86].

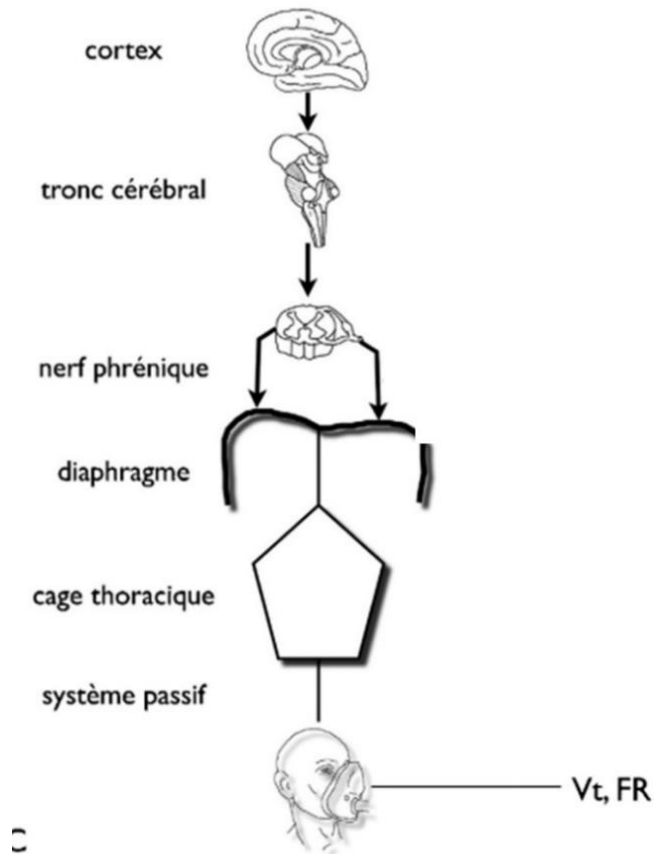


Figure 19 : Schéma des différents acteurs de la commande respiratoire d'après Raux et al., 2007 [86]. V_t et FR représentent le volume courant et la fréquence respiratoire.

La régulation de la commande des muscles respiratoires, dite commande ventilatoire, repose sur la modulation du rythme respiratoire (fréquence respiratoire) et la profondeur de la respiration (volume courant).

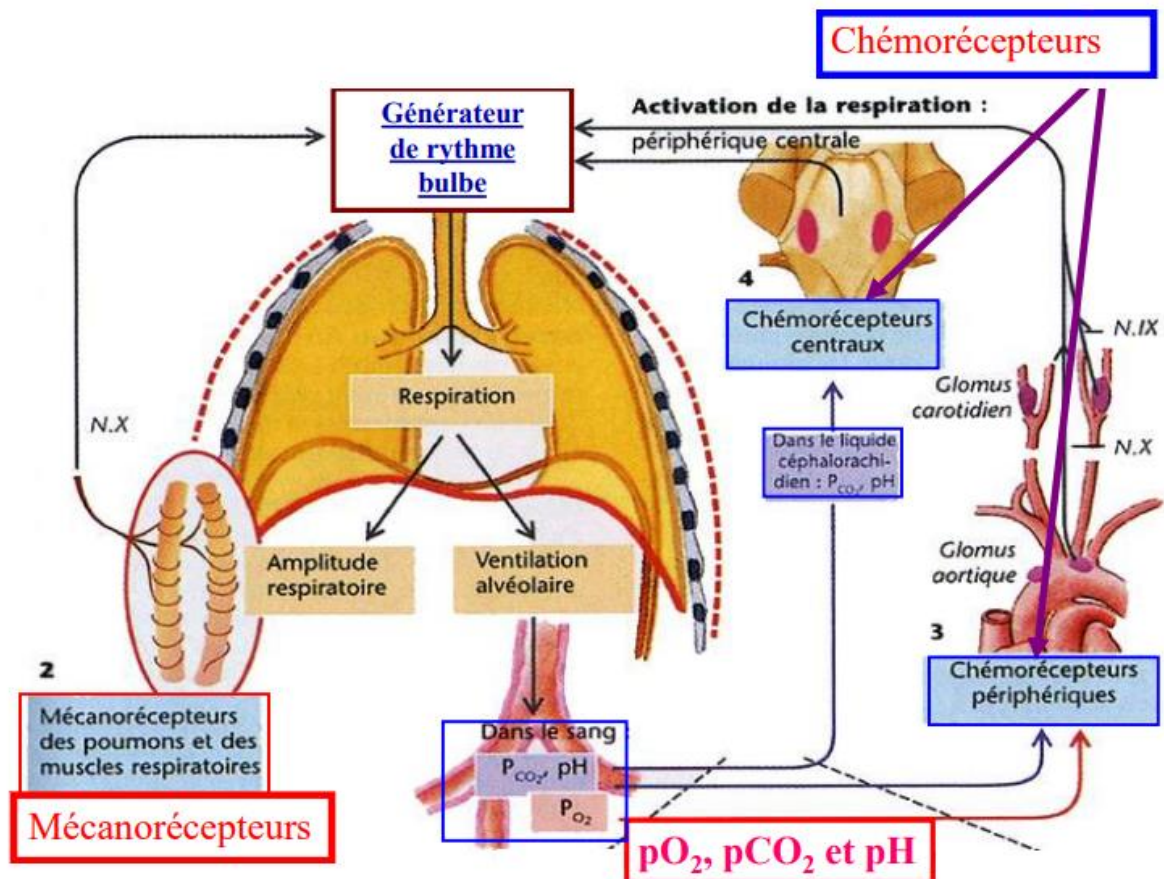


Figure 20: Représentation schématique générale de la régulation de la ventilation pulmonaire schéma modifié d'après Bensouag., 2020 [87].

Les centres respiratoires coordonnent les informations neuronales et chimiques (P_{aCO_2} , pO_2) reçues par les récepteurs et envoient des impulsions aux muscles respiratoires qui sont des effecteurs.

I.1.8.3 Perturbations de l'homéostasie de la commande respiratoire

Différentes situations peuvent perturber l'homéostasie de la commande respiratoire. C'est le cas par exemple, des médicaments sédatifs qui dépriment les centres respiratoires de la commande ventilatoire. Les anesthésies généraux peuvent aussi réduire l'activité corticale et entraîner par conséquent une inhibition globale de la commande transmise aux muscles respiratoires [88,89] (Cf. mécanisme de régulation dans les figures 18 et 20).

Certaines pathologies peuvent aussi perturber l'homéostasie de la commande respiratoire. C'est le cas des pathologies nécessitant une assistance ventilatoire. Ces pathologies peuvent augmenter le fonctionnement de la commande ventilatoire [90]. L'augmentation de la fréquence respiratoire et du volume courant entraîne respectivement une dyspnée (difficulté à respirer) avec un phénomène d'hyperventilation.

La commande ventilatoire peut à l'inverse être diminuée également en cas de pathologies neurologiques centrales résultant d'un défaut de transmission du cortex aux muscles respiratoires.

I.1.9 Étude de l'exploration fonctionnelle respiratoire

Les volumes respiratoires sont importants pour déterminer l'état des fonctions respiratoires.

Ils sont mesurés au repos grâce à ce que l'on appelle l'exploration fonctionnelle respiratoire (EFR) qui se fait par spirométrie ou la mesure des volumes respiratoires.

La spirométrie permet de mesurer les variations d'air pendant une ventilation calme ou forcée (inspiration calme suivie d'une expiration complète) au cours du temps. L'effort doit être reproductible. Chez l'Homme, il existe différents spiromètres (appareil dans lequel le patient souffle à travers un conduit) comme ceux à ultrasons ou encore les pneumotachographes.

L'évaluation de la fonction respiratoire est utile également pour diagnostiquer et évaluer une maladie respiratoire ou pour évaluer l'efficacité d'un traitement [30]. Par exemple, les volumes et débits mesurés, par les spiromètres permettent de déterminer si la capacité respiratoire d'un patient est en baisse (cas de l'asthme ou de la BPCO) ou normal. En effet, dans le cas de l'asthme ou de la Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), le rapport ou coefficient de Tiffeneau est mesuré par un spiromètre pour évaluer la capacité respiratoire. Ce rapport est exprimé en pourcentage. Il s'agit du Volume expiratoire maximum par seconde (VEMS) sur la capacité vitale forcée (CVF), le tout multiplié par 100 ($VEMS/CVF \times 100$).

Le VEMS correspond au volume expiré pendant la première seconde d'une expiration forcée. La CVF est la quantité d'air expirée lors d'un exercice respiratoire réalisée le plus vite et le plus fort possible à partir d'une inspiration maximale. A l'aide d'une courbe comme illustrée dans la figure 21, les paramètres respiratoires mesurés par le spiromètre, sont déterminés sur une courbe volume-temps.

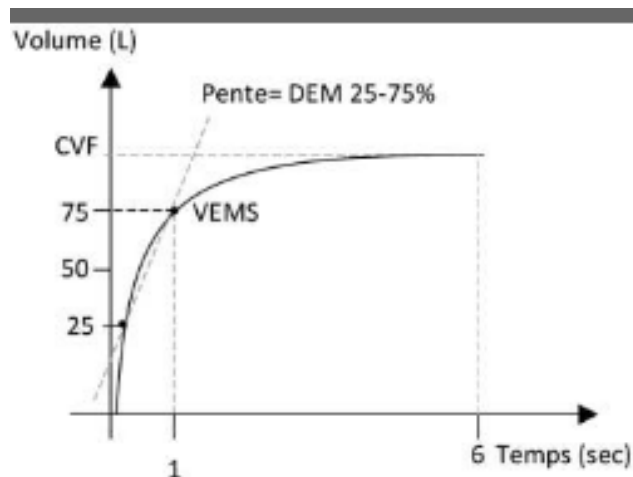


Figure 21 : Courbe volume-temps après une analyse des volumes respiratoires à l'aide d'un spiromètre.

Le plateau de la courbe à la fin du tracé, illustre un temps d'expiration de 6 secondes au total. En cas de pathologie obstructive comme l'asthme ou la BPCO, la courbe va jusqu'à la fin de l'expiration (6 secondes) et est inférieure à celle présentée ici (VEMS et CVF sont diminués).

La pléthysmographie est également une technique de mesure des volumes et des capacités respiratoires. Avec cette technique, les variations de pressions générées par la respiration du patient sont enregistrées [3].

Chez un individu sain, les paramètres ventilatoires (Cf. Figure 22) sont liés aux besoins métaboliques du corps humain, en fonction de l'âge, du sexe [91], de l'altitude, de l'ethnie [92,93] et des comorbidités.

Chez un Homme adulte sain de 75 kg de poids corporel, comme le montre les valeurs du tableau N° 1 et du graphique de la figure 22 qui suivent, issus de la thèse de Montigaud., 2020 [3] on peut retenir différentes valeurs et définitions des volumes, des capacités et des fréquences pulmonaires, mesurées durant un effort inspiratoire ou expiratoire maximal :

- Le débit ventilatoire (Q) exprimé en L par minute au repos est le produit du volume courant (VC) par la fréquence respiratoire (Fe),

$$\boxed{Q = VC \times Fe}$$

- Le volume servant à apporter l'O₂ est le volume de la ventilation alvéolaire (VA), seul efficace dans les échanges alvéolo-capillaires.

$$\boxed{VA = (VC - VD) \times Fe}$$

VA=Ventilation alvéolaire. Le volume servant à apporter l'O₂ nécessaire aux échanges est le volume de la ventilation alvéolaire (VA), seul efficace dans les échanges alvéolo-capillaires.

VC=volume courant ou Tidal volume représente l'amplitude de la respiration

VD= Volume mort ou Espace mort

Fe = Il s'agit du nombre de cycles par minute. Elle mesure la rapidité de la respiration.

Les changements des modes respiratoires sont à prendre en compte dans l'étude du dépôt des aérosols. En effet, les études [94,95] montrent que dans les débits de respiration élevés (hyperventilation), associées à une respiration rapide, les aérosols sont plus susceptibles de se déposer dans les VAS et les bronches principales du fait du mécanisme de dépôt par turbulence et impaction. A l'inverse, dans le cas des modes respiratoires plus longs, les aérosols se déposent davantage dans le poumon.

Tableau 1 : Définition des volumes et des capacités pulmonaires chez un Homme adulte sain de 75kg [3].

		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	$CFR = VRE + VR$

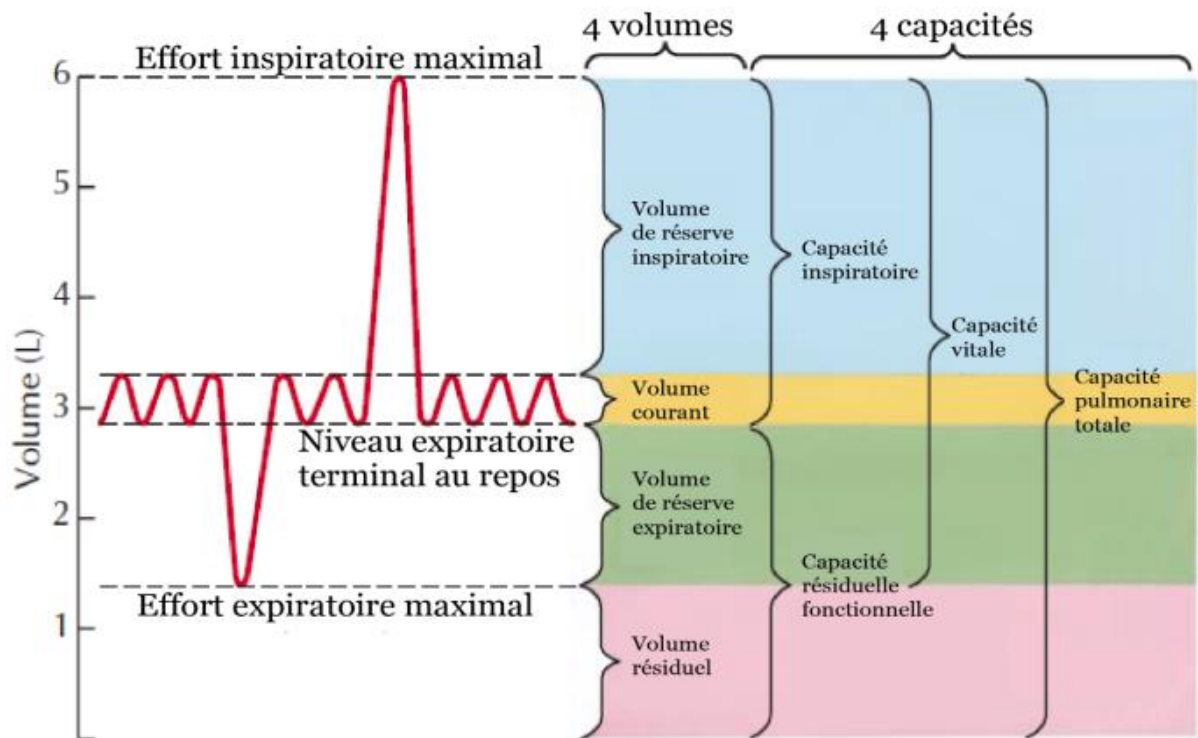


Figure 22 : Courbe des volumes et des capacités respiratoires chez l'Homme, d'après la thèse du Dr Montigaud [3].

I.2 Les aérosols

I.2.1 Histoire des aérosols : généralités

Les aérosols constituent une question importante depuis des siècles, notamment parce qu'ils pénètrent dans l'organisme par les voies respiratoires et parce que tous les humains y sont exposés en permanence. La première fois qu'il a été mentionné des aérosols dans l'histoire de l'humanité, remonte à l'Égypte antique sous le règne de Nebpéhtyrê Ahmôsis I^{er} (1550-1525 AJC). Les égyptiens, ont décrit l'utilisation des aérosols pour embaumer les habitations ou soigner des pathologies respiratoires en utilisant des inhalateurs (Cf. Figure 23).

Par la suite, les outils d'administration thérapeutiques des aérosols se sont développés. Un exemple de ces systèmes d'administration d'aérosols datant du 17^{ème} et du 18^{ème} siècles est l'inhalateur aux vapeurs d'opium de John Mudge's, (Cf. Photo B de la figure 23) ou encore le pulvérisateur « Sales-Girons » datant des années 1858 (Cf. Figure 25).

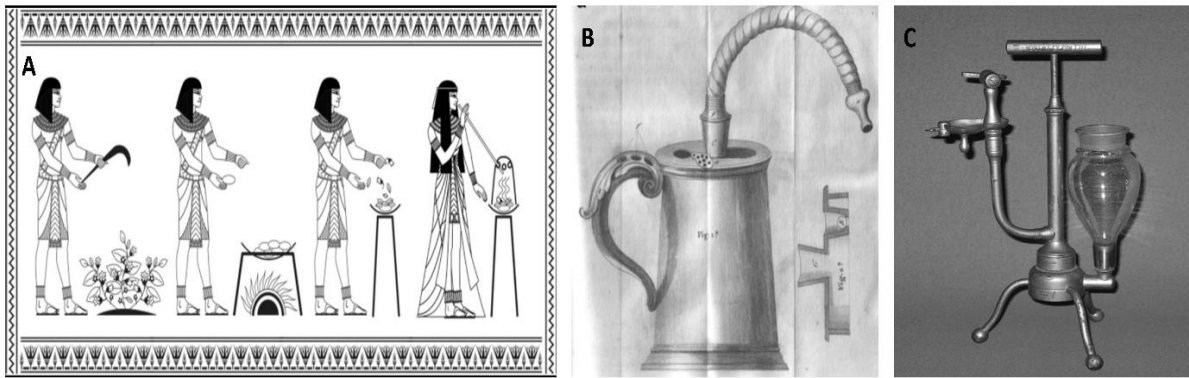


Figure 23 : Chronologie et histoire des aérosols thérapeutiques, de l'Égypte ancienne (premières références, datant de 1555 avant JC, photo A), à 1858 : Inhalateur à vapeur d'opium John Mudge (1778, photo B) ; Pulvérisateur Sales-Girons (1858, photo C). Images provenant de l'article de Stein et al., 2017 [96].

L'usage de la voie inhalée comme voie d'administration de substances (vapeurs inhalées), a été décrite dans les médecines antiques et traditionnelles il y a environ 3500 ans. Par exemple, la médecine ayurvédique décrit l'utilisation des aérosols dans un but thérapeutique [97]. Des plantes de belladone, (*Atropa belladonna*) étaient inhalées dans le traitement des maux de gorge et des angines [98].

Deux siècles après JC, l'illustre médecin grec, Galien, décrit également l'aérosolthérapie pour le traitement des pathologies respiratoires.

L'utilisation des premiers nébuliseurs, capables de transformer et/ou atomiser un liquide en gouttelettes ou en vapeurs, a été développée en 1820 par Schneider et Walz [99]. Ces nébuliseurs ancestraux étaient nommés « pulvérisateurs de liquides ».

Leur conception consiste en un récipient contenant le liquide à pulvériser, et un système de pression générant la vapeur des aérosols. O'Callagan *et al.*, 2001 [100] attestent que jusqu'au début du 19^{ème} siècle l'aérosolthérapie reposait sur l'utilisation de ces 'appareils à vapeurs. Ces appareils comme l'appareil de Lister (Steam Lister) (Figure 24), professeur anglais de médecine, pouvaient également être utilisés pour générer des vapeurs permettant de stériliser l'air d'une pièce comme des salles d'opération.



Figure 24 : Appareil à vapeurs d'aérosols inventé par le Pr Lister.

L'exemple du nébuliseur portable Sales Giron [101] (Figure 25) utilisé pour l'inhalation de gouttelettes de liquide dans des pathologies telles que l'asthme, la tuberculose ou les laryngites peut illustrer ces nébuliseurs ancestraux.



Figure 25 : Nébuliseur portable Sales Giron (1858) utilisé pour l'inhalation de gouttelettes de liquide dans des pathologies telles que l'asthme, la tuberculose ou les laryngites. Photo d'après Bisgaard et al., 2001 [101].

I.2.2 Définitions

I.2.2.1 Définition d'un aérosol

Un aérosol est une suspension de particules liquides (couramment appelés gouttelettes) ou solides (couramment appelés particules) mues par un vecteur gazeux [5,102]. Les aérosols d'agents infectieux ou contenant des agents biologiques dérivés d'organismes vivants (toxines) peuvent également être appelés « bioaérosols » [6].

La taille géométrique des particules constituant l'aérosol, peut varier de la taille nanométrique à quelques centaines de micromètres. Cette échelle de taille fait intervenir différents phénomènes physiques. Une particule avec un diamètre inférieur à 5 nm aura un comportement thermodynamique, alors qu'une particule supérieure à 0.5 μm aura un comportement aérodynamique (les particules comprises entre 5 nm et 0.5 μm ont un comportement encore mal connu).

Les aérosols médicamenteux produits par les générateurs actuels ont un diamètre de l'ordre du micromètre correspondant au domaine continu du comportement aérodynamique. Pour caractériser la taille des particules quels que soient leur poids, leur forme et leur densité, on définit le diamètre aérodynamique équivalent (dae). Il est défini comme le diamètre d'une sphère ayant la même vitesse de chute que la particule dans l'air et une densité égale à 1g/cm^3 . Ce diamètre est le seul paramètre de dimension des particules à considérer dans l'étude de leur mouvement dans le fluide porteur en régime de Stokes et pour un dae supérieur à 0,5 μm .

Le régime de Stokes correspond à un régime où la force de traînée exercée par la particule sur le fluide porteur est proportionnelle à la vitesse relative de la particule. Cette condition est vérifiée lorsque le nombre de Reynolds de la particule (Re_p), défini comme le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité, est inférieur à 0,1.

Les aérosols sont le plus souvent polydispersés, c'est-à-dire constitués de particules de tailles différentes. Pour les particules d'aérosols nébulisés, la taille varie entre 0,1 μm à 10 μm . La distribution granulométrique décrit la distribution des particules en fonction de leur diamètre. Elle s'exprime le plus généralement en nombre de particules ou en masse. Dans le cadre des aérosols ayant un effet sur la santé, c'est la quantité de médicaments ou de pathogènes contenue dans les particules qui est le paramètre essentiel et directement responsable de l'effet.

Pour interpréter statistiquement cette distribution en taille des particules on utilise alors le Diamètre Aérodynamique Médian en Masse (DAMM ou MMAD en anglais). Le MMAD est le diamètre qui divise la masse de l'aérosol en deux moitiés également réparties de part et d'autre du MMAD (Figure 26).

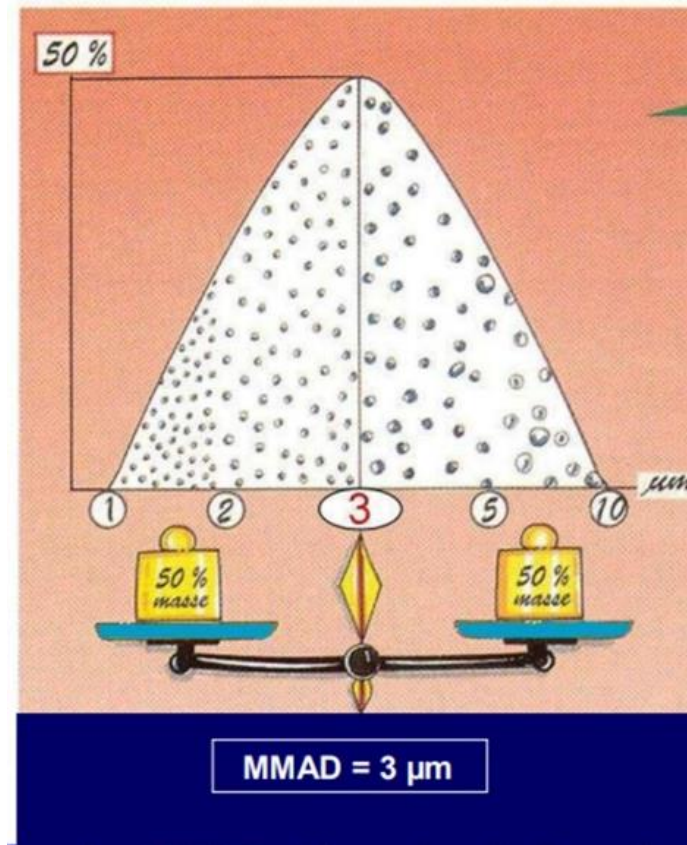


Figure 26 : Courbe de la distribution de la masse d'un aérosol [103].

I.2.2.2 L'écart-type géométrique ou Déviation Standard Géométrique (GSD)

Il s'agit d'un paramètre pour décrire l'étendue de la distribution des particules, autour du MMAD.

Il permet d'estimer la distribution et la dispersion des particules d'aérosols. Ainsi, lorsque les particules d'aérosols ayant pratiquement la même taille, présentent des GSD < 1,2, elles sont dites « monodispersés ». Les aérosols dont le GSD est > 1,2 représentent des aérosols polydispersés [2].

D'autres définitions sont à considérer telles que la fraction de particules fines ou FPF qui est la fraction de la quantité d'aérosols qui se situe en dessous de 5 μm de diamètre aérodynamique et qui est classiquement utilisée en aérosolthérapie pour définir la fraction de particules pénétrant dans les poumons.

I.2.3 Métrologie *in vitro* des aérosols

Les Compendium de la pharmacopée des pays de l'OCDE [104] comme la Pharmacopée Européenne [105] et Américaine [106], régissent les caractéristiques nécessaires pour caractériser un aérosol thérapeutique en vue de la demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) et les méthodes de mesure des particules. Cette caractérisation peut également être utilisée pour définir un aérosol infectieux. Les normes ISO [107] sur les systèmes de nébulisation régissent également les exigences recommandées pour caractériser une particule d'aérosol.

Le choix d'un outil de métrologie adapté pour la mesure de la taille des aérosols est complexe, d'une part compte tenu de la diversité, de la spécificité (gamme de mesure de l'appareil, paramètre mesuré par l'appareil) et de la disponibilité des instruments de mesure. D'autre part, il dépend du type d'aérosol généré (aérosols de très petite taille (nanométrique ou micrométrique), de la forme galénique de l'aérosol du dispositif de génération de l'aérosol (aérosol doseur de poudres ou nébuliseurs).

Les instruments de mesure de la granulométrie des aérosols utilisés pour les travaux de cette thèse, sont les diffractomètres lasers, l'impacteur en cascade et la biocollection par BioSampler SKC®.

I.2.3.1 (Bio) collection des aérosols par différentes méthodes

Le processus de collection des aérosols consiste à récolter les particules d'aérosols générés à l'aide d'appareils spécifiques pour en étudier les caractéristiques métrologiques et/ou la viabilité dans le cas d'agents infectieux. Dans le cas de la collecte des aérosols d'agents biologiques, on parle de bio collection [108].

Il existe différentes méthodes de collection des particules d'aérosols : les méthodes physiques, les méthodes de collection en milieu liquide, les méthodes de collection sur filtres et les méthodes de collections environnementales par cyclone. En fonction du type d'aérosol à biocollecter, à savoir des aérosols thérapeutiques, ou des aérosols infectieux ou des aérocontaminants environnementaux, et de la problématique du sujet ; l'outil de biocollection sera différent. La pertinence du choix d'un appareil de biocollection, dépend aussi de la sensibilité du bioaérosol, du stress qu'engendre la méthode de biocollection sur l'aérosol et de la taille du bioaérosol à récolter [109,110].

I.2.3.2 Biocollection de particules en suspension dans l'air par impaction en milieu liquide (Impinger en anglais) : description et mode de fonctionnement

Le dispositif a été décrit en 1922 par Greenburg et Smith comme étant un outil de recueil des particules en suspension dans un récipient entièrement en verre et donc autoclovable (Cf. Figure 27), facilement transportable, peu onéreux, et pouvant

biocollecter différents agents infectieux. Les particules d'aérosols dans l'air sont accélérées à travers un orifice étroit conçu pour impacter les particules en milieu liquide. Il s'agit d'impacteurs en milieu liquide ou « Impinger en anglais », (précisément Impinger de type AGI®) qui sont classiquement utilisés pour la biocollection des particules d'aérosols infectieux en suspension dans l'air [108,111,112]. Ces dispositifs permettent une biocollection d'aérosols de 1 à 10 µm. Les très petites particules < 0,5 µm sont difficilement collectable [113,114]. Néanmoins, les virus (de l'ordre du submicrométrique ou du nanométrique) peuvent être biocollectés [108]. Mais ils seront plus sujets à une dégradation et à un stress lié au microenvironnement créé par l'outil.

Kessavan *et al.*, 2010 [113] indiquent que l'Impinger est souvent utilisé comme outil de référence pour la biocollection des aérosols.

- **Mécanisme de fonctionnement et utilisation de l'Impinger**

Le mécanisme de collection est réalisé grâce aux particules d'aérosols qui s'impactent dans le récipient de collection. Les particules sont collectées dans un liquide de collecte sélectionné par l'expérimentateur selon un mouvement bien caractérisé, à un débit et en un temps prédéfinis par l'expérimentateur [113]. Après la biocollection, l'outil permet de recueillir et de mesurer le nombre de microorganismes aérosolisés viables selon un débit d'aspiration constant d'environ 12 L / minutes. [113]. L'efficacité de la biocollection dépend du débit d'air. Ce débit est maintenu durant la biocollection grâce à un vide créé par le système pour atteindre une forte vitesse à la sortie d'une buse d'accélération d'environ 1,27 mm de diamètre (en anglais nozzle) présentée dans la figure numéro 27 a et A'. Engendrées par la pression créée par le jet de la buse d'accélération de l'Impinger, les particules d'aérosols vont ainsi s'impacter dans le fond du réservoir du liquide contenu dans le récipient en verre grâce à la vitesse des particules. Un mécanisme de ré-aérosolisation ou de recyclage des aérosols biocollectés dans l'Impinger, peut être à l'origine de faibles efficacités de biocollection et de pertes élevées. Lin *et al.*, 1997 [111] notent un taux d'évaporation du liquide dans l'Impinger de 0,2 ml/ min, pour une température de 25°C et une humidité relative de 47 %. Ces paramètres sont donc importants à prendre en compte pour une efficacité optimale de biocollection.

- **Fonctionnement et usage du BioSampler SKC ® (appareil utilisé dans ce projet de thèse)**

Le BioSampler SKC ® (nom commercial) ou collecteur d'aérosols à tourbillons conçu en 1998 [115] est un Impinger modifié [113]. Il a été conçu pour améliorer les performances et l'efficacité de biocollection de l'Impinger de type AGI-30 [116] précédemment décrit.

Ce dispositif a le même principe de fonctionnement que l'Impinger mais dispose de 3 buses au lieu de 2 buses (Figure 27 b). Les particules d'aérosols biocollectées dans le dispositif en verre sont accélérées par de multiples mouvements en tourbillons, grâce

aux 3 buses. L'aérosol va ainsi être biocollecté de façon tangentielle (Figure 27) sur les parois du dispositif avec un débit de fonctionnement d'environ 12 L / minutes créé au sein du système et un vide d'environ 381 mmHg (il y a une baisse de pression par rapport à l'Impinger dans le BioSampler) [113].

Cette mise au point du design et du fonctionnement du BioSampler par rapport à l'Impinger, lui donne l'avantage de limiter le processus de recyclage ou re-aérosolisation de l'aérosol biocollecté, limitant ainsi la perte du liquide d'échantillonnage et maximisant l'efficacité de la biocollection. Aussi, la viabilité de l'agent infectieux est-elle mieux conservée avec ce type de mouvement en tourbillon [115] [116]. Enfin, contrairement aux impingers, le SKC® a l'avantage de s'utiliser avec des liquides visqueux et non évaporables [116].

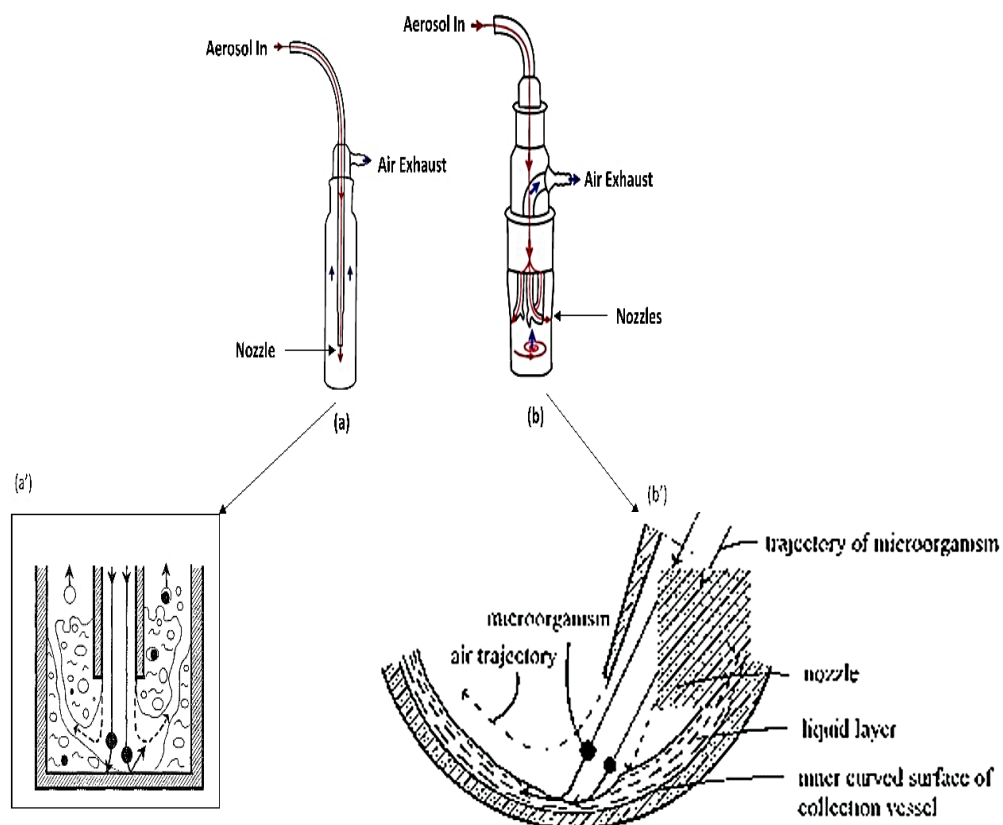


Figure 27 : Schéma modifié d'après Pan et al., 2019 [110] (figure a et b) , May et al., 1957 [114] (figure a') et Lin et al., 1997 [111] (b') présentant respectivement les biocollecteurs en milieu liquide de type Impinger AGI-30® (a) et le BioSampler SKC® (b).

Le descriptif du mouvement de biocollection des aérosols générés sur les parois en verre de la cuve des biocollecteur respectifs (figure a' et b') est représenté en dessous de chaque biocollecteur. La trajectoire des particules entrant et sortant est schématisée respectivement en rouge et en bleus dans les figures a et b. Les traits pleins noirs illustrent la trajectoire de la particule biocollectée et ceux en pointillés la trajectoire de l'air.

- **Fonctionnement et utilisation de la biocollection sur filtres**

Cette méthode consiste à collecter les particules sur un filtre (Figure 28) selon un mécanisme d'impaction inertielle, de diffusion, d'interception (Figure 28-B), d'interaction électrostatique ou de dépôt par gravitation [110,117]. Les filtres sont efficaces pour la collection de particules d'aérosols de petits tailles (20 nm) comme les virus et les aérosols de très grande taille ($> 10 \mu\text{m}$) [110]. Les filtres peuvent être composés en différentes matières. Ils peuvent se composer de cellulose (détection du virus de la varicelle dans l'air ambiant des salles d'hospitalisation, [118], de fibres de verre, de nanofibres et de téflon ou de gélatine (biocollection de virus grippaux)[119] [120]. L'inconvénient majeure de la biocollection par filtration est la perte d'efficacité de biocollection et la perte de viabilité des particules biologiques car la méthode entraîne une inactivation importante des bioaérosols [121] et un processus de déshydratation des bioaérosols durant l'échantillonnage [117].

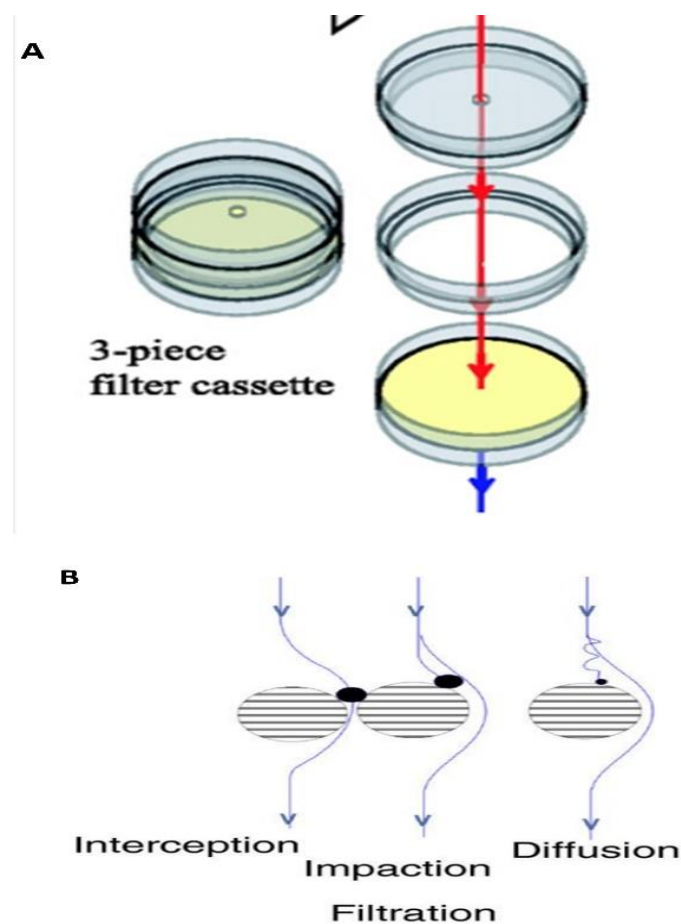


Figure 28 : Schéma d'après Verreault et al., 2008 [117] décrivant le mécanisme de biocollection sur filtres (**28-A**). Le schéma 28-B est d'après Pan et al., 2019 [110]. Il illustre les différents mécanismes impliqués dans la biocollection sur filtres.

Les flèches rouge (air entrant) et bleu (air sortant) illustrent la trajectoire de l'air durant le processus de biocollection.

- **Fonctionnement et utilisation des cyclones pour la biocollection des aérosols environnementaux**

Le mécanisme de fonctionnement des collecteurs « Cyclones » permet l'échantillonnage de l'air ambiant recueilli à un fort débit (environ 265 L / minutes) dans un tube d'entrée puis dans le corps du dispositif [113,122]. Haig *et al.*, 2016 [123] décrivent le mécanisme des échantillonneurs cycloniques comme suit : l'air chargé de particules est forcé par la forme conique de la chambre de collecte pour former une spirale, décrite dans la figure qui suit.

Dans ce flux d'air, les particules subissent une force centrifuge proportionnelle à leur taille à leur densité et à leur vitesse. Les particules sont entraînées par inertie vers la paroi du cyclone où elles sont séparées du flux d'air en un liquide. En atteignant le bas du cyclone, le flux d'air inverse sa direction et entraîne les plus petites particules non collectées hors du cyclone à travers un vortex. L'étude d'Haig *et al.*, 2016 [123], affirme que les plus grosses particules sont plus susceptibles d'être collectées du flux d'air dans un liquide.

Les particules sont biocollectées selon un débit d'air calibré pour maintenir une efficacité de collecte optimale comme pour les autres outils de biocollection.

La figure 29 démontre l'exemple du fonctionnement d'un biocollecteur de type cyclonique, fréquemment utilisé pour la biocollection des particules de l'air ambiant, [124] le Coriolis[®], de la société Bertin Technologie[®]. Ce dispositif peut être utilisé pour analyser des aérosols présents dans l'air à de très faibles concentrations, de l'ordre d'une partie par trillion ou moins [122].

On peut donc noter que contrairement aux outils précédents, le cyclone est équipé d'un réservoir capable de fournir un liquide de collecte des aérosols en cas de fonctionnement prolongé, utile pour des applications sur le terrain.

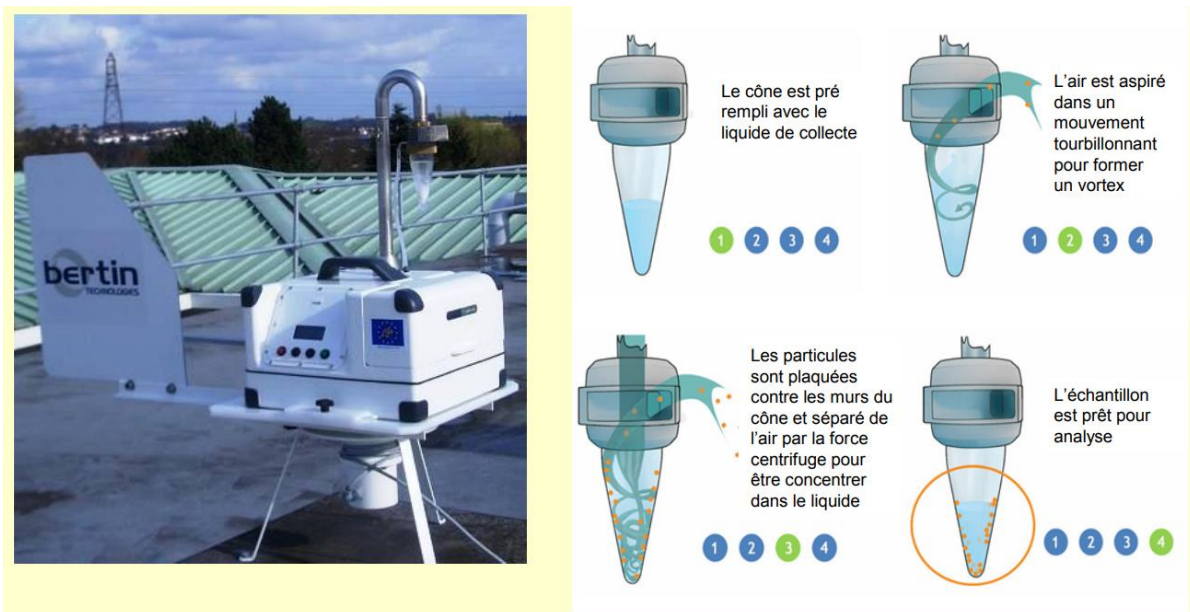


Figure 29: Principe de collecte de l'échantillonneur d'air cyclonique micro Coriolis® de la société Bertin Technologies® (source Bertin Technologies France).

Le mouvement en tourbillons du flux d'air dans un cyclone est représenté en vert dans le cône, et les particules d'aérosols sont représentées par les points oranges.

- **Fonctionnement des précipitateurs électrostatiques**

Pan *et al.*, 2019 [110] décrivent un autre type de biocollecteur, nommé précipitateur électrostatique. Par un mouvement d'attraction électrostatique, les particules en suspension dans l'air sont utilisées pour collecter des particules < 10 µm.

Ce système n'est pas adapté pour la bio collection des grandes tailles de particules > 10 µm [110]. Les particules en suspension sont chargées négativement par un corona (Figure 30). Puis, par attraction électrostatique, elles sont attirées vers les électrodes des plaques de collection qui ont une charge opposée aux particules [125]. Ce système de précipitateur électrostatique présente l'avantage de consommer moins d'énergie et d'être facilement transportable. L'efficacité de collection est fonction de la taille du bioaérosol.

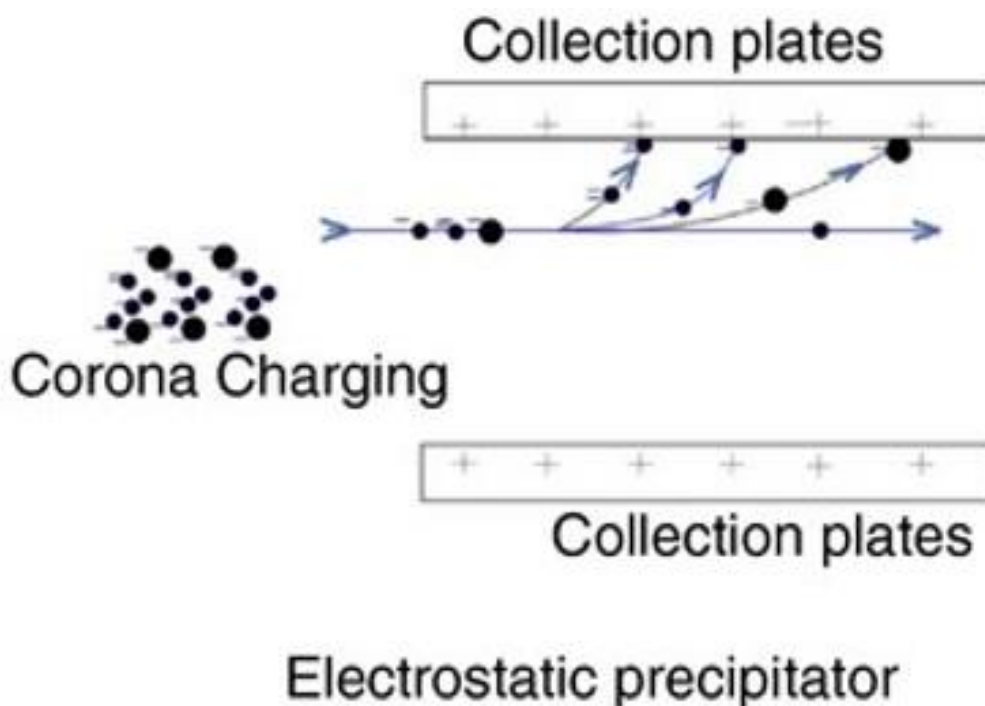


Figure 30 : Schéma de fonctionnement d'un précipitateur électrostatique d'après Pan et al., 2019 [110].

En résumé, chaque outil de biocollection des particules en suspension dans l'air présente des avantages et des inconvénients.

I.2.3.3 Méthodes physiques pour la mesure granulométrique des particules d'aérosols

I.2.3.3.1 Métrologie des particules par compteur optique (utilisation dans la thèse)

Le compteur optique est un instrument de mesure en temps réel des concentrations de fumées, de poussières ou d'aérosols. Il mesure les concentrations et les tailles de particules physiques mais sans l'activité biologique associée.

Celui utilisé pour la thèse est un compteur portable, le CEL-712 Microdust pro, Casella[®], Bedford, UK. Grâce à une sonde de mesure amovible, dans laquelle s'insère un calibre optique (Figure 31), les particules d'aérosols générées sont captées en temps réel [126]. L'appareil détecte en temps réel la concentration.



Figure 31 : Photo du compteur optique à particules portatif de type Microdust pro Casella®, instrument de mesure portatif pour la détection en temps réel de particules de l'air ambiant (aérosols, poussières, fumées) [127].

I.2.3.3.2 Métrologie des aérosols par impaction

- **Les impacteurs en cascades de type Andersen**

Ils permettent de mesurer le diamètre aérodynamique et la masse d'une particule qui s'impacte sur des plaques multiétages en position longitudinale (Figure 32).

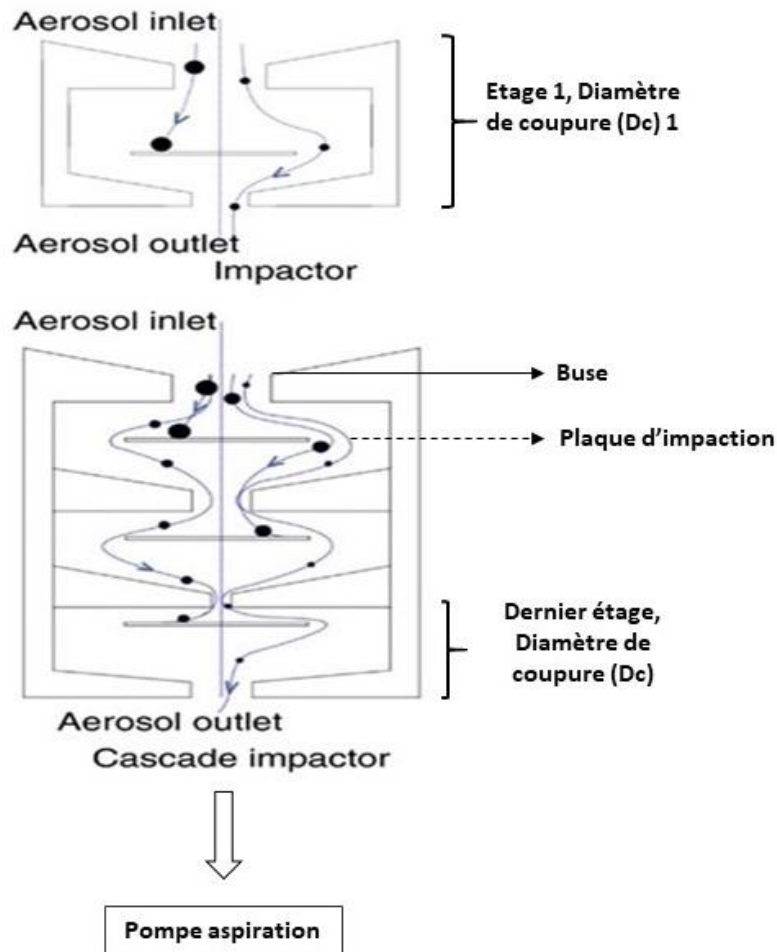


Figure 32 : Schéma modifié d'après Saaski et al.,2009 [122] décrivant le principe de fonctionnement d'un impacteur en cascade. Les particules d'aérosols sont impactées sur les plateaux ou plaques multiétages de l'impacteur.

Les particules (ronds noirs) sont collectées sur des étages de tailles différentes. L'appareil se compose d'une succession de différentes buses possédant un diamètre de coupure spécifique.

Par un phénomène d'inertie, les particules sont collectées après leur accélération (par les buses ou trous) sur les différents étages ou plateaux [110]. Les particules entrant dans le flux d'air de l'impacteur, sont aspirées à l'aide d'une pompe à vide d'aspiration. L'impacteur fonctionne avec une pompe à vide pour aspirer les particules entrant dans le flux d'air ou « air inlet ».

Avant la pompe à vide on retrouve un filtre terminal. Les particules sont sélectionnées en fonction de leur taille granulométrique : les petites particules ont une trajectoire (flèche bleue) qui permet d'aller plus bas, au niveau des étages, et les grosses particules se déposent sur les étages supérieurs (Cf. Figure 32). Les particules déposées sur les plateaux sont ensuite quantifiées par une analyse adéquate afin de doser la substance d'essai (pathogène ou principe actif d'un médicament par exemple). L'impacteur en cascade permet de mesurer le diamètre aérodynamique des aérosols en tenant compte de la substance d'essai contenue dans la particule.

- **Impacteur en cascade standard (utilisé pour la thèse)**

Ce type d'appareil mesure la taille des aérosols en termes de quantité déposée dans les différents plateaux ou étages de l'appareil (Figure 33). Les impacteurs en cascade permettent d'obtenir le MMAD des particules mesurées.

L'impacteur en cascade, **Next Generation Impactor (NGI)** est un équipement de référence d'un point de vue réglementaire recommandé par la pharmacopée européenne [104] et la norme ISO [107] sur les systèmes de nébulisation pour effectuer des mesures de tailles d'aérosols. Il est composé de différents plateaux ou étages disposant de diamètre de coupures spécifiques pour chaque plateau. Chaque plateau du NGI dispose d'un certain diamètre de coupure défini : les particules sont impactées suivant leur taille dès l'entrée du NGI.

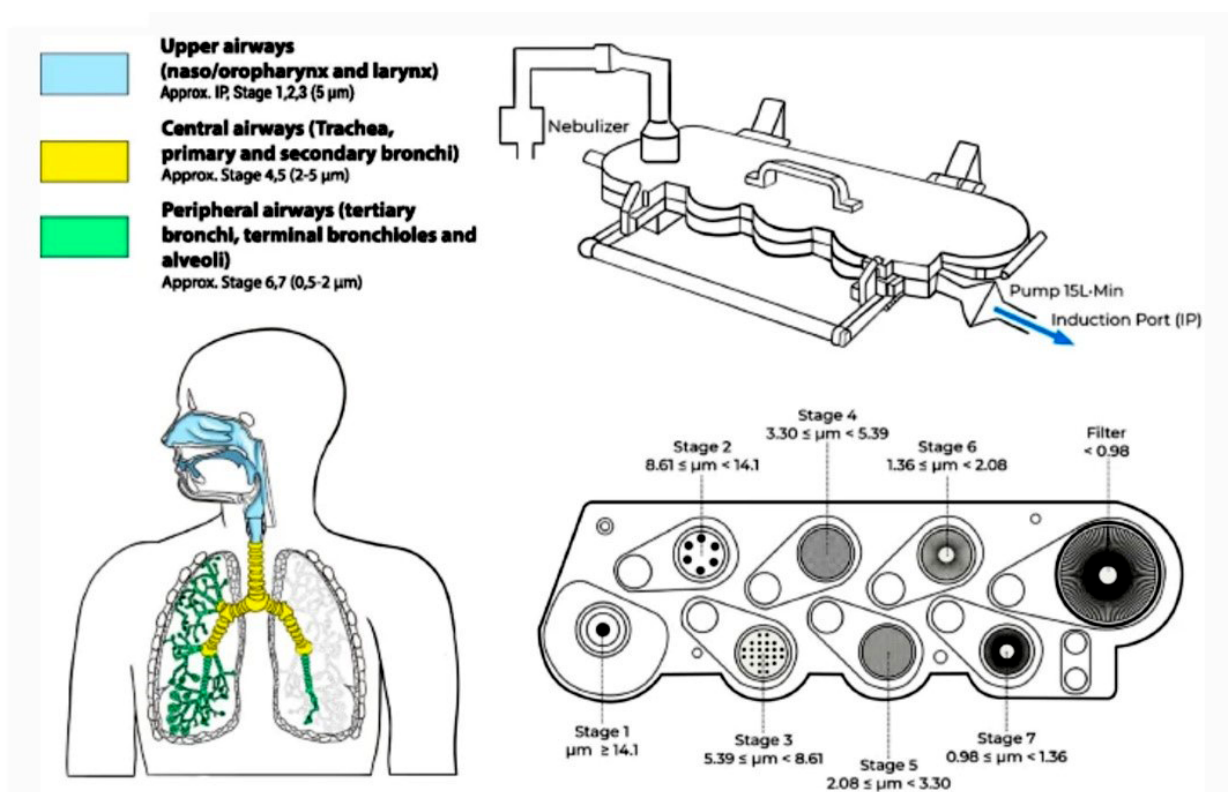


Figure 33 : Descriptif d'un impacteur en cascade de nouvelle génération, (New Generation Impactor, NGI) d'après Fabian et al.,2009 [120].

Les différents plateaux du NGI ainsi que leur diamètre de coupure y sont représentés lorsque le NGI est ouvert (bas de l'image).

- **Impacteurs en cascade à basse pression (utilisés pour la thèse)**

Ils peuvent être manuels DLPI (Dekati[®] Low Pressure Impactor, Dekati Ltd., Finland) ou électroniques (Electrical Low Pressure Impactor ELPI, Dekati Ltd). Ils ont un mode de fonctionnement similaire au NGI, avec une impaction multi-étages. Ils permettent la caractérisation des aérosols de plus petites tailles jusqu'à 0,006 μm contre 0,5 μm avec les impacteurs standards.

- **Le DLPI**

Le DLPI est un impacteur en cascade de 13 étages à basse pression qui mesure des petites tailles d'aérosols de 7 nm à 10 μm avec un débit d'échantillon de 10 à 30 L/minutes. Les particules s'impactent sur les différents étages du DLPI en fonction de leur inertie et de leur taille. Chaque étage du DLPI a un diamètre de coupure spécifique (Figure 34).

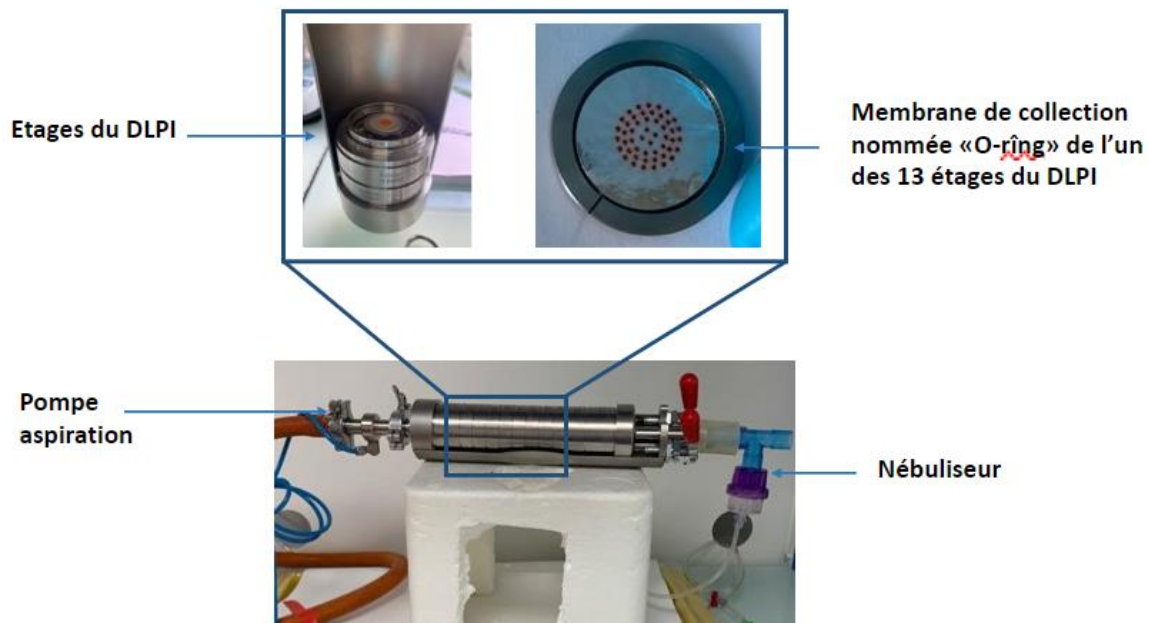


Figure 34 : Montage expérimental d'un DLPI (utilisé lors d'une expérience de thèse). Les aérosols utilisés sont des aérosols de fluorescéine.

- **Le ELPI**

Le principe du ELPI combine à basse pression le mouvement d'inertie de l'impacteur avec une détection en temps réel de particules entre 0,03 à 10 μm biocollectées après impaction sur 12 ou 14 étages. Il existe aussi Le ELPI + qui mesure des particules de 6 nm à 10 μm [128]. Les grosses particules se déposent sur les premiers étages et les petites sur les derniers étages [129].

Le mode de fonctionnement peut se décliner en 3 étapes : la particule est d'abord chargée à l'aide d'un chargeur corona (Cf. « corona charger », figure 35), puis les particules vont entrer dans le flux d'air à basse pression sur une succession d'étage électrique (chaque étage correspondant à un diamètre de coupure prédéfini) et enfin les particules sont collectées sur les différents étages en fonction de leur taille et de leur charge préalablement attribuée. La charge des particules est mesurée en temps réel par des électromètres qui transmettent un signal informatique (computer and control electronics) [130].

La détection en temps réel des particules collectées est un avantage par rapport aux autres impacteurs [131].

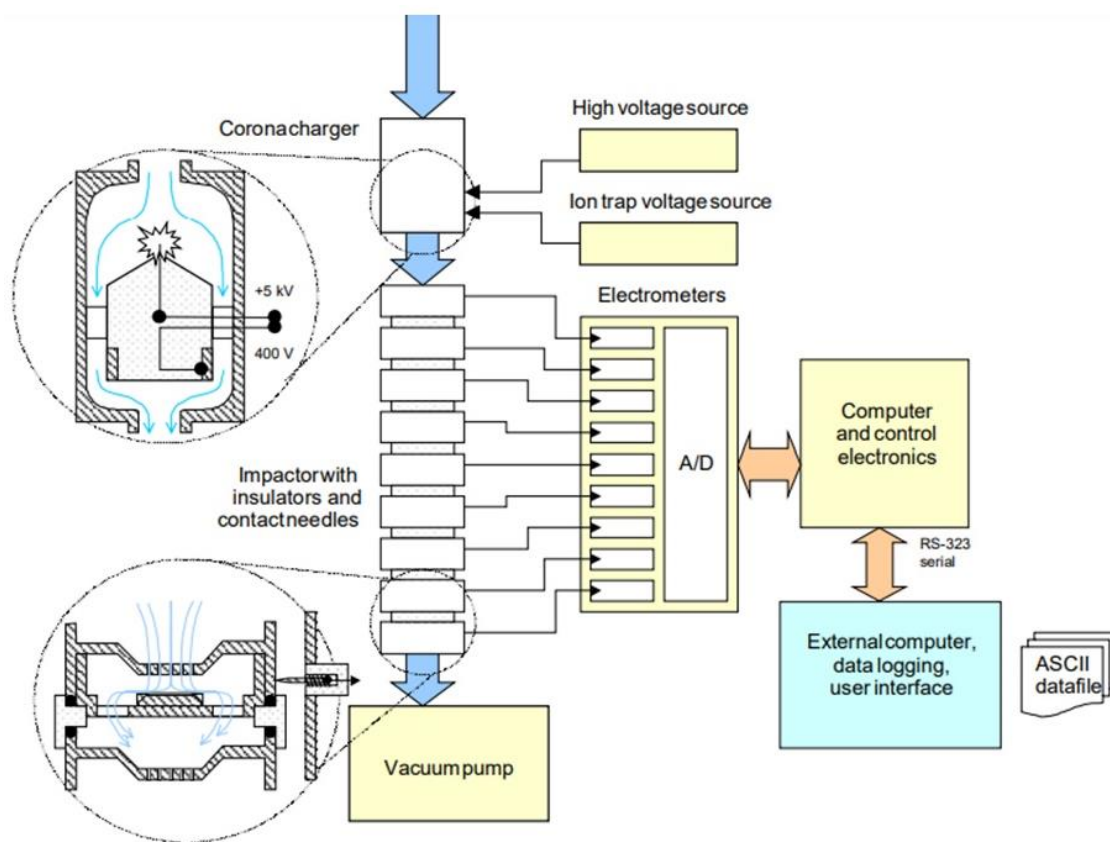


Figure 35 : Fonctionnement du ELPI d'après Moisio 1999 [135].

- **Mesure de la taille des particules par diffractomètre laser**

Il mesure la taille des aérosols en termes de volume de particule passant devant le faisceau laser de l'appareil. En effet, à chaque fois qu'un objet fait obstacle à la propagation de la lumière incidente, le phénomène de diffraction se produit [132]. Le diffractomètre permet de mesurer des aérosols d'une gamme de taille comprise entre 0,2 et 900 μm (Figure 36). Il mesure un **Volume Median Diameter** (VMD).

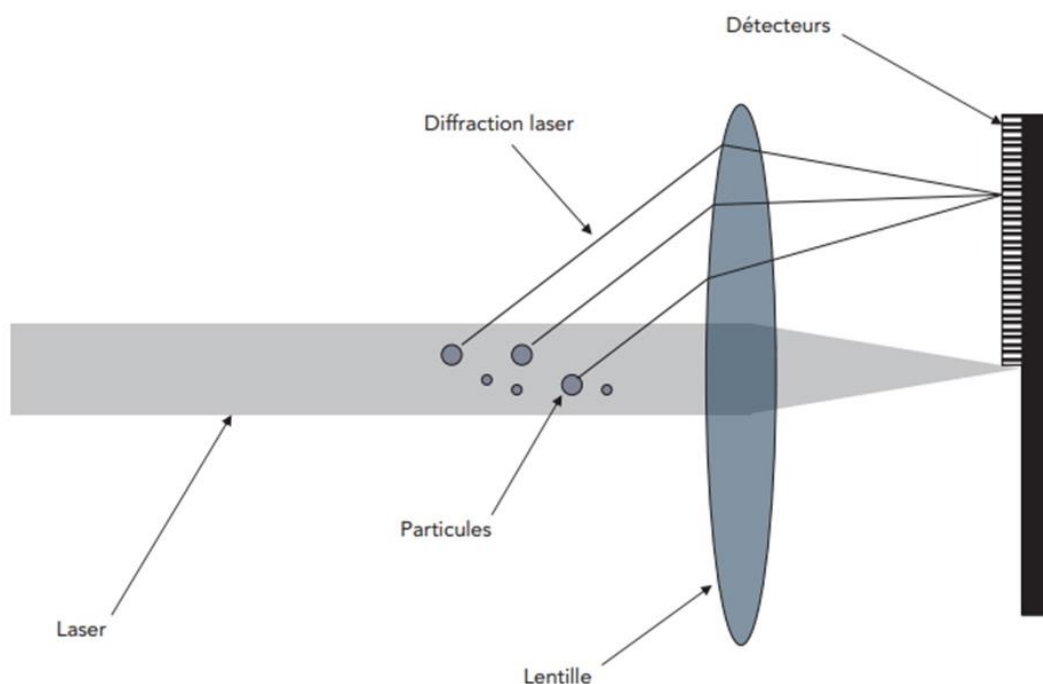


Figure 36 : Schéma issu du livre « Thérapie par voie inhalée » [132], détaillant le mode de fonctionnement d'un diffractomètre laser.

Plus les particules d'aérosols sont petites plus le phénomène de diffraction est grand.

I.2.4 Métrologie *in vivo* des aérosols, chez le PNH et chez l'Homme

Dans cette partie nous allons nous focaliser sur les méthodes de métrologies des aérosols *in vivo* chez le PNH.

La métrologie appliquée dans nos études comprend des **méthodes non invasives** et des **méthodes invasives**.

I.2.4.1 Les méthodes non-invasives de métrologie des aérosols

Ces méthodes non-invasives sont les méthodes d'imagerie radio-isotopique. Ces méthodes utilisent des radio-isotopes comme le ^{99m}Tc ou le ^{18}F -FDG pour radio-tracer et suivre le dépôt des particules d'aérosols qui sont administrées. Des techniques d'imagerie en 2D ou 3D respectivement, scintigraphie par gamma caméra et la TEP (Tomographie par Emission de Positons/TDM (Tomodensitométrie) ou communément appelée PET/CT en anglais, permettent de suivre la distribution régionale du dépôt des aérosols dans les VAS et les VAI du PNH.

Après le suivi de la distribution régionale des aérosols, on obtient des images de dépôt des aérosols qui sont analysées en sélectionnant des zones d'intérêts dites «Region of Interest » (ROI) [2].

I.2.4.1.1 Généralités sur les techniques d'Imagerie nucléaire du suivi des dépôts des aérosols dans les voies aériennes respiratoires du PNH

Les techniques d'imagerie ont révolutionné la prise en charge et la compréhension des phénomènes internes anatomo-physiopathologiques invisibles à l'œil nu et difficilement mesurables par des techniques physiques ou chimiques simples. De plus, il s'agit de techniques d'imagerie fonctionnelles non invasives et généralement peu douloureuses pour comprendre le milieu interne. L'avancée de la science a permis le développement de technologies de pointe de plus en plus précises pour la visualisation d'aérosols dans le corps entier. L'imagerie est utilisée dans de nombreux domaines d'application surtout en cancérologie et pour des spécialités où la visualisation est une condition *sine qua none* pour comprendre la complexité de la physiopathologie de l'organe (exemple neurobiologie, cancérologie).

Dans le domaine des aérosols, les technologies nucléaires de pointes permettent le traçage de particules d'aérosols radiomarquées pour visualiser le dépôt de toute particule d'aérosols, de sa porte d'entrée dans l'organisme jusqu'à son cheminement au sein des voies aériennes respiratoires. L'apport de l'imagerie nucléaire permet également de visualiser et repérer les potentielles zones d'accumulation, de ces aérosols. Cette imagerie est indispensable pour la compréhension des mécanismes qui sous-tendent le dépôt des aérosols au sein d'un organisme. Ces mécanismes sont d'autant plus complexes que le dépôt des aérosols est conditionné par différents facteurs propres à la particule d'aérosols elle-même. Ces facteurs peuvent être :

- La taille,
- La densité,
- La forme galénique sèche ou liquide de la particule d'aérosol,
- Les conditions d'aérosolisation (choix du dispositif d'aérosolisation, débit d'aérosolisation, vitesse d'aérosolisation),
- L'hôte recevant l'aérosol (position du corps lors du dépôt de l'aérosolisation, paramètres respiratoires, anesthésie, état général).

Il ressort de la littérature sur l'étude du dépôt des aérosols que les technologies d'imagerie 2D (exemple scintigraphie par gamma caméra) et 3D (TEP/CT) sont les plus utilisées pour visualiser le dépôt de particules d'aérosols dans les modèles précliniques de PNH. Elles permettent une cartographie locorégionale du dépôt des aérosols chez le PNH. Le point commun et l'avantage de ces techniques est qu'elles sont utilisées aussi en clinique. Cela permet une extrapolation aisée des résultats entre le PNH et l'Homme.

L'IRM peut également être utilisée mais est moins utilisée dans la littérature pour l'étude du dépôt d'aérosols chez l'Homme.

I.2.4.1.2 Imagerie par scintigraphie (Gamma Caméra)

La technique par scintigraphie gamma caméra est utilisée en clinique chez l'Homme. Elle consiste au couplage du Technicium 99m (^{99m}Tc), émetteur gamma avec du DTPA (Diéthylènetriamine Pentaacetic Acid).

Le ^{99m}Tc constitue le radiopharmaceutique et il est couplé au traceur (Cf. « add label » de la légende de la figure 37) qui est le DTPA. Pour utiliser cette technique, il est nécessaire de disposer d'un laboratoire radiopharmaceutique à proximité fournissant dans un délai < 6H le DTPA- ^{99m}Tc Technétium dont la demie vie est justement de 6 H.

L'imagerie par gamma caméra permet de révéler le dépôt du complexe radiopharmaceutique DTPA –Technétium dans les VAS et VAI du PNH [133]. Des détecteurs de la gamma caméra sont placés pour repérer le rayonnement Gamma du ^{99m}Tc émis dans toutes les directions, autour du sujet.

Une image en deux directions, dite image planaire 2D, est reconstruite par l'appareil en plusieurs temps à l'aide de programmes informatiques spécifiques de l'appareil d'imagerie tomographique. L'intensité du signal dans les voies aériennes respiratoires est corrélée à la quantité de radiotraceur inhalée ou introduite au départ dans le nébuliseur. L'un des inconvénients de cette technique d'imagerie est qu'elle ne permet pas la visualisation de l'anatomie du macaque car elle n'est pas couplée à un scanner. Par conséquent, pour évaluer le pourcentage de dépôt dans les VAS et VAI (Cf.« image analysis dans la figure 37), le niveau de précision dans les structures anatomiques reste assez approximatif [134]. Il est par exemple impossible de différencier le dépôt interne dans l'organisme et le dépôt des aérosols retenus sur les poils (dépôt extérieur) (Cf. Figure 39).

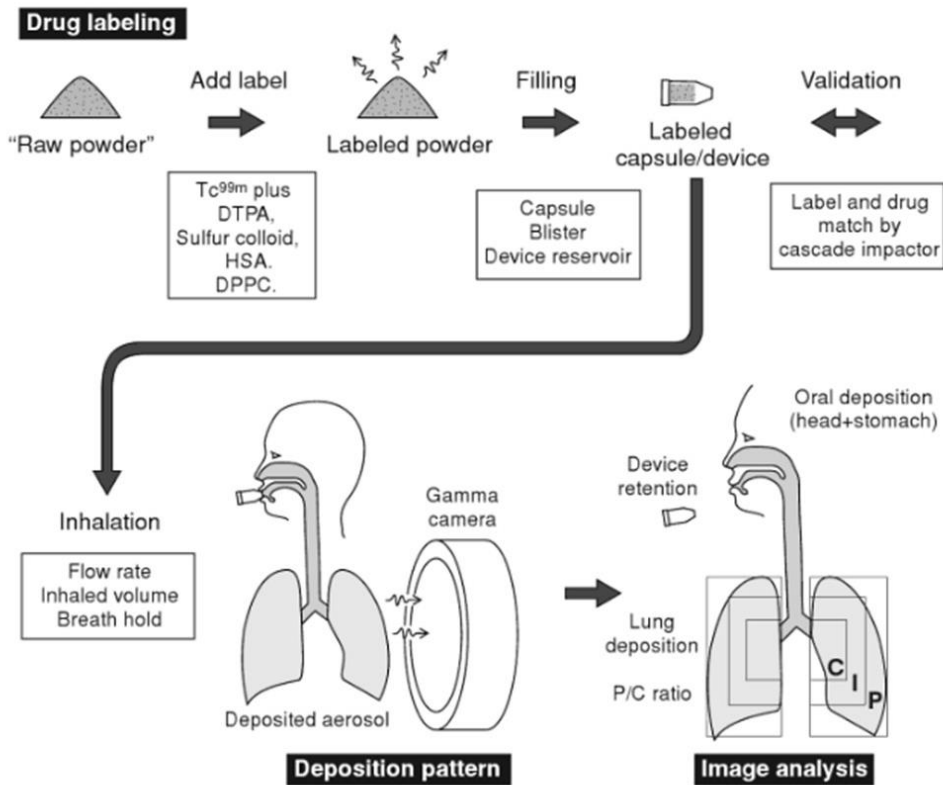


Figure 37 : Schéma d'après Clarck et Borgström ., 2001 [134] [135] expliquant l'application de la scintigraphie par gamma caméra, utilisée chez l'Homme pour évaluer le dépôt *in vivo* des aérosols dans les VAS et les VAI. Le schéma est illustré pour un aérosol doseur de poudre (Aérosol Doseur de Poudre) mais il peut également s'appliquer à un nébuliseur.

I.2.4.1.3 La Tomographie par Émission de Positons ou TEP

Elle consiste en l'administration (ici en l'inhalation ou au dépôt dans les VAR) de radiotraceurs qui se compose d'un radioisotope et d'un traceur comme schématisé dans la figure 38. Ces radiotraceurs sont ensuite détectés et quantifiés. Le radioélément est couplé à un traceur constitué lui-même de deux parties, une molécule organique ou minérale ou organométallique et un radioélément [136].



Figure 38 : Schéma de la composition d'un radiotracer.

Couramment, le radioélément utilisé dans le domaine des aérosols inhalés chez le macaque, le seul à notre connaissance, utilisé dans la littérature est le fluor 18 (^{18}F) desoxyglucose (FDG). Le Fluor est le radioélément et le desoxyglucose la molécule organique. Le FDG est en réalité un dérivé du glucose ($\text{C}_6\text{H}_6\text{-OH}$), sucre s'accumulant physiologiquement au sein des cellules à forte consommation de glucose, par exemple le cerveau, ou à fort métabolisme et renouvellement cellulaire (tissus cancéreux). Au sein du complexe $^{18}\text{-FDG}$ la molécule qui remplace le OH, le fluor bloque ainsi la dégradation du glucose et favorise son accumulation dans la cellule. Des radioisotopes ^{11}C , ^{13}N , ^{14}O et ^{64}Cu sont également utilisés chez l'Homme. Le fluor 18 est également le plus utilisé chez l'Homme, son temps de demie vie ($t_{1/2}$) supérieur au technétium 99 m, soit 109,8 minutes). Pour utiliser cette technique, il est nécessaire de disposer d'un laboratoire synthétisant les composés radioactifs, un cyclotron par exemple et le radiotracer, le FDG. Chez le PNH le radiotracer ou radiopharmaceutique est soit introduit par intubation, inhalation ou injecté par voie veineuse. Il s'agit d'un émetteur beta +, émetteur de positron. Au contact de la matière et d'une collision avec un électron, le rayonnement beta + s'annihile et émet deux rayonnements gamma de 511 keV de sens opposés (180°). Cette réaction physique, émet des rayonnements à la suite de cette annihilation qui sont détectés par l'appareil d'imagerie. Le détecteur de l'appareil tournant autour de l'animal ou de l'Homme ayant reçu le radiopharmaceutique, permet de détecter les rayonnements émis dans toutes les directions. Une image en trois directions dite 3D est reconstruite par l'appareil en plusieurs temps à l'aide de programmes informatiques spécifiques de l'appareil d'imagerie tomographique. Le principe de fonctionnement de la technique est résumé dans la figure 39.

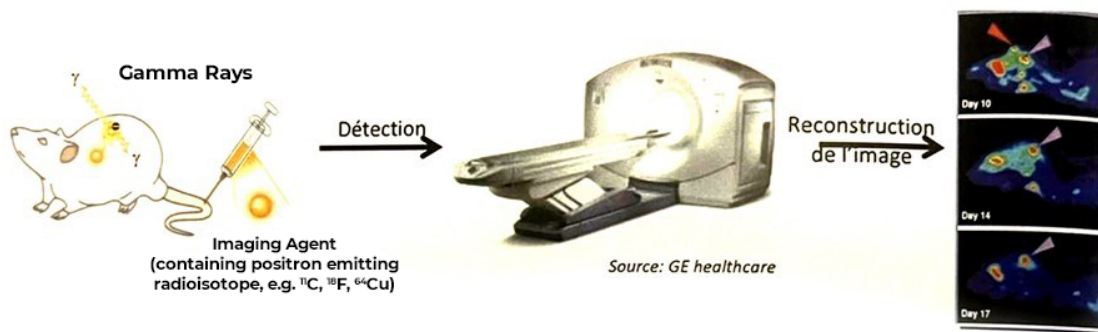


Figure 39 : Principe de fonctionnement de la Tomographie par Émission de Positons, d'après la thèse du Dr Naninck [137].

Tout comme la gamma caméra, l'intensité du signal dans les voies aériennes respiratoires de l'animal est corrélée à la quantité de radiotracer inhalée, ingérée ou reçue en injection, au départ. La TEP reste une technique d'imagerie de pointe, qui connaît un essor considérable dans le domaine des aérosols [27]. Elle présente l'avantage d'être couplée à un scanner ou Tomodensitométrie (TDM) (couramment appelée CT ou Computer Tomographie, en anglais) permettant de visualiser en détail l'anatomie structurale des VAR et le dépôt de l'élément radioactif inhalé ou ingéré. On peut dire que c'est une technique indispensable pour visualiser de façon holistique le dépôt d'aérosols de manière précise (en comparaison des techniques d'imagerie 2D) dans les VAI et VAS d'un PNH [138], [27]. Dans le cas de l'étude sur le macaque, contrairement à la gamma caméra qui prend en compte les dépôts internes et externes sur les poils, la TEP on peut prendre en compte le dépôt réel dans les voies aériennes respiratoires sans la rétention d'aérosols sur les poils pour le cas des administrations des aérosols par voie inhalée (Cf. Figure 40)

Un résumé des différentes techniques d'imagerie 2D ou 3D pour étudier le dépôt des aérosols chez le PNH est présenté dans le tableau 2.

Tableau 2 : Comparaison des données obtenues en utilisant la technique d'imagerie par gamma caméra et par TEP-TDM pour la visualisation du dépôt d'aérosols dans les modèles de PNH.

Caractéristiques de l'aérosol radiomarqué et du dépôt	Imagerie en projection 3D de la distribution de l'aérosol inhalé (algorithme de reconstruction)		Imagerie planaire en projection 2D de la distribution de l'aérosol (Superposition des coupes d'images)
Technique d'imagerie	Imagerie 3D par TEP-TDM (PET-CT en anglais) Tomographie par émission de positons (TEP) Tomodensitométrie (TDM) [140] [136]	Imagerie 3D par SPECT-CT Tomographie d'émission monophotonique ou Single Photon Emission Computed Tomography) /CT [141]	Scintigraphie par gamma camera [139]
Discrimination spatiale du dépôt	Discrimination spatiale aisée compte tenu de la projection tridimensionnelle des images	Discrimination spatiale aisée compte tenu de la projection tridimensionnelle des images	Discrimination spatiale difficile compte tenu de la projection bidimensionnelle des images
Radioisotope utilisé et type d'émission	Emissions de rayonnements β^+ (positrons), détection des rayonnements gamma [2]	Emission des rayonnements Gamma (γ) [2]	Emission des rayonnements Gamma (γ) [2]
Nécessité d'une quantification du dépôt d'aérosols ?	Non : Atténuation de l'activité par les tissus automatisée	Non : Atténuation de l'activité par les tissus automatisés	Oui : Nécessite d'obtenir l'atténuation de l'activité par les tissus entre l'élément radioactif (déposé dans

			<p>l'arbre respiratoire) et la gamma caméra</p> <p>[142] [143] : 1) Calculer le coefficient d'atténuation tissulaire du PNH (scintigraphie de perfusion) 2) Déterminer et caractériser les régions d'intérêt (ROI) du dépôt des aérosols 3) Traitements des images de dépôts</p>
<p>Possibilité de visualiser et repérer précisément les zones de dépôt anatomique : Distinction précise de l'anatomie des VAS et VAI, et possibilité des segmentations des zones de dépôts des aérosols ?</p>	<p>Oui : Identification optimale des structures anatomiques grâce au scanner couplé à la TEP</p>	<p>Oui : Identification optimale des structures anatomiques grâce au scanner couplé à la SPECT</p>	<p>Structures anatomiques non clairement distinguables [134]</p>
<p>Possibilité de suivre et de comprendre l'initiation, le développement et la progression physiopathologique d'une maladie infectieuse transmise par voie inhalée/aérienne ?</p>	<p>Oui :</p> <p>[144] [18] [145]</p>	<p>Oui :</p> <p>[146]</p>	<p>Non :</p> <p>[133] [147] [148]</p>

Possibilité de visualiser des lésions anatomo-physiopathologiques dans les voies aériennes du PNH ?	<p>Oui :</p> <p>Observation des lésions (notamment pulmonaires) et des organes à fortes consommations de glucose (quand le radiotracteur est du ¹⁸F-FDG</p> <p>[149] [150] [18] [145]</p>	Oui	<p>Non:</p> <p>Pas de possibilité de visualiser les lésions</p> <p>[134]</p>
Résolution spatiale (dépend de l'imageur utilisé) et caractérisation du temps d'acquisition	<p>Bonne résolution spatiale entre 4 et 6 mm (avantage)</p> <p>-Les contours des VAS et VAI sont clairement délimités</p>	<p>Résolution spatiale moyenne quasi-équivalente à celle de la scintigraphie, autour de 5-15 mm</p> <p>- Visualisation qualitativement supérieure à la scintigraphie</p>	<p>Faible résolution spatiale de 10-15 mm (inconvenient)</p> <p>- Les contours des VAS et VAI peuvent être difficiles à délimiter</p>

	-Niveau de détails des images très précis [151] [4] [132]	- Meilleure visualisation des contours des VAS et VAI car la SPEC/CT est couplée au scanner (CT) [152] [142] [4] [132]	- Le niveau de détails des images est restreint (faible résolution spatiale dans le plan) [135] [4]
Position du PNH pour l'acquisition des images	Utilisation chez le PNH en position -Couchée : décubitus dorsal ou ventral	Utilisation chez le PNH en position -Couchée : décubitus dorsal ou ventral -Assise	Utilisation chez le PNH en position -Couchée : décubitus dorsal ou ventral -Assise
Contraintes d'utilisation	-Discipline spécifique : nécessité d'un manipulateur très expérimenté -Peut nécessiter un accélérateur de particules (cyclotron) à proximité -Nécessité de structures adaptées	-Nécessité d'un manipulateur très expérimenté -Nécessité de structures adaptées	-Nécessité d'un manipulateur expérimenté (niveau d'utilisation moins complexe que les imageries 3D) -Nécessité de structures adaptées délivrant des radionucléides -Nécessité de structures adaptées, en laboratoire de zones protégées pour l'utilisation chez le PNH
Limites de la technique	<p>Limites concernant l'expérimentateur : Exposition à des Rayonnements ionisants Nécessité d'un laboratoire et d'une enceinte d'administration d'aérosols au PNH étanche</p> <p>Limites concernant le PNH : Exposition à des Rayonnements ionisants Nécessité d'une gestion stricte et prédéfinie des déchets post-inhalation (urines, fèces etc)</p> <p>Manque de standardisation des pratiques d'évaluation du dépôt des aérosols et manque de standardisation des méthodes pour évaluer le dépôt des aérosols chez le PNH</p>		

Figure A (TEP/CT)

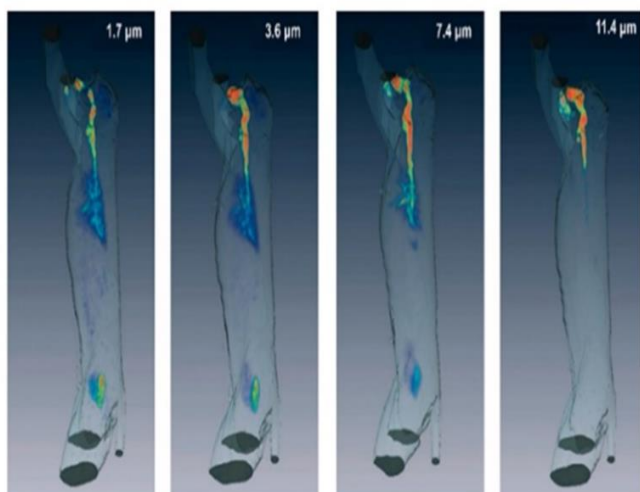


Figure B
(Scintigraphie par
gamma caméra)

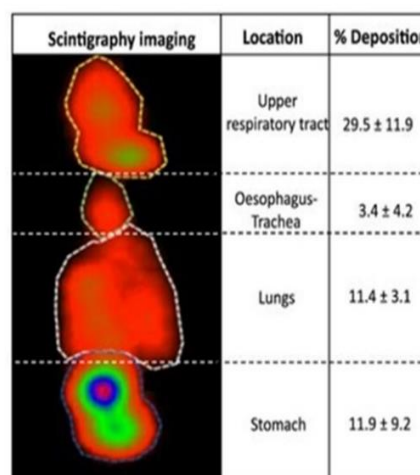


Figure 40 : Exemple d'images de dépôts d'aérosols radiotracés contenant du $[^{18}\text{F}]$ -FDG, la visualisation et le suivi du dépôt a été réalisé par une technique d'imagerie 3D (TEP/CT) d'après Dabisch et al., 2017 [27]. **B :** Imagerie scintigraphique planaire (2D) montrant les régions d'intérêts sélectionnées par l'expérimentateur après l'inhalation d'aérosols radiotracés au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dans un modèle de macaque Reynard et al., 2022 [148].

I.2.4.2 Les méthodes invasives

Ces méthodes ont consisté à effectuer un prélèvement *in situ* de l'aérosol déposé dans les voies respiratoires, ceci pouvant être fait par écouvillonnage ou Lavage Broncho Alvéolaire (LBA).

Concernant l'écouvillonnage, il s'agit d'introduire délicatement, un écouvillon, à la fois, dans les voies aériennes supérieures et les voies aériennes inférieures. L'écouvillon étant ensuite inséré dans du liquide physiologique, qui est recueilli pour le comptage de l'agent biologique. L'opération est répétée trois fois, afin de maximiser la récupération.

Concernant le lavage broncho alvéolaire (LBA), le sujet (Homme ou macaque) étant anesthésié, du liquide physiologique est introduit, à l'aide d'une tubulure flexible (sonde d'intubation), dans les alvéoles, à raison de 10 ml/Kg de poids corporel pour l'animal par exemple. Ce liquide est ensuite aspiré quantitativement, pour un comptage de l'agent biologique. Les pertes inévitables n'excédant pas 1% du volume total de liquide introduit. Ici aussi l'opération peut être répétée.

I.2.5 Génération des aérosols (Cf. Revue de la littérature pour le détail)

Ce chapitre présentera une brève revue des outils d'aérosolisation utilisés chez l'Homme et le PNH.

Les appareils utilisés chez l'Homme pour générer des particules solides ou liquides, sont nommés des aérosols doseurs ou des nébuliseurs. Il en existe une panoplie. Les appareils utilisés sur les modèles animaux sont parfois différents de ceux utilisés chez l'Humain.

Dans ce chapitre, nous allons présenter uniquement les générateurs d'aérosols liquides et solides utilisés chez l'Homme dans un contexte d'administration thérapeutique, ceci afin d'évaluer leur intérêt à être utilisé pour administrer des pathogènes chez le PNH comme expliqué dans l'introduction.

I.2.5.1 Génération des aérosols à l'aide de nébuliseurs

La nébulisation est un processus qui consiste en la transformation d'un liquide en une forme de fines gouttelettes d'aérosols. Le liquide peut être une solution ou une suspension.

Les nébuliseurs ont l'avantage de ne pas nécessiter le développement d'une formulation spécifique pour évaluer rapidement un aérosol biologique (par rapport à un aérosol en poudre).

Il existe trois différents types de nébuliseurs [5,153,154] :

- Les nébuliseurs à **jets d'air** (pneumatique),
- Les nébuliseurs à **ultrasons**,
- Les nébuliseurs à **mailles ou à tamis**.
- **Les nébuliseurs pneumatiques, couramment nommés en anglais « Jet nebulizer »**

Ils ont l'avantage de produire une large gamme de taille de particules (MMAD de 200 nm à 10 µm) et permettent la nébulisation de formulation à haute viscosité. Néanmoins, ils peuvent partiellement détruire les agents biologiques (actifs fragiles), modifier leur structure et générer des agrégats [155,156]. Le nébuliseur pneumatique fonctionne avec une source de gaz comprimé provenant d'un compresseur, d'une bouteille de gaz ou d'air mural. Le gaz passe par une petite ouverture sous le réservoir du nébuliseur, afin d'aspirer et d'atomiser le liquide. Le liquide atomisé contient de grosses et de petites gouttelettes et est conduit vers un déflecteur. Les grosses gouttelettes sont sélectionnées et poussées sur les parois internes du nébuliseur pour être recyclées sous forme liquide dans le réservoir. Plus de 90 % des gouttelettes

produites par l'atomisation sont sélectionnées et recyclées dans le nébuliseur pour être à nouveau atomisées. Les petites gouttelettes sont transportées hors du nébuliseur par le gaz (Figure 41).

Des nébuliseurs de génération récente comme le nébuliseur Blam® (CH Technology, USA) offrent la possibilité de ne pas avoir de recyclage de liquide mais le rendement reste faible et le volume résiduel est élevé.

Les caractéristiques de l'aérosol généré et en particulier le diamètre aérodynamique sont fonction du débit d'air introduit dans le nébuliseur pneumatique. Le MMAD des aérosols va donc changer avec le débit d'air.

La nébulisation par jet est associée à une diminution de 10°C de la température du liquide dans le réservoir et à une concentration du liquide. En fonction du temps, cette concentration peut augmenter d'un facteur 2 [157].

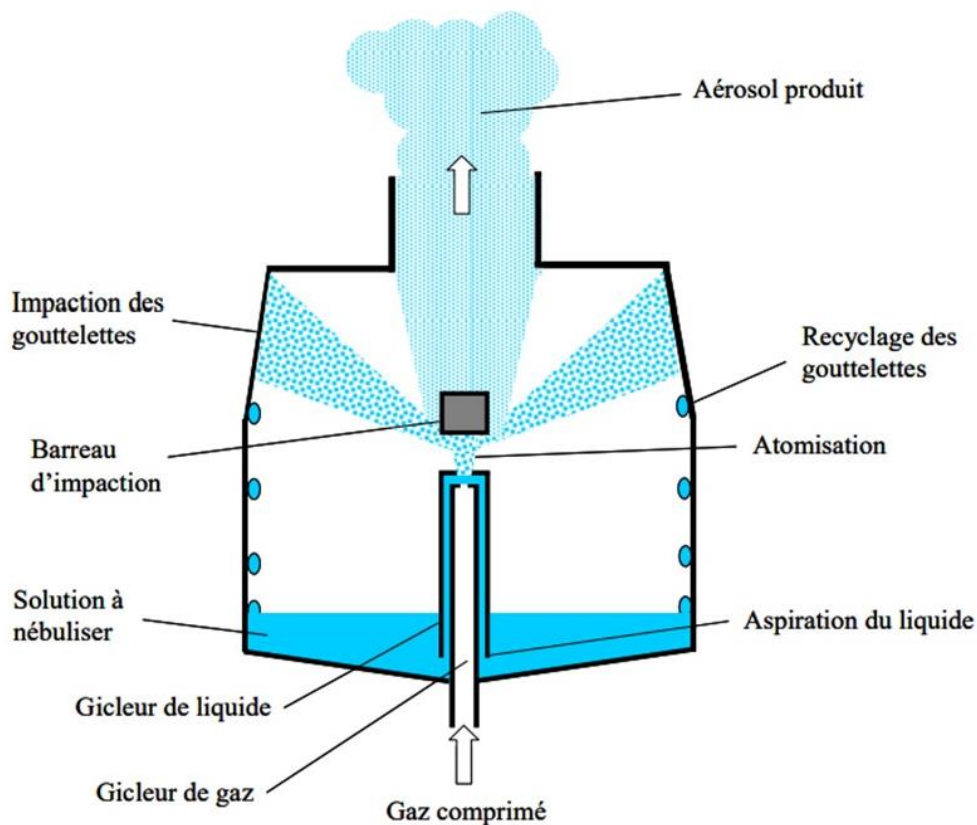


Figure 41 : Principe de fonctionnement d'un nébuliseur à jet d'air [158].

- **Les nébuliseurs ultrasoniques**

Ils utilisent la vibration à haute fréquence (1,2-2,4 MHz) d'un cristal piézo-électrique pour générer l'aérosol. La hausse de la fréquence du cristal diminue la taille des aérosols et augmente le débit. Les vibrations sont transmises à un liquide, générant de grosses et de petites gouttelettes. Les grosses gouttelettes tombent dans le réservoir et sont recyclées. Les petites gouttelettes quittent le nébuliseur avec le flux d'air. Comme pour le nébuliseur à jet, il y a une augmentation de la concentration dans le réservoir en raison de l'évaporation du liquide. Les nébuliseurs à ultrasons sont incapables de nébuliser un liquide dont la viscosité est supérieure à 6 cP, contrairement aux nébuliseurs à jet. Les vibrations piézoélectriques peuvent chauffer la solution liquide jusqu'à 45,9°C [159], ce qui peut entraîner l'inactivation et l'agrégation d'agents biologiques thermosensibles, tels que les agents bio-thérapeutiques. Ceci constitue un inconvénient de ce type de nébuliseur [160] en plus de leur caractère encombrant et fragile (cristal). Enfin, leur usage n'est pertinent que pour nébuliser des solutions aqueuses (Figure 42).

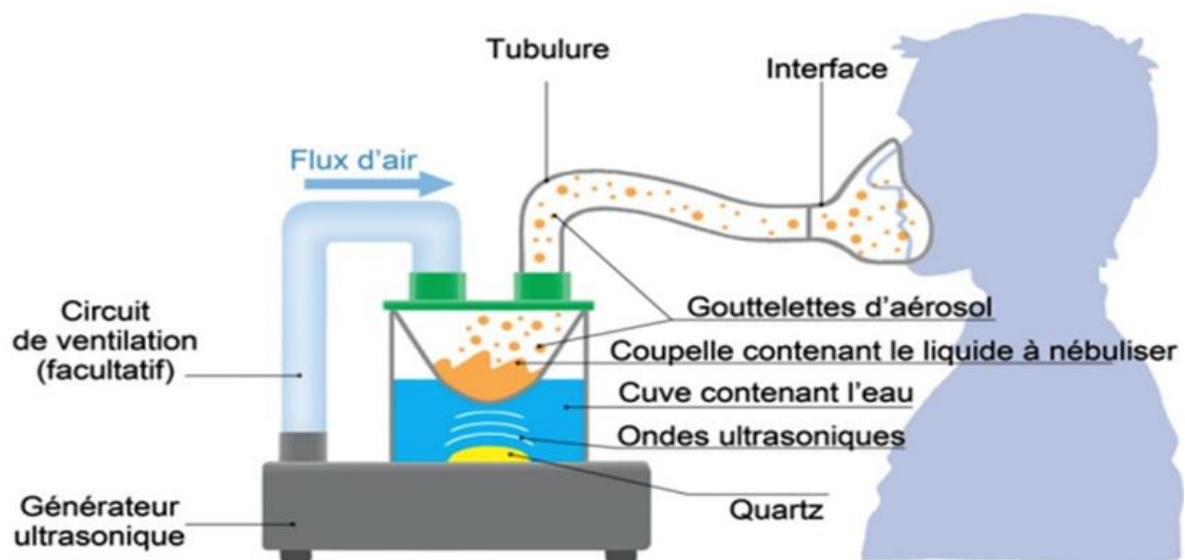


Figure 42 : Schéma d'un système d'administration d'aérosol à l'aide d'un nébuliseur ultrasonique d'après Coste et al., 2018 [153].

- **Les nébuliseurs « à mailles » ou à « membrane » ou « à tamis vibrant », nommé couramment « mesh » nébuliseur, en anglais**

Il s'agit de nébuliseurs produits avec une technologie récente et adaptable. En effet, ce type de nébuliseur est constitué d'une membrane métallique perforée de milliers de trous de diamètres spécifiques et calibrés de l'ordre du micromètre. Les trous peuvent être réglés en fonction du diamètre de l'aérosol à générer. L'aérosol est généré lorsque la membrane du nébuliseur est mise en vibration par le circuit électrique connecté au nébuliseur [161] (Figure 43). C'est en réalité le cristal piézo-électrique qui entoure la membrane qui est responsable des vibrations de cette dernière. L'un des principaux inconvénients de ce nébuliseur à mailles est la fragilité de la membrane et l'éventualité d'un colmatage des trous de la membrane après plusieurs utilisations ou lors de la nébulisation de suspension ou de solution très visqueuse.

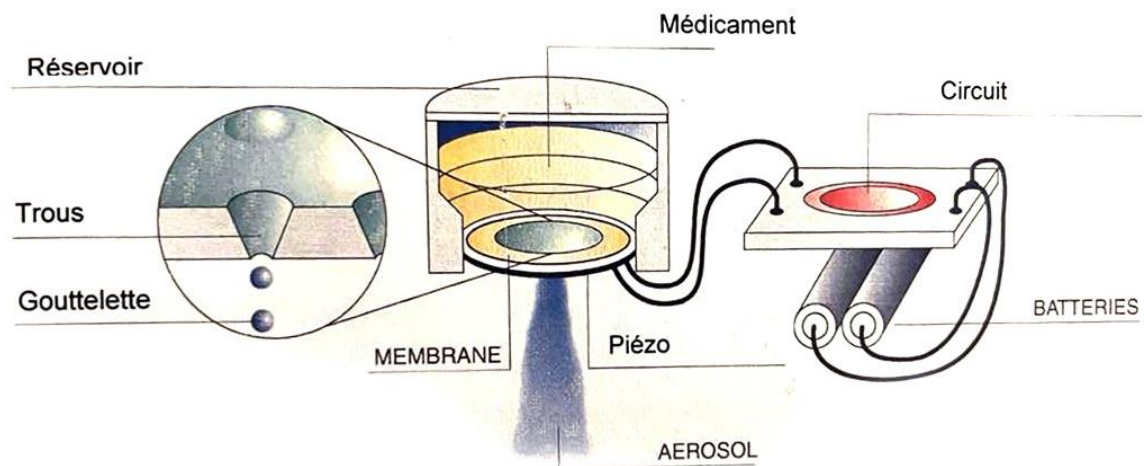
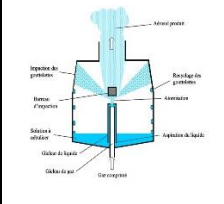
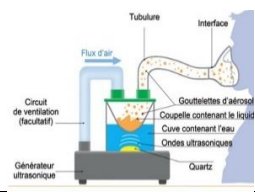
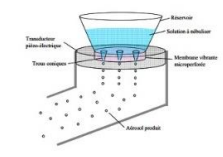


Figure 43 : Fonctionnement d'un nébuliseur à tamis d'après la thèse du Dr Laurent Vecellio [161].

Un résumé des caractéristiques des trois classes de générateurs d'aérosols liquides est présenté dans le tableau 3 qui suit.

Tableau 3 : Résumé des caractéristiques des nébuliseurs générant des aérosols liquides et leur utilisation dans les études précliniques chez le PNH.

Principe de fonctionnement	Pneumatique (Jet)	Ultrasonique	Tamis ou à membrane (Mesh)
	[161] [162] 	[163] 	[164] 
Ciblage des VAS et VAI du macaque ?	Oui : possibilité de générer des particules de gamme du micrométrique et submicrométrique	Oui : possibilité de générer des particules de taille micrométrique	Oui : possibilité de générer des particules de taille micrométrique
Compatibilité du nébuliseur avec tout liquide, quelles que soient sa forme galénique et ses caractéristiques rhéologiques ?	Oui : nébulisation de tout produit : suspensions, solutions, visqueuse ou non	Non : inadapté pour la nébulisation des liquides thermosensibles	Non : tout produit sauf des suspensions dont la taille serait supérieure aux diamètre du tamis ou solutions trop visqueuses
Effet de la T° sur le processus de nébulisation ?	Oui : Chute de la T° de l'aérosol généré durant la nébulisation	Oui : Elévation de la T° (vibrations du quartz) de l'aérosol généré durant la nébulisation : détérioration des molécules thermosensibles	Non : aucun effet
La modification du débit de nébulisation influence-t-elle la taille de l'aérosol généré ?	Oui : le débit d'air introduit détermine la taille de l'aérosols généré	Non : aucun effet sur la taille de l'aérosol généré	Non : modification du débit de l'aérosolisation, sans changer la taille de l'aérosol généré

Flexibilité du système pour générer les aérosols ?	Oui : la composition et le choix des éléments constituant le nébuliseur (déflecteur, gicleur, etc) influence la taille des aérosols	Non	Oui : Possibilité de modifier les trous de la membrane pour générer des tailles d'aérosols différentes
Durée de nébulisation	Longue durée de nébulisation	Courte durée de nébulisation	Courte durée de nébulisation
Nettoyage et désinfection du dispositif aisés ?	Oui : facile, dispositif entièrement lavable	Non : délicat à cause du quartz piezo-électrique	Non : délicat à cause de la membrane vibrante
Utilisation dans les études précliniques chez le primate non humain	Très utilisé [18,165]	Peu utilisé	Très utilisé [18,148,166]
Autres (aspect environnemental, sécuritaire)	Volume résiduel important dans le réservoir : recyclage de l'aérosol généré.	Volume résiduel important dans le réservoir : recyclage de l'aérosol généré.	Absence de volume résiduel : pas de recyclage de l'aérosol généré.

I.2.5.2 Générations des aérosols à l'aide des aérosols doseurs

- **Les aérosols doseurs de liquide Metered Dose Inhaler-MDI**

Par opposition aux nébuliseurs, les MDI sont de manière globale plus largement connus et utilisés par le grand public. Ils sont vendus en pharmacie, en tant que système d'inhalation utilisé pour le traitement des pathologies respiratoires. C'est le cas, par exemple, des aérosols doseurs comme la Ventoline® ou des aérosols de corticoïdes, par voie inhalée, utilisés dans le traitement des pathologies pulmonaires chroniques telles que l'asthme.

Ces MDI appartiennent à la catégorie des « préparations pharmaceutiques pressurisées » de la pharmacopée européenne. Ils sont prêts à l'emploi.

Les MDI sont composés d'un gaz propulseur de type HydroFluoroAlcanes, HFA, [167].

Ils se composent d'un réservoir contenant le médicament sous forme liquide, d'une valve doseuse, d'un système d'activation avec l'orifice de sortie de l'aérosol muni d'une

canule et enfin d'une formulation galénique comprenant le principe actif, sans oublier des excipients, et un gaz propulseur. Le gaz propulseur permet le mélange et la dissolution du principe actif et des excipients et l'expulsion des particules d'aérosols pour l'inhalation, lors d'une phase d'inspiration par le patient (Figure 44) [2,168].

Ces systèmes nécessitant une bonne coordination main- poumon (synchronisation entre l'activation de la valve délivrant les aérosols et l'inspiration du patient), leur utilisation chez l'enfant nécessite des chambres d'inhalation.

Ces chambres sont des tubes en plastiques avec deux embouts (un embout vers le dispositif d'aérosol et l'autre vers le patient) qui ont pour rôle de retenir les grosses particules et de permettre l'inhalation aisée des petites particules dans les poumons. Ces chambres diminuent la vitesse des particules s'impactant à l'entrée de la sphère ORL. Le dépôt oropharyngé est ainsi diminué et le dépôt pulmonaire favorisé [2].

Les MDI peuvent être manuels ou auto-déclenchés en relevant un levier du dispositif d'inhalation. Il s'agit des dispositifs dits Autohaler®. Ces dispositifs sont dépourvus de compteur de doses d'aérosols.

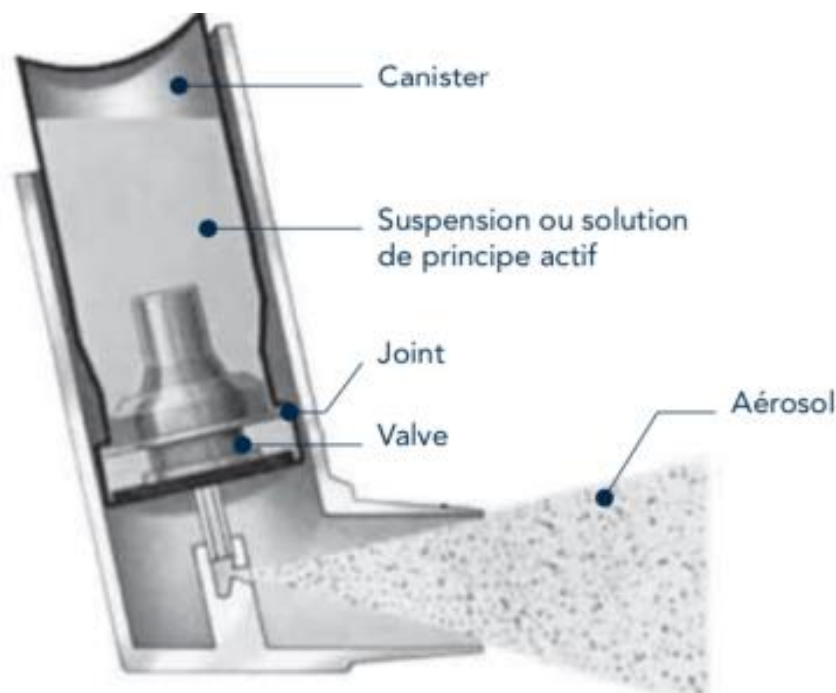


Figure 44 : Schéma du mode de fonctionnement d'un MDI présenté par Dubus et al., 2020 [132].

- **Les aérosols doseurs de poudres -Dry Powder Inhaler (DPI)**

Ces derniers dispersent des aérosols de particules solides inhalés par le patient. Ils sont dépourvus de gaz propulseur. Ils peuvent être multidose ou monodose (capsule par exemple). Ils possèdent un système d'aérosolisation, un mécanisme de

désagrégation (« grating » sur le schéma de la figure 45) et un adaptateur pour diriger le sens du flux d'aérosols généré dans la bouche du patient [2,169].

Ces systèmes ont l'avantage de ne pas nécessiter de coordination main-bouche. C'est la respiration qui déclenche l'administration de la dose.

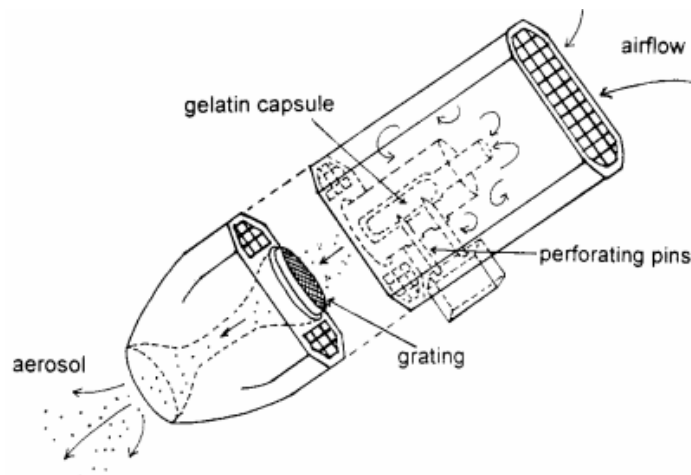


Figure 45 : Fonctionnement et composition d'un DPI d'après Dalby et al.,2006 [169].

I.2.6 Les différents types de particules d'aérosols

Les aérosols auxquels l'humain peut être exposés sont scindés en deux catégories : les aérosols non thérapeutiques et les aérosols médicamenteux. Les aérosols non thérapeutiques peuvent être infectieux, toxiques ou non toxiques en fonction de la dose d'exposition aux particules inhalées.

- **Les aérosols médicamenteux**

Les aérosols médicamenteux ou de solutions thérapeutiques sont générés par les dispositifs précédemment décrits pour administrer les médicaments au contact des voies aériennes : C'est l'aérosolthérapie. Labiris et Dolovich., 2003 [11] indiquent que la plupart des aérosols thérapeutiques sont polydispersés.

L'intérêt de l'aérosolthérapie est de déposer dans les voies aériennes supérieures et inférieures, un médicament qui a, dans ce cas, un effet topique (local) et un effet systémique (général). Il peut s'agir d'un bronchodilatateur, d'un antibiotique d'un antifongique, ou même d'un anticorps. Ces derniers constituent les principes actifs, qui sont invariablement accompagnés d'excipient (s) dans les médicaments.

Les aérosols **non thérapeutiques** peuvent être :

- **Les Bioaérosols**

Il n'y a pas de définition consensuelle pour les bioaérosols, cependant Duchaine et Chad Roy., 2022 [170] définissent les bioaérosols comme étant des particules d'aérosols qui contiennent une constellation de composants biologiques comme des bactéries et des virus. Il est généralement admis que les particules d'aérosols biologiques se déplacent rarement dans l'air sous forme isolée, mais plutôt en amas. Ghimire *et al.*, 2019 [124] complètent cette définition en expliquant que les bioaérosols sont des particules d'origine biologique présentes dans l'atmosphère et qui peuvent être formées à partir de n'importe quel processus impliquant des matériaux biologiques.

Ils sont composés d'organismes vivants (virus, bactéries etc.) et non vivants (pollens, débris de plantes) en suspension dans l'air, comme décrit dans les cercles marrons de la figure 46. Ils possèdent des caractéristiques et des effets divers. Leur dépôt dans l'organisme est fonction de leurs propriétés physico-chimiques, des conditions environnementales (température, humidité). Les gouttelettes de bioaérosols ont un diamètre défini (le diamètre de la gouttelette est représenté en trait plein noir dans la figure 46) et ils contiennent en leur sein des agents biologiques ou toxines qui ont eux-mêmes leur diamètre intrinsèque (le diamètre de l'agent biologique est représenté en pointillé noir sur le schéma qui suit).

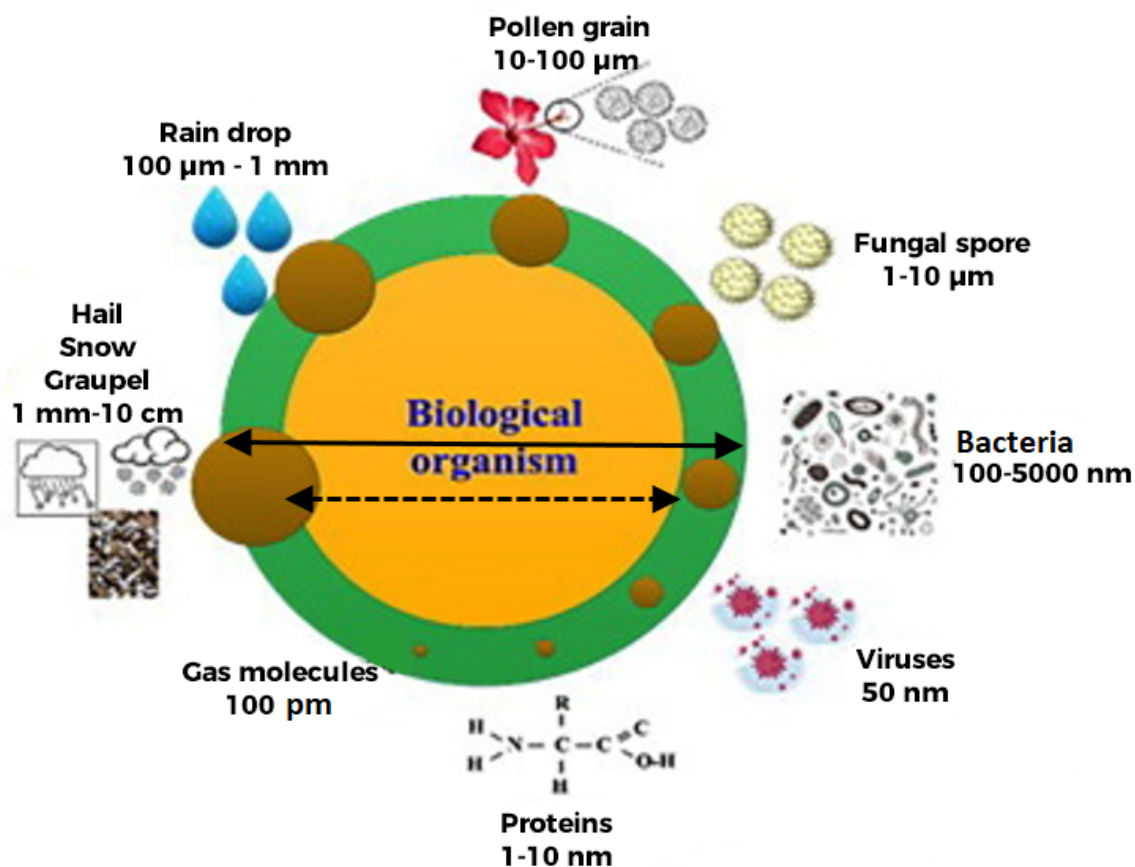


Figure 46 : Représentation d'une gouttelette de bioaérosol d'après Gollokata et al., 2021 [171].

Le schéma modifié, d'après Gollokata *et al.*, 2021 [171], représente une gouttelette de bioaérosol en vert (le diamètre est indiqué à l'aide d'un trait noir plein). La gouttelette peut contenir à l'intérieur une particule d'agent biologique, représentée en jaune, dont le diamètre est illustré en pointillé noir. Les différents agents biologiques (virus, bactéries, spores etc.) sont représentés en marron.

Les bioaérosols de particules biologiques vivantes, [5] peuvent être infectieuses, car chargées alors de bactéries, de virus ou de champignons.

Les bioaérosols ont une granulométrie variée. La courbe semi logarithmique issue de Labiris et Dolovich.,2003, représente en abscisses la taille des particules non thérapeutiques exprimée en μm en fonction des fractions déposées en ordonnée.

La taille des bioaérosols d'agents infectieux viraux, bactériens et fongiques (spores de champignons) se situe de façon croissante entre 0,05 et 500 μm (Figure 47).

La taille maximale des bioaérosols peut être $> 0,1$ mm pour certaines grosses particules de pollen [124].

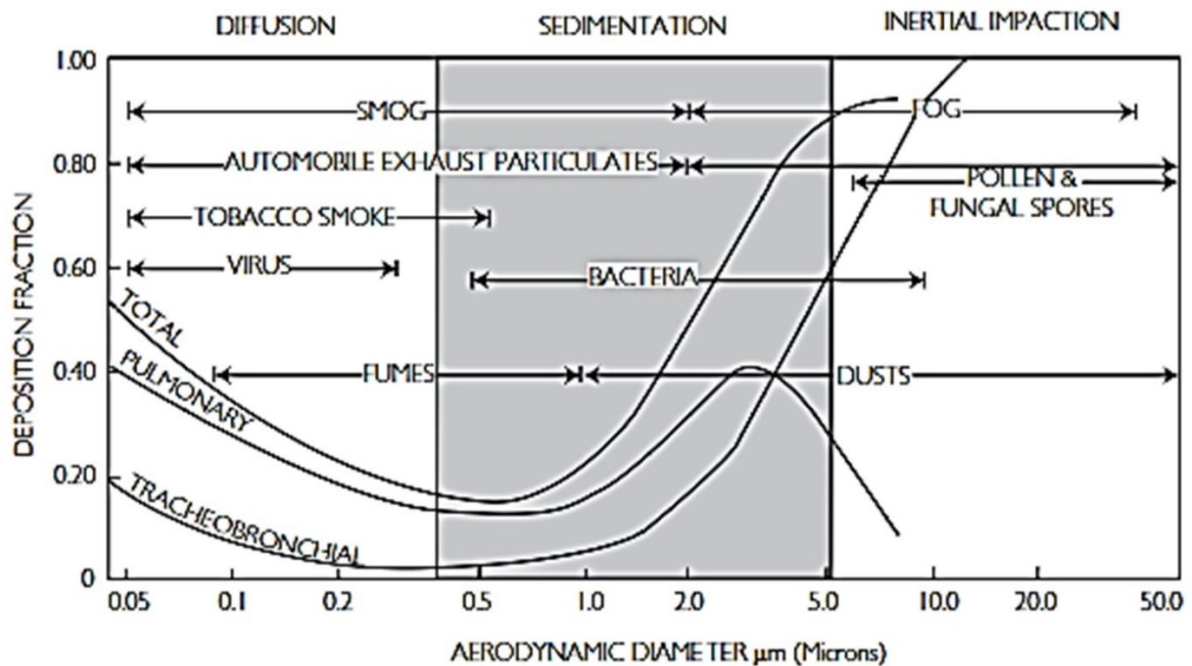


Figure 47 : Représentation des différentes tailles d'aérocontaminants et les 3 mécanismes physiques de dépôts impliqués d'après Labiris et Dolovich., 2003 [11]. Les bioaérosols ont des tailles comprises entre 0,05 et 500 μm .

- **Aérocontaminants ou particules d'aérosols de l'air ambiant**

Il s'agit des aérocontaminants tels que les polluants atmosphériques, les pollens, ou les poussières etc).

Les pollens et les poussières ont les plus grosses tailles de particules.

Les plus petites tailles de particules sont attribuables aux particules de fumée de tabac, le brouillard (smog) et les fumées industrielles provenant des usines ou du transport [11]. Ces particules peuvent avoir des effets sur la santé et être responsables de pathologies telles que la BPCO.

Les particules de l'air ambiant extérieur ou intérieur peuvent être classées en deux catégories de polluants en fonction de leur origine anthropique ou naturelle : les particules « vivantes » et les polluants chimiques [172] (Cf. Figures 46 et 47).

La présence et la concentration des particules de l'air ambiant, varient en fonction des saisons et de la météo.

- **Particules d'aérosols provenant des voies respiratoires humaines**

L'Homme peut exhaler et émettre physiologiquement des particules d'aérosols lors de différentes activités quotidiennes. En effet, les particules peuvent être générées et diffusées lors de quatre activités humaines, primordiales et physiologiques (Figure 48) [8,173-175]: la respiration, la parole, la toux [176,177], les postillons et les éternuements. Les particules de postillons et d'éternuements sont des particules de Flügge) [174] [96], [5,9].

Gralton *et al.*,2011 [8] indiquent que les particules expulsées lors des activités mentionnées ci-dessus, ont une taille comprise entre 0,05 et 500 μm chez les êtres humains atteints d'infections. Chez les personnes saines, les particules émises ont une taille de 0,01 à 500 μm .

Ces aérosols peuvent couvrir une distance allant jusqu'à 1,5 m de l'émetteur. Les grosses particules émises ($> 5 \mu\text{m}$) (fortement concentrées), sont concentrées dans la zone la plus proche de l'émetteur, mais les particules plus petites ($< 5 \mu\text{m}$) peuvent aller à une distance supérieure à 1,5 m [174], comme illustré dans la figure 48.

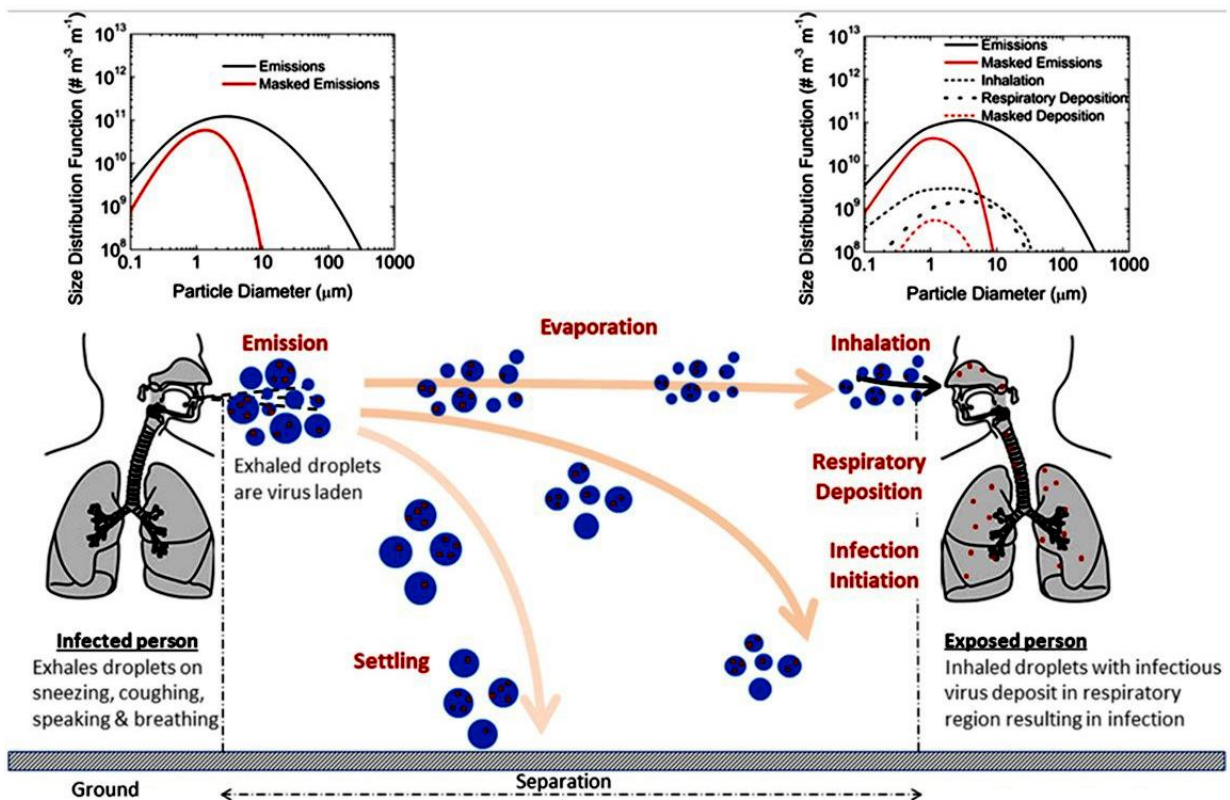


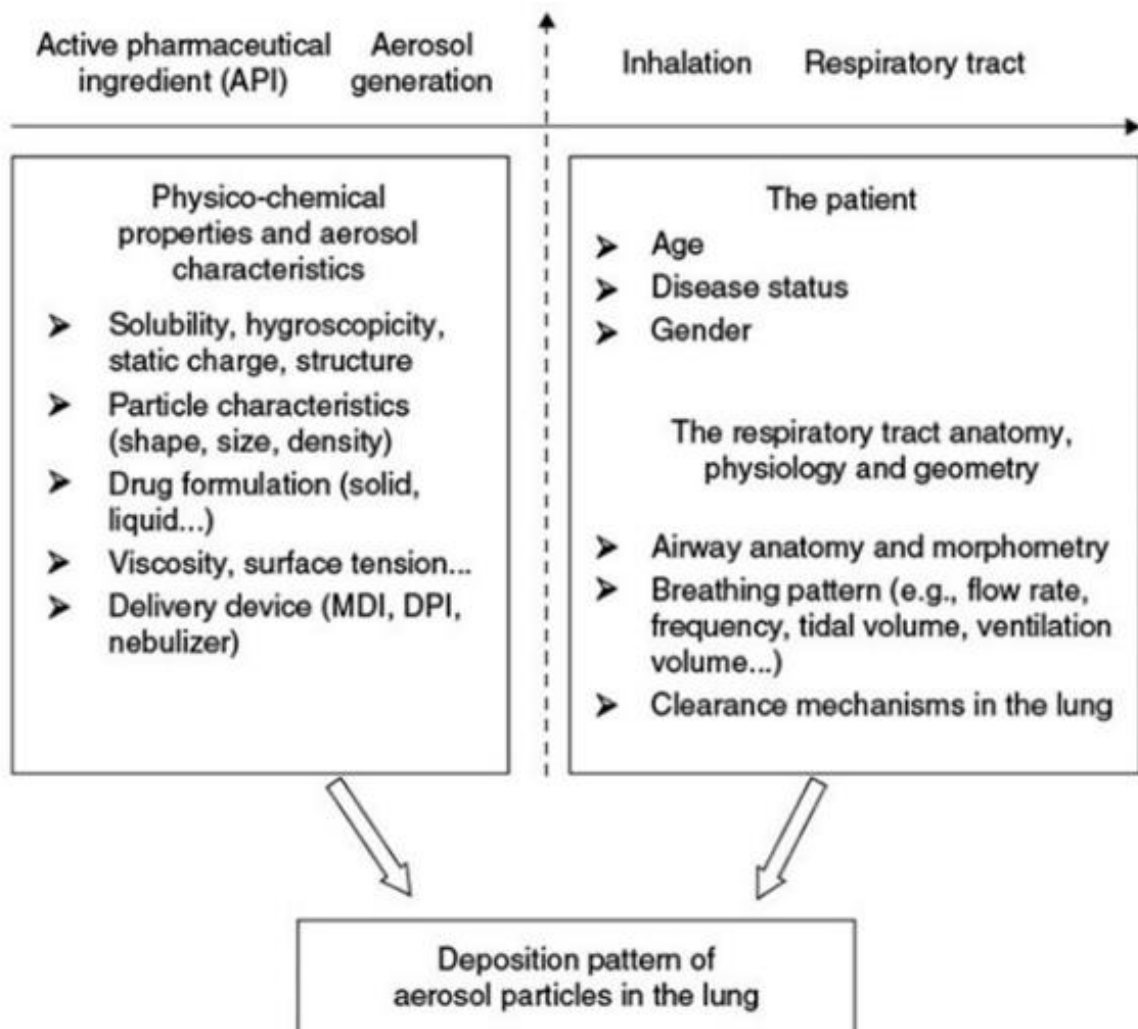
Figure 48 : Schéma d'après Dhawan et Bismas .,2021 [173] illustrant la trajectoire des particules d'aérosols émises par une personne infectée (émetteur) durant les activités quotidiennes et leur potentielle transmission à un individu exposé.

I.2.7 Dépôts des aérosols *in vivo* chez les PNHs et chez l'Homme

I.2.7.1 Généralités sur les dépôts des aérosols *in vivo*

Différents facteurs intrinsèques au patient recevant l'aérosols et d'autres extrinsèques (paramètres physico-chimiques de l'aérosol) influent sur le dépôt des aérosols. Jaafar Maallej *et al.*, 2009 [178] citent dans le tableau qui suit ces différents facteurs.

Tableau 4 : Facteurs influençant le dépôt des aérosols dans les poumons, tableau issu de l'article de l'article de Maalej *et al.*, 2009 [178].



I.2.7.2 Dépôts chez l'Homme des aérosols en fonction de leurs tailles

Le dépôt des aérosols dans les voies respiratoires est bien décrit chez l'Homme (Figure 49). Il est admis en science des aérosols, que chez l'Homme adulte, les particules de diamètre supérieure à 5 μm (MMAD), se déposent dans les voies aériennes supérieures (VAS) et les particules ayant un diamètre aérodynamique situé entre 2 et 5 μm se déposent dans les voies aériennes inférieures (Figure 49). Les particules entre 0,5 et 2 μm en termes de diamètre aérodynamique se déposent dans les alvéoles [179].

Les particules submicroniques ayant un diamètre aérodynamique compris entre 0.01 μm et 0,5 μm peuvent se déposer dans les voies de petits calibres mais elles sont majoritairement exhalées.

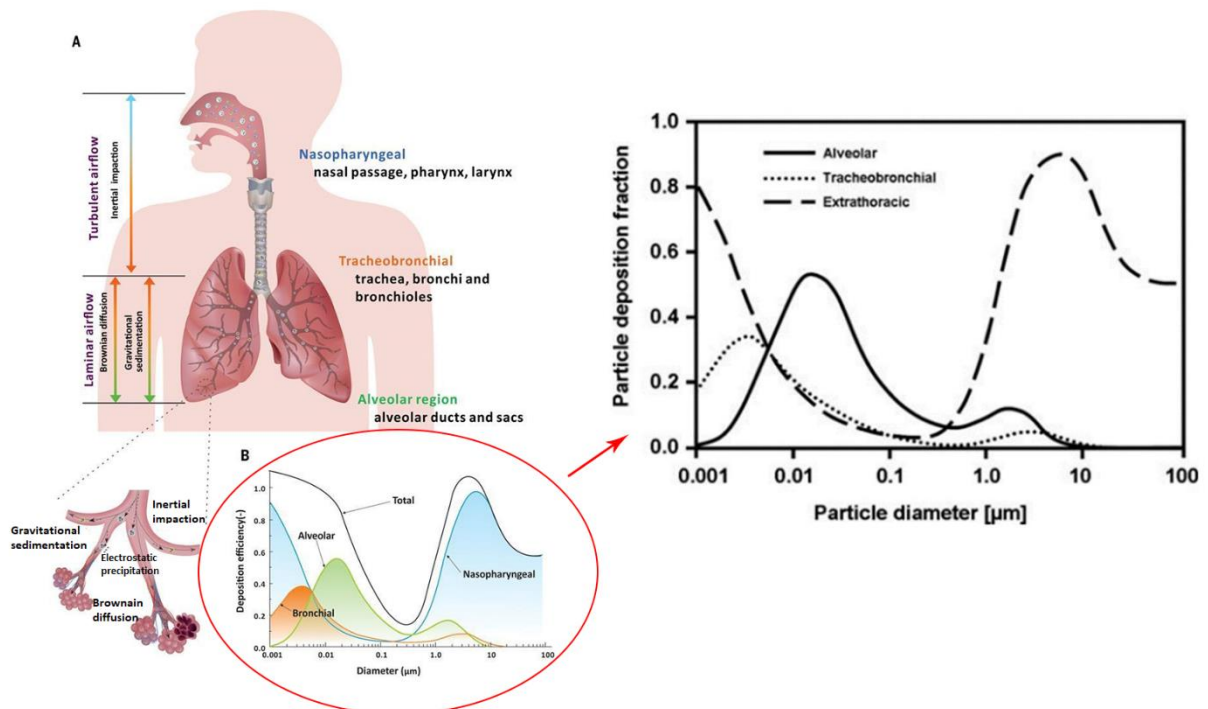


Figure 49 : Dépôts des particules d'aérosols dans le tractus respiratoire humain en fonction de la taille de l'aérosol.

La figure de gauche est d'après Wang et al., 2021 [180] et celle de droite qui est un zoom de la distribution des aérosols dans les voies aériennes provient de Henning et al., 2010 [181].

Il existe également chez l'Homme, des courbes ICPR (International Commission on Radiological Protection.) ou CIPR (Commission Internationale de Protection Radiologique) de prédiction du dépôt des aérosols en condition d'inhalation dans l'air ambiant. En fonction de leur taille, ces courbes indiquent et prédisent la distribution locorégionale des aérosols dans les Voies Aériennes Respiratoires (VAR) humaines en

fonction de la taille des particules exprimée en μm . Il n'existe pas d'équivalent pour le PNH. Le tableau 5 proposé par cette commission, décompose et compartimente les VAS et les VAI ainsi que leurs principales fonctions. Il décrit également les principales cellules constituant les épithéliums de ces voies.

Tableau 5 : Estimation des zones de dépôts des aérosols chez l'Homme, selon les courbes ICPR, tableau modifié [182].

Fonction	Cytologie (épithélium)	Nombre de générations	Anatomie	Régions utilisées dans le modèle		Zones (air)	Localisation	Surface des voies respiratoires	
				Nouveau	Ancien [*]				
Conditionnement de l'air; température, humidité, épuration; clairance rapide des particules; conduction de l'air	Epithélium respiratoire avec cellules calciformes Types cellulaires: ● Cellules ciliées ● Cellules non ciliées: – cellules calciformes – cellules à mucus (sécrétantes) – cellules séreuses – cellules à bordure en brosse – cellules endocrines – cellules basales – cellules intermédiaires	0 1 2 - 8		ET ₁		Conditionnement	Extrathoracique	$2 \times 10^{-3} \text{m}^2$	
				ET ₂	LNTH			(N-P)	$4,5 \times 10^{-2} \text{m}^2$
				BB				(T-B)	$3 \times 10^{-2} \text{m}^2$
				bb					$2,6 \times 10^{-4} \text{m}^2$
Conditionnement de l'air; échanges gazeux; clairance très lente des particules	Epithélium respiratoire composé essentiellement de cellules claires (sécrétantes) et de quelques cellules ciliées	16 - 18	Bronchiales respiratoires	LNTH ¹		Conduction	Thoracique	$7,5 \text{m}^2$	
Echanges gazeux; clairance très lente des particules	Cellules épithéliales alvéolaires squameuses (type I) couvrant 93% de la surface alvéolaire Cellules épithéliales alvéolaires cuboïdes (type II), productrices de surfactant, couvrant 7% de la surface alvéolaire Macrophages alvéolaires	**	Canoux alvéolaires	AI	P	Zone d'échanges gazeux		Pulmonaire	140m^2
		**	Sac alvéolaires			$0,175 \times 10^{-3} \text{m}^3$ (espace mort anatomique)			
			Vaisseaux lymphatiques		L	$0,2 \times 10^{-3} \text{m}^3$			

* Précédent modèle de la CIPR.

** Non dénombré en raison d'informations imprécises.

1 Les ganglions lymphatiques sont situés uniquement dans la région BB, mais drainent les régions interstitielles bronchique et alvéolaire, ainsi que la région bronchique.

VAS

VAI

La figure 50 qui suit résume et illustre le dépôt des aérosols après une nébulisation. Il est important de noter que la dose nominale administrée dans le dispositif d'inhalation est différente de la dose délivrée et distribuée dans les voies aériennes respiratoires. En effet différentes pertes liées au système d'administration des aérosols (Figure 50) sont observées.

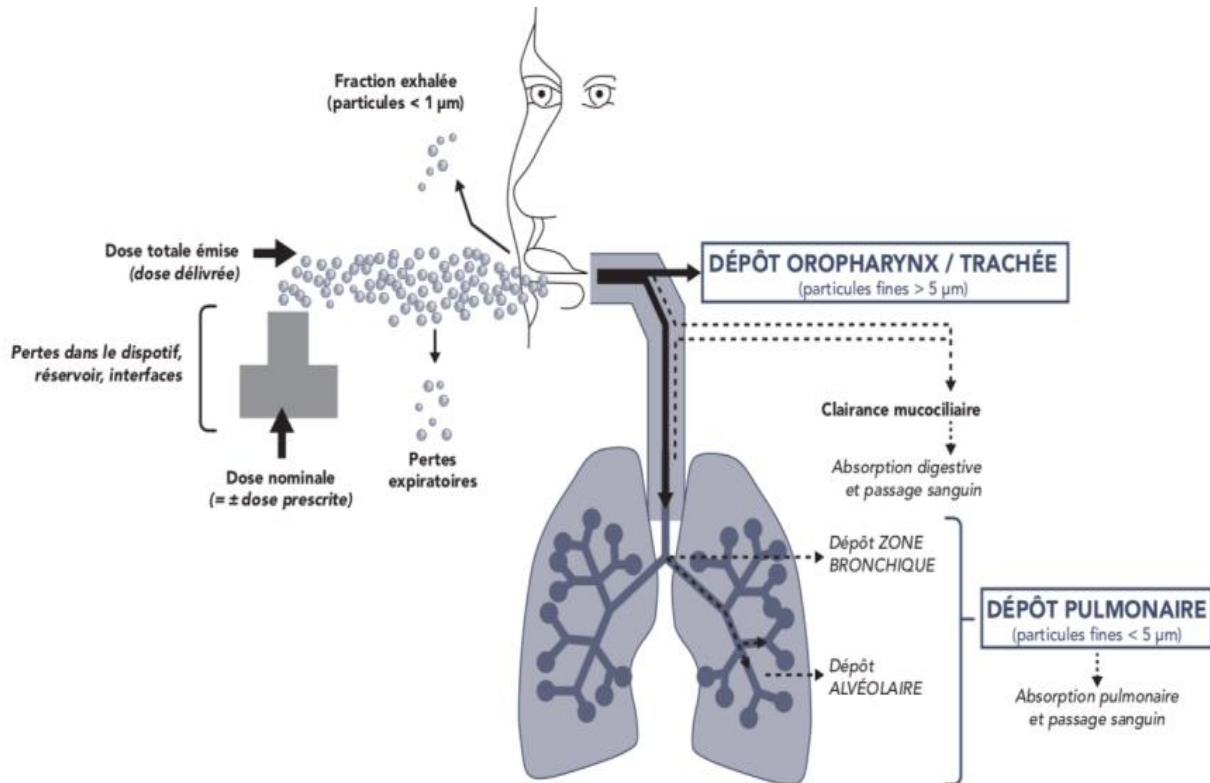


Figure 50 : Cycle de vie du dépôt de l'aérosol produit et administré par un dispositif d'aérosolisation, schéma d'après Dubus et al., 2020 [132].

I.2.7.3 Mécanismes physiques de dépôt des aérosols chez l'Homme

Toute particule inhalée est soumise à des forces, conditionnant sa trajectoire de dépôt dans les voies aériennes [183]. C'est en 1935, que pour la première fois, le modèle de Findeisen a pu décrire à l'aide de différentes équations et calculs physiques, la probabilité de dépôts des particules en suspension dans l'air au sein des voies respiratoires [17,184]. Le comportement des particules y est décrit en fonction des mécanismes de dépôts. Darquenne, 2012 [185] conclut qu'il est consensuellement connu que les principaux mécanismes impliqués dans le transport des aérosols dans l'appareil respiratoire humain sont majoritairement la diffusion ou mouvement Brownien, l'impaction inertielle et la sédimentation gravitationnelle, comme l'avait décrit Findeisen (Cf. Figure 51 et tableau 6) [14,16,185]. Il existe également, mais de façon marginale, les mécanismes de dépôts d'aérosols par flux turbulents, l'interception et la précipitation électrostatique.

Nous allons donc nous focaliser sur les mécanismes principaux de dépôts :

- **L'impaction inertielle** concerne les particules de plus de 5 μm . Elle se produit dans les voies aériennes supérieures (puis dans les bifurcations des voies aériennes inférieures, comme les 10 premières générations pulmonaires). Ce mécanisme se produit chaque fois que les flux d'air changent de direction et que la particule d'aérosol dévie de la ligne de courant (figure 51).
Ce mécanisme est fonction de la vitesse du flux d'air dans les voies respiratoires. La probabilité de dépôt d'une particule par impaction est d'autant plus importante que la masse de la particule et le débit d'air sont importants [185].
- La **sédimentation gravitationnelle** concerne les petites particules de diamètre compris entre 1 et 8 μm [185]. Elles ont une forte probabilité de se déposer dans le tractus respiratoire par sédimentation. Ces particules se déposent sous l'action de la gravité. Ce mécanisme a lieu dans la zone bronchique du poumon : dans les petites voies respiratoires et la région alvéolaire [14,185]. Zanen et Laube., 2001 [186] affirment qu'il s'agit du principal mécanisme de dépôts des particules $< 3 \mu\text{m}$ et $> 0,5 \mu\text{m}$ dans les voies respiratoires de petits calibres et les alvéoles pulmonaires. La probabilité de dépôt d'une particule par sédimentation augmente avec la taille des particules et avec l'augmentation du temps que passe la particule dans les voies respiratoires et les alvéoles [16].
- La **diffusion ou mouvement Brownien** implique les très petites particules, dites particules ultrafines ($< 0,5\mu\text{m}$) [183] qui peuvent se déposer dans les voies respiratoires de petits calibres et dans la partie périphérique du poumon (acinus pulmonaire), où la vitesse des flux d'air est ralentie. Durant ce mécanisme, les particules de petite taille entrent aléatoirement en collision avec les particules du flux d'air (Figure 51). La diffusion est majoritaire lorsque la taille des particules diminue [185].

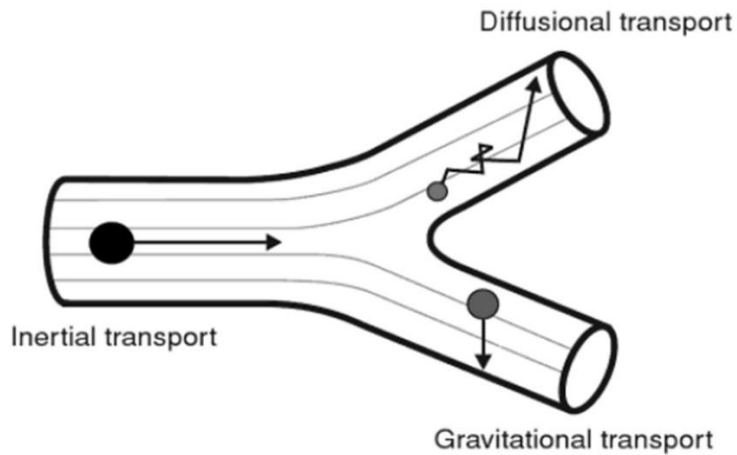


Figure 51 : Principaux mécanismes de transport des particules (représentées en rond noirs et gris) dans les voies aériennes humaines, d'après Heyder et Svartengren., 2001 [17].

Le sens des flèches illustre la trajectoire des particules en fonction du flux d'air, de l'écoulement et de la section de la géométrie des voies aériennes.

- **Dépôt par flux turbulent** : il est relatif au dépôt des aérosols dans les VAS et les voies aériennes de gros calibres telles que les bronches, suite à des mouvements de fluide en régime turbulent, obligeant les particules à changer continuellement de trajectoire sans suivre le sens du fluide.
- **L'interception** est un phénomène négligeable qui concerne par exemple des particules allongées (fibre par exemple) qui se déposent au niveau des parois des voies respiratoires dans le sens du mouvement d'air.
- La **précipitation électrostatique** concerne les particules d'aérosols possédant une charge électrostatique, qui vont se déposer au niveau des parois des voies aériennes.

En somme, comme l'attestent Heyder et Svartengren ., 2001 [17], on peut retenir que les mécanismes de dépôt d'une particule inhalée dans les voies respiratoires sont fonction de 4 paramètres clés :

- La taille de la particule,
- La vitesse d'entrée dans le flux d'air,
- Le temps de présence dans les voies respiratoires,
- La densité.

Tableau 6 : Résumé des principaux mécanismes qui régissent le dépôt des aérosols dans les voies aériennes.

Phénomènes physiques	Tailles d'aérosols concernés	Caractéristiques principales du phénomène
<p>Sédimentation : mécanisme dépendant du temps [187].</p>	<p>Particules dont le diamètre aérodynamique se situe entre 1 et 8 μm [51].</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dépôt des particules sous l'effet de la gravité. - Le dépôt par sédimentation augmente lorsque la vitesse du gaz diminue et lorsque la distance entre la paroi des voies respiratoires et la particule diminue (exemple : petites voies respiratoires et les acini). - Le phénomène est majoritaire quand la taille des aérosols augmente [51,188].
<p>Impaction : mécanisme dépendant de la vitesse [185].</p>	<p>Particules > 5μm [185].</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Phénomène se produisant lorsque les aérosols, dans les voies aériennes respiratoires changent de direction - Le phénomène d'impaction s'accroît lorsque la vitesse augmente, c'est-à-dire lors d'un débit inspiratoire élevé ou lorsqu'une particule traverse une voie aérienne de petit diamètre et de géométrie complexe (pharynx ou bifurcation des voies aériennes par exemple). - Le phénomène est majoritaire quand la taille des aérosols augmente [51,188].

Diffusion : mécanisme dépendant du temps [185]	Petites particules < 0.5 µm.	- Les aérosols de petite taille, ont un mouvement aléatoire qui explique leur dépôt dans les régions comme l'acinus. - Le phénomène est majoritaire quand la taille des aérosols baisse [51,188]
--	------------------------------	---

I.2.7.4 Dépôts des aérosols chez le PNH

Le profil de distributions théoriques des aérosols dans le tractus respiratoire pour les humains, ne s'applique pas totalement aux distributions de dépôts chez le PNH en raison de certaines différences anatomiques des voies respiratoires comme par exemple la longueur de la trachée, la lobation pulmonaire différente et la position du larynx différente chez le PNH. L'armée américaine (National Bio-Defense Institute for the US-Department of Homeland Security and Countermeasures Center), a publié une étude chez le macaque qui montre que les particules de très petites tailles mono-dispersées (MMAD de 1,7 et 3,6 µm) se déposent majoritairement dans les VAI et les particules de grandes tailles (7,4 et 11, 8 µm) se déposent quasi exclusivement dans les VAS des macaques [27]. Les conclusions de l'étude de Cheng *et al.*, 2008 [138] vont dans le même sens pour le dépôt de gouttelettes d'aérosols dans les voies aériennes du macaque.

I.3 Pharmaco ou Toxicocinétique des particules inhalées

La pharmacocinétique concerne le devenir des aérosols thérapeutiques. La toxicocinétique concerne les aérosols non thérapeutiques, les bioaérosols ou les aérosols d'agents toxiques ou infectieux. Cette cinétique comprend l'administration, la distribution, le métabolisme et l'élimination des particules. On peut résumer ces 4 phénomènes sous l'acronyme ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation, Élimination) (Figure 52). L'ADME est fonction de l'interface d'administration et de l'outil d'administration des aérosols

- **Absorption**

Pour les aérosols, le processus d'absorption est l'inhalation. Il peut s'agir d'une absorption par voie oro-nasale, nasale, intra-trachéale, ou par la tête entière dans le cas des modèles animaux uniquement. La « voie inhalée » ou « voie aérienne » est

une voie d'absorption des produits aérosolisés. Les particules non déposées sont dites exhalées.

- **Distribution**

Les particules inhalées se distribuent dans les voies aériennes supérieures et/ou dans les voies aériennes inférieures. Le dépôt des aérosols est lié à différents facteurs présentés dans le chapitre précédent.

Dans le cadre des études précliniques chez les Primates Non Humains, lorsque l'administration est oro-nasale ou par tête entière, l'aérosol peut s'adsorber sur le pelage de l'animal et potentiellement diffuser par le système cutané. Ceci n'est pas le but recherché.

- **Métabolisation**

De nombreux facteurs vont influencer la métabolisation ou biotransformation de l'aérosol. Selon sa composition, il faudrait penser à la métabolisation du vecteur, selon sa nature, sa composition, sa concentration et son temps de demie vie dans l'organisme. Puis penser à la métabolisation de l'actif qui est dans l'aérosol. Savoir si le ou les métabolites obtenus dans l'organisme est ou sont encore actif (s). Savoir si le métabolisme a entraîné une fonctionnalisation permettant au métabolite de se lier aux tissus des différentes cavités où il est présent. Savoir s'il passe dans le sang et peut atteindre le foie où, sous l'effet des enzymes de métabolisation, cytochromes P450, par exemple, il peut donner des métabolites hydroxylés capables de se transformer en époxyde qui peuvent former des liaisons covalentes avec des éléments constitutifs du cytoplasme ou du noyau des cellules dans les tissus [189].

Les voies aériennes et les cavités nasales et buccales n'étant pas stériles, il peut aussi se produire une métabolisation par la flore microbienne qui s'y trouve. Ces métabolites s'ajoutent à ceux formés *in situ* dans le tractus digestif et dans le foie [189].

- **Élimination**

Les aérosols inhalés sont éliminés en fonction de la bio-distribution locorégionale (ciblée à un organe) ou systémique.

L'élimination concernera potentiellement un certain nombre de métabolites qui pourront suivre plusieurs voies d'élimination : exhalation par expiration, les fèces pour ce qui est dégluti, les urines pour ce qui est filtré au niveau glomérulaire et pas réabsorbé au niveau tubulaire. Il est important de ne pas oublier la voie cutanée et le transfert de l'actif et de ses métabolites éventuels dans les phanères. La présence de cils vibratiles et de mucus, a un rôle important dans la clairance et l'élimination des aérosols. En effet, les études précliniques *in vivo* [190] et *in vitro* [191] démontrent que l'épaisseur du mucus et la clairance mucociliaire ajoutées aux propriétés rhéologiques (tension de surface, viscosité), fonctionnelles, et physico-chimiques (température et

humidité [192]) conditionnent le dépôt, donc la rétention et ou l'élimination des particules.

Selon la nature chimique et ou biologique des composants de l'aérosol, l'élimination peut prendre de quelques heures à plusieurs jours. Selon la masse molaire de l'actif, il pourrait aussi entrer dans le cycle entéro-hépatique, en passant du foie dans l'intestin via le canal cholédoque dans la bile secrétée par la vésicule biliaire. Si le métabolite emprunte ce cycle, le temps que l'actif passera dans l'organisme sera considérablement rallongé. Mais l'essentiel des composants de l'aérosol finira par être éliminé, soit sous forme inchangée, ou sous forme de métabolite (s) libre (s) ou de métabolite (s) fixé (s) par exemple à des petits peptides ou à des substances endogènes sous forme de métabolite conjugué.

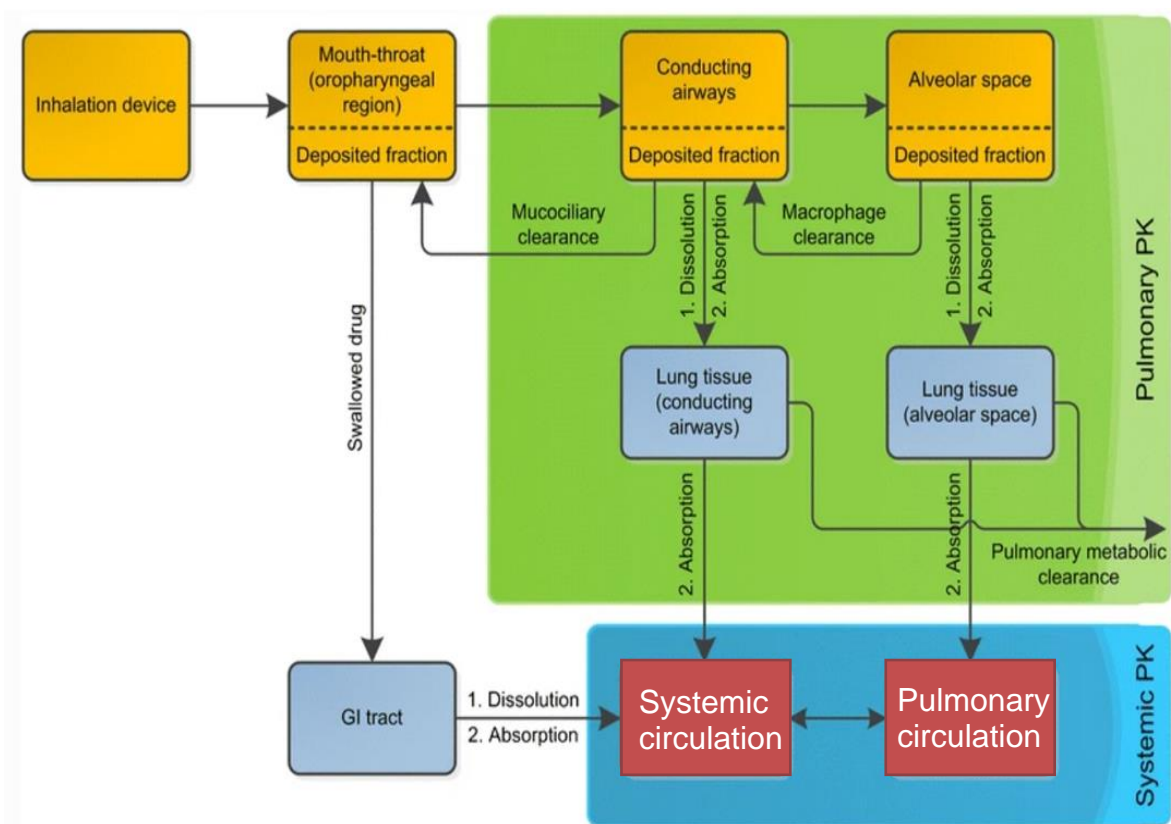


Figure 52 : Représentation schématique d'après Borghardt, et al., 2015 [193] de la pharmacocinétique d'un aérosol thérapeutique après inhalation.

Les rectangles orange représentent les compartiments de dépôts des particules, les rectangles bleu clair, le compartiment d'absorption, les rouges la circulation sanguine, les verts la région pulmonaire et le bleu foncé la pharmacocinétique systémique. L'absorption pulmonaire se passe vers le tissu pulmonaire et également vers le compartiment systémique.

Dans les pages suivantes, nous présentons notre revue de la littérature sur les systèmes d'administration d'aérosols biologiques, en particulier les aérosols infectieux

dont ceux de la menace bioterroriste, dans les modèles de PNH. Cette revue mentionne les différents systèmes d'administration d'aérosols biologiques, au cours des 20 dernières années, chez le PNH et justifie le choix de ce modèle animal pour le type d'étude présenté dans cette thèse.

I.4 Revue de littérature, soumise dans le journal *Pharmaceutics*

« Airborne pathogen agents administration in non-human primates »

Justina Rose Creppy^{1,2*}, Benoit Delache¹, Julien Lemaitre¹, Branka Horvat⁴, Laurent Vecellio^{2,3} and Frédéric Ducancel¹

¹ Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Center for Immunology of Viral, Auto-immune, Hematological and Bacterial Diseases (IMVA-HB/IDMIT), 92265 Fontenay-aux-Roses, France; benoit.delache@cea.fr; julien.lemaitre@cea.fr; frederic.ducancel@cea.fr

² Université de Tours, Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires, INSERM U1100, Tours, France; laurent.vecellio@univ-tours.fr

³ Université de Tours, Plateforme Scientifique et Technique-Animalerie (PST-A), Tours, France

⁴ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France; branka.horvat@inserm.fr

* Correspondence: authors: Justina Rose Creppy, Justina.creppy@cea.fr; Frédéric Ducancel, frederic.ducancel@cea.fr

Abstract: The respiratory system is a privileged entry point for airborne pathogens. The use of animal models to predict aerosol deposition and study respiratory disease pathophysiology is therefore important for research and a prerequisite to test and study the mechanism of action of treatment. The aim of this review is to provide an overview of the state of the art of airborne pathogen agents aerosol studies performed in non-human primates (NHPs). Herein, we present and discuss the deposition of aerosolized biologics: bacteria, viruses, protein toxins. In this review, we present important advantages of using NHPs as a model for inhalation studies. In addition, we demonstrate that deposition in the respiratory tract is a function of aerosol size and that the technique of administration influences the biological activity and site of deposition. Finally, we illustrate the influence of the site where the aerosol particles are deposited in the respiratory tract at the development of the pathophysiological effect in NHPs. We conclude that the wide range of methods used for the delivery of biologics to NHP respiratory airways is associated with varying doses and deposition profiles in the airways.

Keywords: aerosols; biologics; non-human primates; inhalation; nebulizers

Introduction

Aerosols are everywhere in our daily environment. They have been an important issue for centuries, especially as the respiratory tract is a principal and natural entry route for various respiratory pathogen agents and for the administration of different therapeutics [96].

Aerosols can enter the respiratory tract (including upper respiratory tract [URT] and lower respiratory tract [LRT]) in the form of various bioaerosol pathogens, allergens, dust, pollen, toxins or, frequently, as secondary aerosols from air pollution [5]. Aerosols can also be used to treat various pulmonary diseases in the form of aerosol therapy. Indeed, drugs delivered to the respiratory tract have the advantage of targeting the site of action and thus reducing side effects [194].

Aerosols can also be considered as a route/mode of transmission, since they can be generated and spread during everyday activities such as: breathing, coughing, sneezing [96], and talking [5]. Indeed, Galton *et al.* [8] concluded that expelled particles, range in size from 0.05 to 500 μm for humans with bacterial or viral infections, whereas healthy people generate smaller particles between 0.01 and 500 μm [8]. When inhaled, aerosol deposition at different regions of the respiratory tract is a function of their size [15].

Aerosol studies are thus important for research on human-to-human deposition and transmission of airborne infectious agents. Especially, the SARS-CoV-2 pandemic imposed the scientific community to reconsider the importance of the aerosol transmission of viruses [174]. It also raises the question of the modes of transmission of airborne bioaerosols and the means of primary prevention (masks or optimal control of ventilated patient rooms), especially for healthcare workers [7,195].

It is undeniable that a good understanding of aerosolization techniques and the existing of appropriate tools for studies on the pathways of aerosol deposition as well as routes of transmission are critical for the further development of the field of aerosol studies. Preclinical models (mathematics, *in vitro*, and animal models) are paramount for mimicking natural airway aerosol exposure and to address the pathophysiology of inhaled particles.

Extrapolation of the obtained results to humans requires an appropriate preclinical model for the route and effect of aerosol exposure [27]. Most *in vivo* studies still favour rodents, ferrets, guinea pigs, rabbits, or pigs for inhalation studies for several reasons, such as regulatory approbation, tests costs, animal availability and relevance of the obtained results.

NHPs are animal models with a limited availability but are a relevant animal species for inhalation studies because of their similarities with humans in terms of anatomical structure, respiratory parameters, immune system, and the possibility of reproducing human pathophysiology and infections.

Animal aerosol exposure study consist, first, of the transformation from a powder or a liquid into a form made up of small particles and, second, to their delivery to NHP

airways. Aerosolization techniques for aerosol delivery to NHPs are complex and their advantages and disadvantages are not completely understood.

This synthetic review of the literature focuses on the use of respiratory delivery inhalation in NHPs. It shows the complexity of inhalation studies [196], especially in NHPs, and the need to integrate NHP parameters (physiology, anatomy, ventilation parameters) and the delivery system (interface, the composition of the element to aerosolize, etc). First, we will explain why the NHP is the “gold standard” for aerosol research, highlighting their differences from other animal species and humans. Second, it will non-exhaustively summarise the devices (technologies and aerosolization systems) described in the literature to study the deposition of aerosols using NHP models. Third, the review presents various bioaerosol pathogen agents tested in NHP models.

1. Non-human primate (NHP) for aerosol studies

Animal models have been widely used for aerosol studies, both in therapeutics and infectious disease [197]. Indeed, animal models are necessary to better understand diseases, evaluate the efficacy and toxicity of treatments, and validate countermeasures against bioterrorism. In the case of a bioterrorism attack, Roy *et al.* [12] concluded that the inhalation route is the most probable and presents the highest risk. In the context of aerosol studies, mammalian models are of particular interest, but the respiratory tract varies highly between species, making the choice of the model important depending on the question to be addressed [20,23]. In this first section, we describe the basics of mammalian respiration physiology. In the second, we describe NHP models and their relevance for aerosol studies.

2. Ventilatory parameters

In mammals, respiration allows the delivery of oxygen to tissues and the removal of carbon dioxide through four components: pulmonary ventilation, the exchange of oxygen and carbon dioxide through alveoli, the transportation of oxygen and carbon dioxide, and, lastly, regulatory systems [20].

Ventilation in mammals is achieved through conducting airways: the nasopharynx, mouth, larynx, trachea, and bronchus, progressively subdivided, to inflate alveoli [21]. The lungs are an elastic organ suspended solely by its hilum, from the cranial mediastinum, and move freely within the chest. Contraction and expansion of the thoracic cage during inspiration and expiration allows changes in lung volume due to negative pressure generated in the pleural space between the lungs and chest wall [20]. The depression created during inspiration allows air to flow into the alveoli for gas exchange. Compliance, representing the expansion of the lung per unit increase in transpulmonary pressure, is critical for ventilation. The elasticity of the lungs, determined by elastin and collagen, and surface tension, reduced by surfactant, are key factors of lung compliance. Gas exchange occurs in ventilated alveoli in which

oxygen and carbon dioxide diffuse in opposite directions. Such exchange occurs at the respiratory membrane, which is composed of a layer of surfactant, the alveolar epithelium, a basement membrane, a thin interstitial space, and the capillary endothelial membrane, forming a 0.6- μm exchange structure suitable for gas diffusion [20].

The central nervous system maintains the partial pressure of arterial oxygen (PaO_2) and carbon dioxide (PaCO_2) by acting on ventilation parameters [30]. Respiratory centres are located in the *medulla oblongata* (dorsal and ventral respiratory groups) and pons (pneumotaxic centre) of the brain stem, and rely on central and peripheral receptors. The dorsal respiratory group generates the basic rhythm of respiration, which is modulated by sensory nerves (vagus and glossopharyngeal), the ventral respiratory group, and the pneumotaxic centre [30]. The regulation of ventilation is based on modulation of the breathing rate (respiratory rate) and the depth of breathing (tidal volume).

Blood carbon dioxide or hydrogen ions, indirectly produced by oxygen dissolution, are the main regulators of respiration, whereas oxygen itself has a limited effect on respiratory homeostasis. Anaesthesia globally depresses the respiratory centre and should be carefully chosen when assessing respiratory function in animal models.

The evaluation of respiratory function is useful for describing respiratory diseases and evaluating the efficacy of treatment [30,198]. Measurement of the tidal volume, respiratory rates, minute ventilation, and lung compliance are classically used to evaluate ventilatory function in animal models. Gas exchange relies on ventilatory efficacy, respiratory membrane integrity, and alveolar blood supply. PaCO_2 and PaO_2 measurement are useful for the evaluation of gas exchange, with the PaCO_2 related to ventilation and the PaO_2 primarily reflecting alveolar exchange [57]. Non-invasive measurement of oxygen saturation (SpO_2) and end-tidal CO_2 (EtCO_2) are surrogate markers of PaO_2 and PaCO_2 , respectively, in healthy patients. Capnography is also useful for evaluating dead-space ventilation or airway obstruction in aerosol exposure studies [199].

2.1. Airway anatomy (cf. Table 1)

Several animal models have been used in aerosol studies on infectious agents, depending on the application and disease susceptibility [197]. Rodents and lagomorphs are widely used in toxicological studies because of their relatively low cost, allowing large-scale studies. Larger mammals, such as dogs, ruminants, and NHPs have also been used in toxicological studies, as well as to model lung diseases. Physiological and anatomical differences between the chosen animal model and humans have a significant impact on the limits of each model. Airway anatomy is probably the most obvious source of differences between species. Relative to rodents and carnivores, the nasal anatomy of humans and NHPs is simple, with few turbinates or changes in nasal airflow patterns [200]. Increasing the inner surface of the nasal cavity, turbinates filter,

humidify, and warm the inhaled air, removing particles larger than 10 μm . In addition, most rodents only breathe through the nose, creating major differences in terms of aerosol filtration relative to humans [20]. The surface epithelial cell population present in the nasal cavity also represents a source of variation among species, strongly changing the response to aerosolized molecules or pathogens. Humans and primates show a relatively close composition and distribution of epithelial cell populations relative to mice. The anatomy of the chest cavity is another source of variation, which affects the structure of the tracheobronchial tree and determines the distribution of aerosols. The anatomy of the tracheobronchial tree of both humans and old-world monkeys is dichotomous, with a greater angle of separation between the left and right principal bronchi than that of the monopodial anatomy observed in rodents [20,23]. This architecture makes the bronchial tree of HNPs closer to that of humans and relevant for reproducing the distribution of aerosols. Laboratory NHPs have a right lung with four lobes (superior, medial, lower, and accessory) versus the three lobes observed in humans and great apes, the accessory lobe being absent. In humans and NHPs, the principal bronchus divides into the lobar bronchus, segmental bronchus, and progressive dichotomous branching divisions/generations (above generation n°16), in respiratory bronchioles [201].

The organization of the small airways and gas exchange areas is critical in terms of aerosol particle deposition. The pulmonary acinus represents the gas exchange unit in which anatomical and histological differences have been observed between species [20]. The human pulmonary acinus is composed of respiratory bronchioles, alveoli, and alveolar ducts. In rodents, respiratory bronchioles are absent or rudimentary, making comparisons with humans difficult. Model NHPs have a pulmonary architecture similar to that of humans, with smooth muscle extending to the alveolar ducts versus that of rodents. The network of smooth muscles has a significant impact on airflow and aerosol distribution, as it can rapidly respond to particles. The composition and density of the bronchial epithelium (ciliated vs non-ciliated cells) also differs between species.

2.2. Immunology

Immunological differences between animal models and humans also represent a significant parameter that influences clearance and the response to aerosol exposure. Rodent models, especially mice, have allowed key advances in immunology and infectious disease research. Mice are easy to breed, have a diverse genetic background, allowing the study of multiple diseases, and are suitable for genetic modification for adaptation to pathogens [202]. However, mouse models have a limited ability to reproduce the full spectrum of human-pathogen interactions, such as in *Mycobacterium tuberculosis* infections [202]. Immune cell phenotypes and responses to pathogens have been shown to significantly differ between mice, NHPs, and humans [203]. Mice have 10 times fewer blood neutrophils and 10 times more blood B cells than humans, along with different responses to Toll-like Receptor (TLR) stimulation. NHPs

are phylogenetically more closely related to humans than mice, being susceptible to several human pathogens and having the closest immune response to that of humans[199,204]. Tools to evaluate the human immune response can be used in macaques, such as ELISpot, flow cytometry, and intracellular staining of cytokines to measure T-cell responses. Antibody isotypes found in NHPs also reflect those found in humans, but subtle differences in term Fc-receptor distribution among immune cells must be kept in mind [199]. Indeed, there are still immunological differences between NHPs and humans. For example, MHC genes in *rhesus* and *cynomolgus* macaques are expanded and more complex than that those of humans but share several features of HLA[205]. Immunological similarities and differences between NHPs and humans have been reviewed elsewhere in more detail [199,203,205].

Table 1. Comparative anatomy of the various species used for aerosol studies.

	Rodent	Rabbit	Pig	Dog	Macaque	Human
Lung structure	Monopodial	Highly Irregularly Dichotomous	Monopodial with cranial right lob bronchus before carina	Dichotomous in upper airways and monopodial in lower airways	Irregularly dichotomous	Regularly Dichotomous
Number of lobes	4	6	6	6	6	5
Respiratory bronchiole	None	None	Absent	Few generations	16 generations	1-3 generations
Interlobar and segmental connective tissue	Little/none	Little/none	Extensive interlobular connective tissue	Little	Little	Extensive interlobular connective tissue
Respiratory pattern	Nose only	Nose only	Nose and mouth	Nose and mouth	Nose and mouth	Nose and mouth

3. Aerosol delivery to non-human primates

3.1. Aerosol deposition

Aerosols are defined as particles in suspension in a gas. When biological agents are contained within the particles, they are called “bioaerosols”. In their definition of bioaerosols, Alsved *et al.*[5] distinguished between dry powders (solid particles) and liquid (droplets) airborne entities that contain either microorganisms or biological materials derived from living organisms mixed with solids or fluids [6].

Among their physical characteristics, the size of particles contained in aerosol is a key parameter that predicts their deposition by various physical mechanisms. There are three main mechanisms for aerosol deposition in airway [206]:

1. Impaction is the primary mechanism of deposition for particles larger than 5 μm . Particle impaction occurs when there is a change in terms of gas direction, which causes particles to deviate from gas streamlines due to particle inertia and they consequently enter into contact with airway wall (impaction). Impaction increases as gas velocity increases, i.e., during high inspiratory flow or when a particle passes through an airway with a smaller diameter with a complex geometry (pharynx or airway bifurcation, for example).

2. Sedimentation is the second mechanism and involves particles between 1 and 8 μm . Sedimentation is due to the action of gravity on the particles. It occurs along the airways against the resistive force of the gas. Deposition by sedimentation increases as gas velocity decreases and as the distance between the airway wall and particle decreases, i.e., in small airways and acini, for example.

3. Diffusion is the third mechanism and involves particles smaller than 0.5 μm . This mechanism is similar to molecular gas motion in thermodynamics. These small particle-size aerosols show a random motion, explaining their deposition in the acinus region and upper airways for nanoparticles.

Generally, the aerodynamic diameter, instead of the real diameter, is used when considering the particle density and shape for aerosol deposition. The aerodynamic diameter corresponds to the equivalent diameter of a spherical water particle (reference density 1 gm/cm^3) with the same sedimentation velocity as the particle of interest.

Aerosols consist of a cloud of particles of varying size that determines the total deposition along the upper and lower airways. Particle size distribution is generally represented in terms of the particle mass, which directly correlates with the clinical effect. In terms of the size of the biologics contained in particles, it is important to consider the active biological effect, as certain small particles may not contain the biological agent or may not contain it in its active form and thus have no clinical effect. The median mass aerodynamic diameter (MMAD) is the most commonly used statistical parameter to describe particle size distribution, in which 50% of the mass of the particle is contained within particles smaller than the MMAD and 50% within particles larger than the MMAD.

Aerosol deposition in the airway is well described in humans, but not completely in NHP models. In adult humans, particles with an aerodynamic diameter $> 5 \mu\text{m}$ are mainly deposited in the URT, those with an aerodynamic diameter between 2 and 5 μm have the highest probability of deposition in the lower airways, and those with an aerodynamic diameter between 0.5 and 2 μm have the highest probability of deposition in the alveoli [27]. Particles with a size of 0.5-0.2 μm have the lowest deposition efficiency in the respiratory system, whereas the smallest particles smaller than 0.2

μm are not exhaled as they can be effectively deposited due to Brownian diffusion [207].

These theoretical distributions for adult humans may not apply to NHPs due to differences in terms of airway anatomy and ventilatory parameters.

Asgharian *et al.*[208] used a lung deposition model and reported different factors influencing lower pulmonary deposition of respirable sized particles (smaller than 5 μm) in rhesus monkeys than in humans. They also reported a higher deposition fraction in the conducting airways than in humans [208]: 30% greater for particles of 1 μm . A few deposition studies have been performed to measure URT and LRT deposition using nasal canula interfaces in macaques [40,209] or facemasks in macaques [27,40,138,210,211] and baboons [133,212,213]. Although data for all types of NHP are not available in terms of deposition results (African Green Monkey for example), we plotted the deposition results from recent studies [27,40,133,138,162,209,210,212,214,215] to show the relationship between the LRT (expressed in terms of total deposition) and the MMAD (Figure 1). The results show a clear difference between nasal canula and face mask administration, which can be explained by impaction in the nasal cavities due to the aerosol velocity at the extremity of the nasal canula (vs face mask) coming from the air source [40]. We built a normal log regression model for facemask administration and found a relatively good correlation ($r^2 = 0.7688$), although there was highly variable deposition for particles between 2 and 4 μm . Such variability can be explained by differences in animal anatomy, ventilation parameters, and dispersion due to particle size distribution (geometric standard deviation). The key particle size for NHPs is 1 μm in terms of the MMAD (Figure 1). This MMAD is associated with 50% deposition in the lower airways, corresponding to a 5 μm MMAD for humans, which shows similar 50% deposition in the lower airways.

The efficiency of total aerosol deposition in NHP airways has been poorly studied [216,217] but has been reported to be approximately 90% for a 5- μm particles, 60% for 1- μm particles, and 40% for a 0.3- μm particles.

Previous studies confirmed a 1- μm particle diameter as the optimal size to target the LRT of NHPs [216,218] but this size can be a challenge when biologics must be generated in [209]large quantities without the loss of activity.

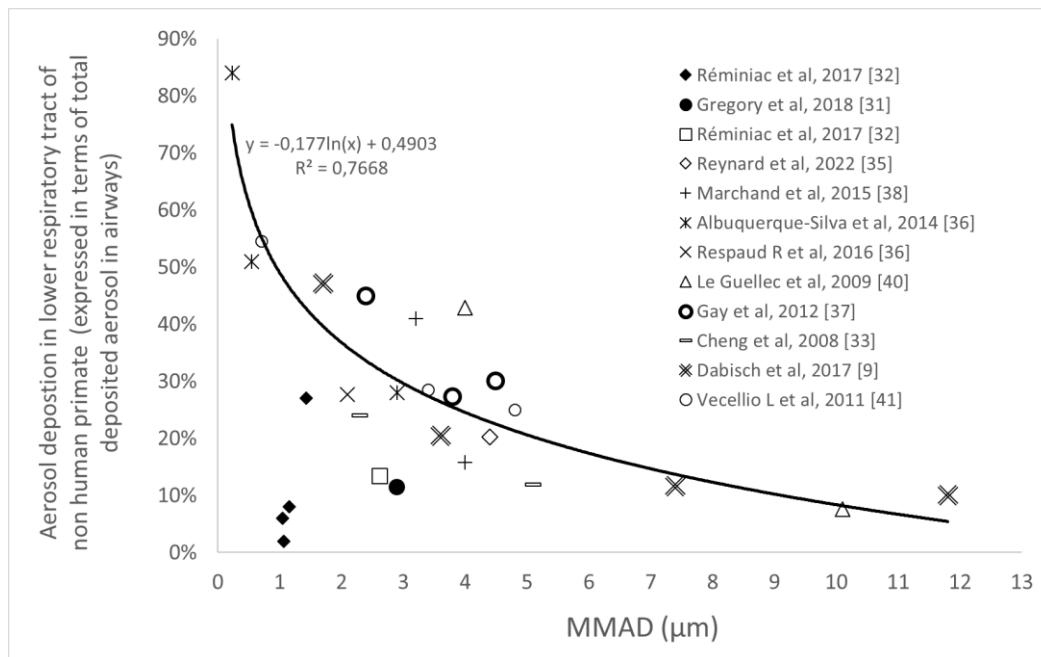


Figure 1. Aerosol deposition in the lower respiratory tract (LRT) versus Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) for nasal canula administration (closed symbols: Réminiac *et al.* [40] and Gregory *et al.* [209]) and face mask administration (other symbols). The correlation was determined for facemask administration only.

3.2. Methods for biological administration in NHP airways (cf. Figure 3)

Below are described different techniques, strategies to target NHP airways. Among them, “instillation” does not correspond to the administration of micro-droplets or particles. Indeed, it consists in the administration of a liquid containing the biological pathogen.

3.2.1. Intranasal spray

A nasal spray is a device that generates a spray of droplets with a diameter $> 10 \mu\text{m}$, avoiding lung penetration. The shape of the spray nozzle ensures relative deposition in the various regions of the nasal cavities and reduces the drop effect relative to nasal instillation.

The nasal nozzle is introduced into the nostrils of the anaesthetised animal. The animal can be in a horizontal or in vertical position. The angle and depth of the nasal nozzle can influence the deposition of the various regions in the nasal cavities. Spray volumes $> 100 \mu\text{L}$ can rapidly run down to the posterior pharynx and enter the stomach or lungs [219].

This technique specifically targets NHP’s nasal cavities based on similarity in human nasal anatomy. It has been used with clinical devices without modification. It is a rapid technique that ensures delivery of a precise dose.

3.2.2. Intranasal instillation

A syringe or pipette is generally used for liquid administration in NHP nostrils. A volume of 250 μL can be associated with tracheal (11%) and lung delivery (16%) in African green monkeys [219]. Higher variability in terms of liquid distribution in the airways is observed with intranasal instillation than nasal sprays for 250 μL . Using a volume < 100 μL or a formulation with a mucosal adjuvant reduces lung delivery (1-2 %) [219]. Using a volume > 250 μL by intranasal instillation is associated with LRT delivery, which could be similar for intranasal spray delivery method when deliver large volume or many doses. This technique targets the upper and lower airways. Delivery of the dose is precise but there is high variability in terms of distribution in the airways. Alveoli appear to not be targeted by intranasal or intratracheal instillation [220] (Figure3).

3.2.3. Intratracheal instillation

An endotracheal tube is introduced into the trachea of the NHP positioned to facilitate introduction of the cannula, causing less pain to the animal. For bronchoscopic inhalation, a bronchoscope is introduced into the mouth of the animal.

This technique specifically targets the lower respiratory airway; it is an invasive technique that bypasses deposition in the URT. It allows precise and rapid dose delivery directly to the pulmonary lobes of the NHP. As an example, tracheal instillation of *Mycobacterium tuberculosis* bioaerosols into a part of the lung was performed on a NHP model (marmosets) to reproduce a specific phase of pulmonary tuberculosis that is less visible by the inhalation administration of aerosols in NHPs [221,222].

Intratracheal instillation is a non-physiological method of particle delivery and cannot be used to mimic particle deposition patterns following inhalation [223] . The delivery does not target the peripheral part of the lungs [220] (Figure 3) which can affect the clinical response due to, for example mucocilliary transport rates or systemic diffusion.

3.2.4. Intratracheal spray

Powders or liquids can also be delivered in the form of a spray directly to the lungs. A thin catheter is introduced in an endotracheal tube to deliver a spray at its extremity. When the experimenter pushes the piston, it generates a cloud/fine "plume" of a bolus of a polydisperse fine spray that precisely targets a region of the animal's lung [224]. Rosenberg *et al.* used this technique in a macaque model to administer a controlled dose of spray (droplet diameter : 25-30 μm) of an organophosphate pesticide, butyrylcholinesterase [225].

This technique allows administration of a precise dose directly to the lungs in the form of a spray, ensuring more distal deposition than intratracheal instillation but with particles larger than in an aerosol (Figure 3). Intra-tracheal spraying is synchronized with the ventilator inspiratory phase [47]. The distribution profile in the lung does not mimic an aerosol deposition profile [220,226], with potential clinical differences.

3.2.5. Nebulization

Nebulization consists of the transformation of a liquid into fine aerosol droplets. The liquid can be a solution or suspension. Nebulizers have the advantage that they do not require specific formulation of the molecule to be delivered, allowing the rapid evaluation of biological aerosols (vs powder aerosols).

There are three different types of nebulizers [18]: jet, ultrasonic, and mesh [153,154,157,227].

Jet nebulizers operate with a gas source. The gas passes through a small aperture in the nebuliser to aspirate and atomise the liquid. The atomised liquid, containing large and small droplets, is driven to a baffle. Large droplets are forced onto the side of the nebuliser to be recycled in liquid form in a reservoir for most jet nebulizers. More than 90% of the droplets produced by atomisation are selected and recirculated in the nebuliser to be atomised again. Small droplets are transported out of the nebuliser by the gas. The Blam nebulizer (CH Technology, USA) offers the possibility of no liquid recycling but the output is low and residual volume high (the residual volume is defined as the volume of liquid remaining in the nebulizer at the end of aerosol generation). The aerosol characteristics depend on the airflow rate and the change in size with the airflow rate. Jet nebulisation is associated with a decrease in the temperature of the liquid in the reservoir (by 10°C) and an increase in the concentration of the delivered molecule in the reservoir with time (two-fold in terms of concentration) [157]. Jet nebulizers have the advantage of producing a large range of particle sizes (MMAD from 200 nm to 10 µm) and allow the nebulization of highly viscous formulations but they can partially destroy brittle active biological agents, modify their structure, and/or generate aggregates [155,156] .

Ultrasonic nebulisers use the vibration (1.2–2.4 MHz) of a piezo-electric crystal to generate the aerosol. The vibration is transmitted to a liquid, generating large and small droplets. Large droplets drop into the reservoir and are recycled. Small droplets leave the nebuliser with the airflow. As for jet nebulisers, the concentration of the compound in the reservoir increases due to liquid evaporation. Ultrasonic nebulizers are unable to nebulize liquids with a viscosity > 6 cP, contrary to jet nebulizers. Piezoelectric vibration heats the liquid solution up to 45.9°C [159], potentially leading to the inactivation and aggregation of thermosensitive biological agents, such as biotherapeutics [160].

Mesh nebulizers use a combination of piezo-electric crystal and mesh-containing microscopic holes. The vibration of the piezo-electric crystal promotes liquid passage across the mesh holes to generate droplets on the other side of the mesh. Contrary to jet and ultrasonic nebulizers, they have the advantage of maintaining a relatively stable temperature of the liquid during nebulization [220]. Furthermore, there is no liquid recycling and no evaporation in the reservoir, reducing the risk of inactivation or degradation of the biological agent. The aerosol generated drop by drop by mesh nebulizers should be less stressful for biologics than the high shear forces generated

by jet atomisation. The performance of mesh nebulizers is influenced by the surface tension and viscosity of the formulation. Some mesh nebulizers are not able to nebulize liquids with a viscosity > 6 cP [228]. Currently, mesh nebulizers are unable to generate droplets < 2 µm in MMAD.

Mesh nebulizers have the strong advantage of having a very low residual volume relative to jet or ultrasonic nebulizers (0.1 mL vs 1-2 mL). This is an important parameter for expensive therapeutics or infectious agents that are potentially toxic or dangerous for the environment.

For infectious agents or sensitive components (proteins, antibodies, vaccines, etc.), mesh nebulizers appear to be the nebulizers with the highest efficiency in terms of the high delivery of sensitive substances or therapeutics to NHPs. This is particularly true for the aerosolization of viral particles. Bowling *et al.* [229] showed that mesh nebulizers, specifically the Aeroneb® nebulizer, can provide a good alternative to jet nebulizers for sensitive viral aerosols (mostly respiratory viruses), for example, due to their specific characteristics (MMAD and higher relative humidity inside the inhalation chamber).

The most critical issue concerning *in vivo* preclinical trials of aerosols (therapeutic and pathogens aerosols) is the selection of the appropriate nebulizer that will optimally nebulize the compound and deliver the aerosol dose to the NHP. Also critical is the route followed by the aerosol/bioaerosol from the nebulizer reservoir through the NHP airways to the lungs. Consequently, it is important to understand aerosol loss between the aerosol generators and their deposition in the lungs (**Figure 2**). The nebulizer itself is associated with the entire device (interface, tubes, connectors, etc) that delivers the aerosol to the NHP. The aerosol delivery system can be defined by the combination of the nebulizer and the exposure system. The nebulizer can be a jet, ultrasonic, or mesh nebulizer. The exposure system can consist of a facemask, head only exposure, an endotracheal tube connected to a respirator, nasal cannulas, or a whole-body exposure chamber. Aerosol loss using the various systems is presented in **Figure 2**. Some loss occurs due to the nebulizer system itself (residual volume, biological inactivation, aerosol leakage, deposition in the exposure system, external body exposure) and other loss within the animal itself (external body exposure, exhalation, URT). Thus, potential differences can be obtained between studies when the same type of nebulizer is used but with a different type of exposure system. For example, using a face mask with a nebulizer will deliver the aerosol in the lungs and URT whereas using an endotracheal tube with the same nebulizer will deliver the aerosol only in the lungs with aerosol losses in the endotracheal tube (Figure 3). Although inhalation regulatory exposure systems in mice have been standardised, there has been no standardisation for NHP aerosol exposure, resulting in high variability in terms of lower respiratory airway deposition in NHPs: from 0.1% [162] to 10% in terms of nebulizer load [210], i.e., a factor of 100.

Furthermore, aerosol administration in NHP does not mimic exactly an ambient exposure where environment plays a role on biological particles. In a laboratory,

aerosol is administered directly in animals with ambient controlled parameters. In the case of aerosol exposure in environment: humidity, temperature, UV can modify the particle size and biological activity. Airborne can be carried in dry form or attached to PM particles [230] . This is why additional *in vitro* studies (using Goldberg drum for example) are performed to evaluate the influence of environment parameters on aerosol characteristics [231] although not generally on animals.

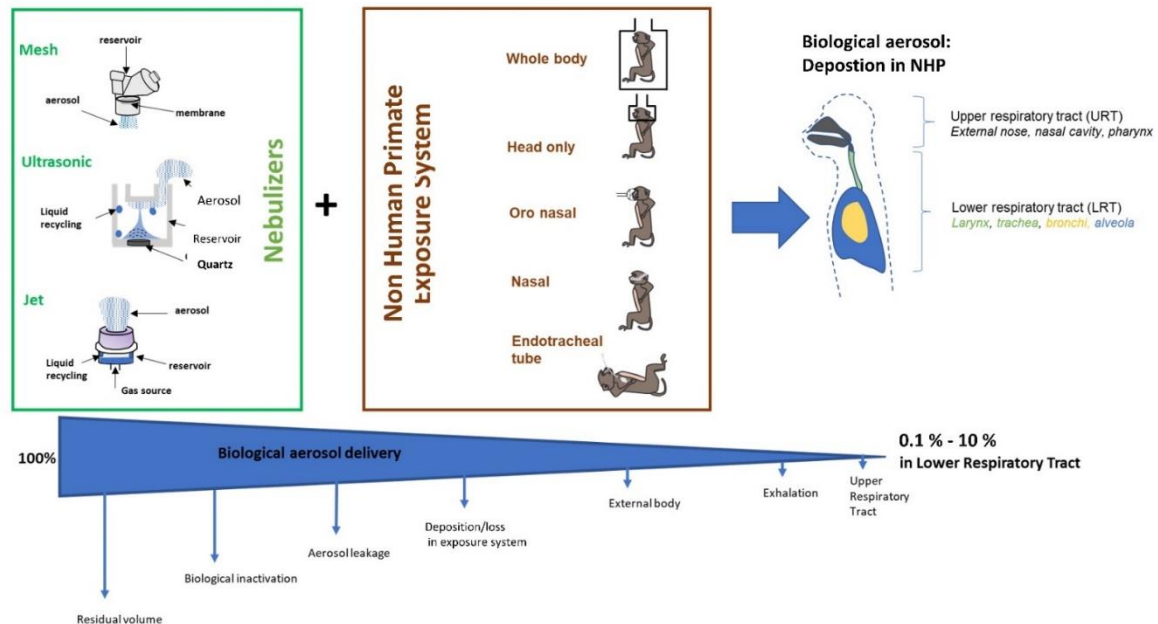


Figure 2 Path of biological aerosols and loss from the nebulizer reservoir to the lower respiratory tract in NHPs.

4. Infectious biological agent aerosols in the NHP Model (cf. Table S1, Supplementary data)

In this chapter, we will present several examples of aerosolized infectious agents and potential bioterrorism agents [232] investigated in NHPs.

The agents discussed in this review were selected either for their important historical impact in terms of disease prevalence [18,19] and for their potential threat if used as a bioweapon on a population (cf. Table S1).

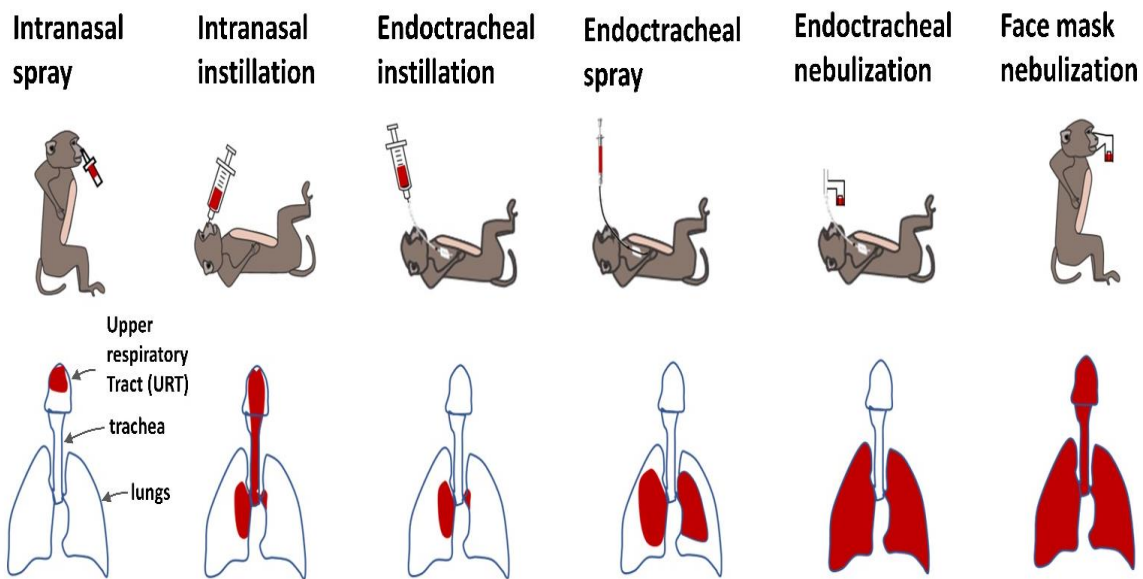


Figure 3. Representation of deposition (in red) to NHP airways using different delivery methods for the administration of biologics.

4.1. Viruses

4.1.1. SARS-CoV-2

Coronavirus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2), responsible for the disease COVID-19 (coronavirus disease 2019), has been rapidly spreading throughout the world since its first emergence in China at the end of 2019. The stability of aerosolized human SARS-CoV-2, hCoV-2 has been analysed by Van Doremalen *et al.* [233]. Their study demonstrated the viability of the virus (for experiments lasting 3 hours) and the reduction of infectivity (titre from $10^{3.5}$ to $10^{2.7}$ TCID₅₀/L) from the time of aerosolization. It also showed deposition of the virus in the URT [234], is similar both in symptomatic and in the asymptomatic patient, suggesting the aerosol transmission potential of both asymptomatic or minimally symptomatic patients.. This study, and that of Meselson *et al.* [235] confirmed the human-to-human aerosol route of transmission of SARS-CoV-2. It is therefore of high importance to assess the deposition in pertinent animal models to better understand the pathophysiology of the disease from deposition of the virus to its distribution in the body.

To explore the impact of the inoculum on the evolution of the disease in NHP, it is necessary to control several factors: the viral load of inoculation; the route of exposure (intranasal, intratracheal instillation, inhalation, multiple), the anatomical site of deposition and the amounts of virus deposited per tract area (nose, trachea, lungs). In the case of human SARS-CoV-2 infection, the clinical status, as well as the age of the host is crucial in the prognosis of the disease course [236]. The impact of the inoculum on the pathophysiology and, in particular, the kinetics and intensity of anti-SARS-CoV-

2 antibody production have been demonstrated in animal models of COVID-19 other than NHPs. The speed of detection and circulating antibody concentrations measured following infection correlate with the peak viral load in ferrets [237-239]. The Syrian golden hamster is also a susceptible animal model for SARS-CoV-2, with symptomatology influenced by the dose of intranasal inoculation [240,241]. However, these models of exposure do not reproduce physiological aerosol exposure, as rodents were exposed by nasal instillation. They do not reproduce all the clinical signs observed in humans and the development of the immune and cytokine response is not comparable.

Historically, NHPs have been used to explore the impact of the inoculum on the severity of the disease after infection with coronaviruses. For example, increasing doses of virus were administered to study exposure to MERS-CoV in African Green Monkeys AGMs [242]. To respond to the health crisis and, in particular, to test prophylactics and treatments against the virus, NHP models of COVID-19 have been developed using rhesus macaques [243], cynomolgus macaques [244] and AGMs [245].

AGMs, rhesus and cynomolgus appear to be pertinent NHP species for the preclinical study of SARS-CoV-2 disease [144,246,247]. However, comparison of a combined intranasal route to an aerosol exposure route of SARS-CoV-2 in cynomolgus macaques showed the aerosol route of exposure to result in more severe disease [245].

Indeed, Bixler *et al.* [245] showed that the species of macaque (either cynomolgus or macaques), the age, and the route of aerosol exposure (1-3 μm , 5×10^4 and 5×10^5 PFU) or combined intratracheal and intrabronchial exposure (2×10^7) for SARS-CoV-2 preclinical model development are important. Aerosol delivery of SARS-CoV-2 to cynomolgus macaques represents so far, the best preclinical model, as cynomolgus macaques show severe symptoms (stronger immune response, more pronounced lung damage, high fever and long duration of the fever). Small-sized SARS-CoV-2 aerosols (1 to 3 μm) are deposited mainly in the LRT and lead to severe coronavirus disease more in cynomolgus macaques than AGMs [248,249]. Therefore, the site of deposition of SARS-CoV-2 in the macaque models is important for its pathological effects.

Concerning the immunological aspect of the disease, a specific aspect of severe COVID-19 disease which merits attention is the "cytokine storm". It has been described for the most severe forms of COVID-19 in humans [250] as well as old vervets monkeys (AGMs) after experimental exposure to the virus [249]. Cytokine storm is not described in rhesus macaques. Paradoxically, there are often infected and asymptomatic patients and the super-emitters are not always those with the most severe disease [251]. This has also been shown in NHP models of viral exposure [252]. Young and old animals (more than 15 years of age) of two species (Cynomolgus [253] and rhesus [254,255]) were exposed to various doses by either intranasal, intratracheal, instillation [253-255] or sometimes ocular route of exposure [256], or by nebulisation of droplets of respirable size. The number of aged individuals was low. Nevertheless, the follow-up of the animals documented by viral loads, clinical scores, and lesions observed on thoracic computer tomography (CT) or histology showed that older animals may have

had more severe lung lesions than younger animals for all three species (AGMs, rhesus and cynomolgus), regardless of the route of exposure [253,255]. In aged AGMs, Blair *et al.* [248] observed COVID-19 with an exacerbated circulating cytokine production profile relative to other models. Although less pronounced, the same conclusion was reached by Song *et al.* using rhesus macaques [254]. On the contrary, young NHPs are clinically unaffected by infection and lesions were not systematically associated with high viral loads when following exposure by nasal and intratracheal instillation.

Nebulisation of the inoculum, which reproduces aerosol exposure, causes fever in cynomolgus macaques, early production of circulating C-reactive protein, and more extensive and severe pulmonary lesions than exposure by intranasal and intra-tracheal instillation with doses that are ten times higher (5.45×10^6 PFU by instillation vs 5×10^5 PFU by aerosol) [245]. Dabisch *et al.* also showed the impact of increasing doses by aerosol exposure on viral replication, the production of anti-SARS-CoV-2 antibodies, and the development of fever [257].

Exposure of lungs to a bio-aerosol containing SARS-CoV-2 results in direct contact between the virus and its ACE2 receptor expressed on pneumocytes [258]. The contact surface can be very large relative to intra-tracheal instillation, which is subject to gravity deposition of a liquid inoculum. The dynamics of the development of the immune response and the appearance of clinical signs, such as fever and difficulties in respiration, are influenced by the route and dose of exposure.

In conclusion, exposure to fine particles compatible with pulmonary deposition can result in strong early replication of the virus in the lungs, leading to controlled inflammatory response and extensive lung damage [259].

4.1.2. Measles virus

Measles is the most contagious airborne viral infection and the leading cause of child death among vaccine-preventable diseases. Its causative agent, Measles Virus (MV) is an enveloped non-segmented, single-strand RNA virus, a member of the *paramyxoviridae* family, and *Morbillivirus* genus [260]. Measles is a highly contagious airborne infection associated with human-to-human transmission. Indeed, infection can occur through droplets or small particles suspended in air. The spherical virions are 100-200 nm in diameter. The efficient subcutaneous MV vaccine exists on the market [261] and current research is focused on a needle-free vaccine consisting of easy-to-use patches [262]. A recent study on aerosolized inhibitory peptides therapeutics in macaque model, has shown promising results suggesting an additional means to fight against airborne infection in non-vaccinated people, that can be readily translated to human trials [214].

MV infection can lead to various clinical symptoms in humans: fever, maculopapular skin rash, sometimes associated with conjunctivitis, coryza, and cough. In certain patients, MV can infect the central nervous system, which is fatal in most cases. MV infection leads to the development of the virus in cells of the immune system and can

lead to immunodepression, responsible for secondary infections, with high morbidity and representing the most common cause of death among vaccine-preventable infectious diseases.

MV targets lymphocytes and epithelial cells and wild-type MV strains bind signaling lymphocytic activation molecule 1 (SLAMF1 or CD150), a lymphoid surface receptor involved in immune cell activation [263]. Following an initial infection of immune cells, MV is transmitted to epithelial cells by using nectin-4 receptor expressed at their basolateral site [264]. In addition, vaccine and laboratory strains use the ubiquitously expressed CD46 receptor to enter into cells and replicate [265,266]. CD150 and nectin-4 are clearly key actors in the pathophysiology of MV.

NHPs have been used as a pertinent model to gain a better understanding of the pathophysiology of this virus, as it is possible to mimic the aerosol transmission of this virus and produce a disease with clinical features very similar to those in humans. De Swart *et al.* [267,268] demonstrated that macaques (both cynomolgus and rhesus) show the same immunological disruptions to humans after infection with a recombinant engineered fluorescent IC323 strain of MV (rMV).

To analyse MV aerosol deposition and the type of infected cells involved in the pathophysiology of measles in NHP model, Lemon *et al.* [269] tested MV aerosol deposition and assessed the infected cells (EGFP⁺) involved in the pathophysiology of MV disease in 12 juvenile cynomolgus macaques (*Macacca fascicularis*). The authors tracked the deposition of the virus and studied how MV targets immune cells (macrophages, dendritic cells, or bronchus-associated lymphoid tissue) and spreads throughout the respiratory tract until the alveoli of macaques, using a paediatric facemask and a nebulizer with a high dose of volume median diameter (VMD) of 4-6 μm (allowing lower, upper, and lamina lung deposition) and fluorescent (EGFP⁺) recombinant MV from a Sudanese Khartoum strain, rem^{akes} (the strain known for the high human-to-human transmissibility). They used a high dose of 10^6 50% cell culture infectious doses (CCID₅₀) with highly efficient delivery to the lungs using a preclinical vibrating mesh nebulizer of low residual volume, the Aeronex Lab. This nebulizer was chosen because it was previously being tested on 1001 children in a randomized clinical trial of measles aerosol vaccination organized in India by the World Health Organization [270].

Another group [271] used a similar *in vivo* experimental design, with virus deposition via two routes of administration, the intratracheal or aerosol route, with a lower dose (10^4 CCID₅₀). They compared few MV strains: the attenuated recombinant fluorescent EGFP MV *in vivo* strain, the pathogenic IC323 strain, the Edtag strain (rMV^{Edt}), and the live attenuated Edmonston-Zagheb strain, with the same aerosolization method as described above. They found similar total *in vivo* deposition, regardless of whether the route of administration was intratracheal or aerosol. The authors concluded that MV causes a robust pulmonary infection and targets immune cells, such as CD150⁺ and CD11c⁺ cells, for the pathogenic and attenuated MV strains.

These publications first highlight the importance of macaques as a preclinical model for the deposition of MV aerosols in the respiratory tract. They demonstrate that an airborne transmitted viral strain with particles of a defined sized (MMAD = 4 to 6 μm) and concentration can be deposited using a specific nebulizer, allowing the authors to characterize the deposition of viable MV throughout the respiratory tract, especially in the alveolar conduction zone [269] and the specific cells and receptors targeted by the MV virus. These publications provide a good example of the importance of aerosolization to reach the full respiratory tract and identify all respiratory cells accessible to a virus transmitted by aerosol and the receptors used by the virus. For MV, vaccination is crucial for eradication of the disease [261]. Clinical studies with an aerosolized vaccine have been performed [270] and may pave the way to the development of an aerosolised vaccine for the prevention of the measles.

Even though macaques infected intratracheally [271] or via the aerosol route develop the disease in both cases, it is only the aerosol mode of exposure with MV that allows a better understanding of disease progression from the entrance of the virus into the host to the bronchus-associated lymphoid tissue), tracheobronchial tissues, macrophages, dendritic cells, and blood (viremia). This route of exposure, allows an understanding of the cellular targets inside the respiratory tract epithelium. The clinical symptoms appear at later stages of disease progression, contrary to other respiratory viruses [272]. As aerosolization of MV best mimics, natural exposure to MV, this route of inoculation (versus the intratracheal route of exposure to MV) can be used to develop therapeutic approaches with aerosolized particle delivery [271] for the treatment of URT and LRT [214] after measles infection of macaque models.

4.1.3. Influenza viruses

Exposure of healthy individuals by nasal instillation to respiratory viruses under hospital supervision has been performed and published for decades. These clinical trials have been conducted with both H1N1 and H3N2 influenza viruses [273,274], as well as respiratory syncytial virus [275].

These publications show that the dose of the infecting virus influences the symptomatology, as well as the viral loads measured in the respiratory tract compartments (nasopharyngeal swabs and bronchoalveolar lavage). Furthermore, the intensity of the humoral response, and its persistence correlate with the viral loads measured during longitudinal follow-up. In the development of a severe macaque model of influenza viruses, to test viruses responsible for yearly worldwide epidemics, Wonderlich *et al.* [276] showed that small particles (4 μm) of aerosolized avian influenza A viruses H5N1 at a high challenge dose of 6.72 \log_{10} PFU leads to a fatal disease, as this route of inoculation of the virus targets alveolar macrophages in the LRT, resulting in fulminant bilateral pneumonia. In addition, the authors noted that avian viruses, which present a worldwide public health problem, bind preferentially to sialic acid receptors located only in the LRT but not URT.

The authors compared the aerosol route of inoculation to liquid instillation through the URT (nose, mouth). The URT lacks cellular receptors, which can lead to a fulminant disease. This specific example of a severe macaque model of a lethal strain of influenza virus (H5N1) confirms that, in certain cases, the aerosol route of inoculation versus other routes of respiratory inoculation is important for the development of pertinent preclinical models and the evaluation of potential therapeutics.

Moreover, this example shows that the small size of aerosol particles dramatically influences the severity of lung damage caused by the H5N1 virus in adult cynomolgus macaques.

4.1.4. Nipah virus

The Nipah virus (NiV) is a recently emerged RNA virus belonging to the *Paramyxovirus* family and *Henipavirus* genus responsible for encephalitis fever, and severe respiratory distress mostly in Southeast Asia.

Two distinct NiV strains have been identified, NiV Malaysian (NiV_M) strain, mainly responsible for neurological symptoms [277], whereas NiV Bangladesh strain (NiV_B), is associated with acute respiratory symptoms [278,279]. NiV is transmitted via nasal and oropharyngeal secretions and the mortality rate following infection is between 40 and 100%. Licensed treatment or vaccines are not currently available and NiV is included in the Blueprint list of pathogens of the World Health Organization (classified among Bio-Security Level 4 (BSL4) pathogens) that require further characterization and the development of therapeutic and prophylactic measures [280,281]. The size of the viral particle varies from 120 to 500 nm [278] and NiV_B is associated with frequent human-to-human transmission [280,282].

African green monkeys (AGMs) are highly susceptible to NiV infection, showing similar disease progression and symptomatology as humans [283]. Indeed, following NiV infection via the intratracheal route, infected monkeys rapidly develop pneumonia, with severe respiratory syndrome. To mimic the respiratory route of NiV transmission, nebulized aerosols containing NiV have been generated in three sizes: small, intermediate, and large. Aerosols of NiV provide a good example of the influence of particle size on the pathophysiology of the disease.

Indeed, the literature shows that the size (small, intermediate, or large) of NiV aerosol particles influences the pathophysiology (cf. table 2) of the disease in AGMs. Cong *et al.* [284] (NiV Malaysian strain, dose of exposure; 10^4 PFU) and Prasad *et al.* [285] (dose of exposure: 10^3 to 10^4 PFU) showed that AGMs develop a major pulmonary disease after infection with NiV aerosols of small particle size from 0.5 to 3 μm . Using the same animal model, Hammoud *et al.* [286] (dose of exposure: 10^2 to 10^3 PFU) and Lara *et al.* [287] (dose of exposure: 22-90 PFU and 408-1197 PFU) showed intermediate-sized NiV aerosol particles, from 6.10 to 7.19 μm , to also lead to pulmonary disorders, but not to neurological disease, as observed by MRI [286], and a major immune B response, with the formation of a cytokine storm [287]. Aerosols containing large particles of > 7

μm lead to neurological and brain disorders in AGMs, as demonstrated by Lee *et al.* [277] (114) (500 PFU). It is likely that NiV aerosols with such a large particle size (11.0 to 12.5 μm) did not result in deposition of the virus in the LRT. The example of NiV shows the importance of generating aerosols with particles of different size, as the particle size and challenge dose affects the pathogenesis and symptomatology for the same virus. Better understanding of the differential pathogenesis induced by NiV, following its entry via aerosol of different size, is important for the design of novel antiviral treatment. Indeed, administration of the antiviral lipopeptides via the respiratory route was shown to prevent lethal NiV Malaysia infection in AGMs [288] and further improvement of the peptide administration and targeting its deposition to the same region of the airway as the virus is deposited, should pave the way to the novel preventive approaches against this highly lethal emerging infection.

4.1.5. Cowpox virus

Orthopoxviruses constitute a large family of large linear double-stranded DNA viruses with cell cytoplasm tropism. One of the key symptoms caused by these viruses in humans is an extensive pustular rash on the body. This family of viruses is responsible for a number of devastating diseases, the best-known being smallpox, caused by the variola virus (VARV). The virus is highly infectious and can be used as a bioterrorism agent due to its infectivity and pathogenicity. Therefore, it is important to have medical countermeasures (MCMs) available. The study of such MCMs requires the development of animal models that mimic the disease caused by the virus. In their review, Chapman *et al.*[289] summarized the various animal models (from rodents to NHPs) that develop a disease similar to that of humans following exposure to Orthopoxviruses. The authors also discussed the four Orthopoxviruses that can cause disease in humans (monkey poxvirus [MPXV], variola virus [VARV], cowpox virus [CPXV], and vaccinia virus [VACV]) and their features in animal models used to study and obtain a better understanding of disease pathophysiology. Smallpox is a good example of an infectious disease in which NHPs have been widely used to study the pathophysiology and potential treatment of an orthopoxvirus [290]. Smallpox is also a disease in which intratracheal delivery and aerosols are the two principal routes of administration to have been studied in NHPs [289].

Given all the aspects mentioned above and Animal Rule policies in terms of using NHPs for the evaluation of countermeasures or when they best mimic human disease [291]), the study of aerosols of CPXV on NHPs is highly relevant. Johnson *et al.*[292] studied CPXV as a smallpox NHP model with aerosolization ($5 \cdot 10^5$ PFU or $5 \cdot 10^4$ PFU) of the Brighton Red strain, CPXV-Brighton Red (CPXV-BR)[292]. The aim of the study was to determine whether aerosol inoculation of CPXV showed similarities to human variola infection, in other words, how aerosol inoculation of the CPXV-BR strain, an unselected BSL-2 agent, mimics human smallpox better than other orthopoxvirus macaque models. The study also monitored disease progression of two groups of rhesus

monkeys in real-time over the days following aerosolization by computed tomography (CT).

Johnson *et al.* assessed the development of a representative (in terms of the route of inoculation) *in vivo* model of smallpox virus by exposing rhesus macaques to 0.5- to 3- μm aerosols of cowpox (a high dose of $5 \cdot 10^5$ PFU and a low dose of $5 \cdot 10^4$ PFU) for 30 min using a head-only exposure chamber system. Aerosols were produced using 3-jet nebulizers, the most widely used system for aerosol delivery in NHP models. Disease progression was evaluated by CT imaging, a useful tool to evaluate disease progression, after exposure.

The small aerosol sizes selected allow deeper dissemination in the alveolar region of the respiratory tract (“uniformly lethal disease”) of macaques than intrabronchial exposure to CPXV-BR [293]. Nevertheless, smallpox skin lesions (typical pox-like skin lesions) are fewer in number following exposure by the aerosol than intrabronchial route [293]. However, neither the intrabronchial or aerosol route of exposure to smallpox in macaques leads to severe haemorrhagic smallpox disease with skin lesions. Only, high-dose (5×10^5 PFU) intravenous inoculation leads to the severe disease that best mimics human smallpox [294].

In conclusion, the site of deposition of the smallpox virus in macaques relies on the route of inoculation. The site of deposition of the virus is also associated with the pathophysiology of the disease [294,295].

4.1.6. Ebola viruses

Arenaviruses, filoviruses, bunyaviruses, and flaviviruses are the four families of viruses that cause viral haemorrhagic fever and are acquired through animal reservoirs. They are filamented encapsulated RNA viruses, the capsule glycoprotein conferring virulence. They have a pleomorphic shape (length up to 14 nm) [296]. These viruses are responsible for highly lethal diseases in humans. Moreover, they can be easily disseminated from human to human and cause major worldwide panic [297]. Consequently, the CDC classified them in the first category of high-priority potential threat agents, category A. Filoviruses (*Filovirida* family) and arenaviruses (Arenaviridae family) can cause highly fatal cases in humans. Ebola and Marburg are caused by filoviruses, and the viruses that cause Lassa fever and South American haemorrhagic fevers are classified within arenaviruses. They represent deadly zoonotic diseases [298]. Due to the unprecedented Ebola virus (EBOV) epidemic in West Africa from 2013 to 2016, the world became particularly vigilant concerning these types of viruses and their routes of human-to-human transmission. In 2022, Africans are still facing ebolavirus epidemics.

Although these emerging pathogenic viruses are mostly transmitted via contact with infected biological fluids, human transmission may also occur through Ebola-containing aerosols [296,299], suggesting airborne transmission of EBOV. Indeed, in their review, Osterholm *et al.* [299] confirmed that aerosolized EBOV can resist generally hostile

conditions: approximately 100-minute survival of aerosolized virus at 50% to 55% relative humidity and 22°C.

Although there is little evidence of Ebola transmission between humans by aerosols, the authors confirmed that contamination via aerosol droplets can occur in laboratory animal species, such as pigs or NHPs [300]. A Lancet publication from 1995 showed EBOV replication in control monkeys separated from parenteral EBOV-contaminated macaques by three meters, suggesting potential airborne transmission [301]. In addition, Mekibib *et al.* [296] (publication previously cited) provided relevant strong arguments supporting the transmission of aerosolized EBOV.

Zumbrun *et al.* [302] tested a dose of 50 to 500 PFU of an aerosolized viral strain of Sudanese Ebola filoviruses (one of the 5 species), SUDV Boniface, generated using a Collison jet nebulizer (MMAD of approximately 1.4 µm, GSD = 2.1, low GSD) with a head only exposure system. Their study is interesting as they used three different NHP species: AGM and rhesus and *fascicularis* macaques. This is one of the few studies, to assess aerosolized filoviruses [303-305], to investigate the disease course and viral load (load of filovirus post RT-PCR on blood samples) post-aerosol exposure at a specific dose using a specific strain in several species of NHP. All three species were easily infected and showed severe disease, but the clinical signs of the disease differed, with the cynomolgus macaques showing the shortest survival post-exposure and the load of the agent (load of filovirus post RT-PCR on blood samples) appeared to depend on the species.

This may support the fact that in all the studies mentioned, the authors generally used only one of these three NHP species: AGM and rhesus and cynomolgus macaques. Still within the context of the Animal Rule and the need to define countermeasures concerning sensitive agents, Alves *et al.* [227] performed an aerosolization study using Lake Victoria (the only species of Marburg Virus) Marburg Virus, Angolese strain, on an NHP model. Six cynomolgus macaques (4 males and 2 females) (see for MCM characterization under the Animal Rule) were exposed for 10 min to a low (2 to 14 PFU) or high dose (99 to 705 PFU) of MARV using a Collison nebulizer. The study included specific informative complementary techniques, such as immunohistochemistry, histopathology of lung cuts, and TUNNEL staining for the study of apoptosis. The study concluded that both doses of exposure to aerosolized Marburg virus cause high lethality, however a delay of time to death was observed with the low dose group (macaques were moribund on day 9 post-exposure) compared to the high dose group (macaques were moribund on day 7 and 8 post-exposure).

4.2. Bacteria

4.2.1. *Bacillus anthracis*

With the letter, containing spores of *Bacillus anthracis* (a Gram positive, nonmotile, rod-shaped, Ames spore-forming bacteria) sent to the Senate office in 2001 in

Washington DC, there is no doubt of the huge risk posed by aerosolized spores of *B anthracis* (anthrax), used as a key agent of threat for potential terrorist attacks [306]. Indeed, it was confirmed that the spores were viable, with a size of 0.95 to 3.5 μm , allowing deep deposition to the alveoli [307]. The goal of defining MCMs [308], developing a prophylactic treatment that targets spore germination, and obtaining an understanding of the exact human pathophysiology post-exposition/challenge to aerosols of anthrax is thus entirely relevant.

As an example of the development of prophylactic treatment, Savransky *et al.* [309] challenged Guinea pigs (another key species for experimental respiratory studies) and cynomolgus macaques (2.9 to 4 kg), consistent with the FDA Animal Rule [310], to a potential anthrax vaccine candidate, Anthrax Vaccine Adsorbed7909 (composed of a drug and an immunostimulatory TLR 9 and an NHP-suitable adjuvant, CPG 9090) and assessed the generation of toxin-neutralizing antibodies in the animals following aerosol challenge.

For the macaques, 250 x LD₅₀ (lethal dose 50), (LD₅₀ = 6.18 x 10⁴ spores/animal for cynomolgus macaques) of the Ames strain was aerosolized through a head exposure system to the macaque post-anaesthesia. LD₅₀ represents the dose required for a toxic to kill 50% of the tested population, and the ED₅₀ (effective dose 50) the dose at which 50 % of the animals show the first symptoms. As for most of the biological weapons mentioned in **Table 2**, the authors used a 3-jet Collison nebulizer [309]. This is another example of the testing of a potential prophylactic treatment against a bioweapon following a simulated attack (head exposure system for animals) on NHPs [311] for their eventual approved for use in humans, as the AVA vaccine (BioThrax®) is the only clinical pre-exposure prophylactic (PrEP) vaccine (licensed in 2015) for use for anthrax in the USA [310,312].

The size of the aerosolized bacteria droplets has a large influence on disease severity in macaques and pig models.

In 1953, Harper *et al.* [313] were the first to demonstrate that toxicity decreases with increasing size of the *anthracis* aerosol in macaque and pig models. They showed that the number of spores retained in the lungs of macaques or pigs, thus the infectivity, decreases as the aerosol size increases from 1 to 12 μm . For example, for aerosols of 1 μm , the number of spores retained in the lungs was 28.5 x 10⁴ with 66.8% of the aerosol in the lungs and 33.2% in the URT (head + trachea), whereas the number of spores was 13 x 10⁴ for aerosols of 12 μm , with only 10% of the spores reaching the LRT and most deposition (90%) occurring in the URT. Consistent with these results, Druett *et al.* [314] published that the number of viable cells required to produce 50% deaths in exposed macaque monkeys dramatically increased (0.64 x 10⁶ vs 0.045 x 10⁶) as the particle size increased from 1 μm to 12.4 μm .

4.2.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Evaluation of the tuberculosis vaccine by ultra-low dose (ULD) *Mycobacterium tuberculosis* aerosol vaccine delivery to 19 Indian rhesus macaques (*Macacca mulatta*) was recently performed by Andrew White *et al.* [315] of Public Health England. Animals were challenged with a suspension of the Erdman strain of *Mycobacterium tuberculosis* using a portable vibrating mesh nebulizer after receiving an estimated dose of 2 to 8 x 10⁶ CFU/mL of BCG vaccine using the Danish 1331 strain by either intradermal injection of 100 µL in the upper left arm (equivalent to an adult intradermal dose) or the aerosolized ULD vaccine generated using a 3-jet Collison nebulizer and delivered using a modified paediatric anaesthesia mask. The results of this study were particularly robust due to the variety of techniques used, from CT scans to statistical analyses (IHC, post-mortem histology, bacteriology, immune response analysis) of vaccinated and unvaccinated NHPs after challenge with the bacteria and the use of the aerosolized ULD vaccine. Not all the results of this study showed statistically significant differences between the vaccinated and unvaccinated groups. Moreover, the same difference was not consistently observed between the group vaccinated with the ULD aerosol vaccine and that vaccinated intradermally with the BCG vaccine (live attenuated pathogen).

Sibley *et al.* [316] showed that the aerosol route of inoculation leads to more diffuse pulmonary disease in macaques when comparing two respiratory routes of *M. tuberculosis* inoculation in macaque models: bronchoscopy instillation and small aerosol inoculation. The tuberculosis lesions were more diffuse following aerosol inoculation than bronchoscopy instillation and therefore more representative of severe human disease.

Although it is impossible to claim that there is a net beneficial effect of aerosol vaccination against this bacteria in an in-vivo macaque model, the study demonstrates the positive effects of using a ULD aerosol vaccine against *M. tuberculosis*: slow disease progression with the ULD, allowing a better understanding of tuberculosis, especially the immunological mechanisms, a completely non-invasive needle-free technique, no need to freeze the vaccine, and wide deposition directly in the pulmonary tract, resulting in pulmonary immunization.

In conclusion, the method of administration of *M tuberculosis* (instillation vs aerosol) influenced the localisation/dissemination of tuberculosis lesions in macaques [316,317].

4.2.3. *Francisella tularensis*

A study by Day *et al.* [318] reported the infectivity and pathogenesis of *Francisella tularensis* (*F. tularensis*) in rhesus macaques (*Maccacca mulata*). *F. tularensis* is a highly pathogenic Gram-negative coccobacillus. Due to its high infectivity, ease of transmission, and ease of aerosol transmission or aerosol spreading, the US government considers it to be a high-risk agent of bioterrorism. The CDC classifies it as being among human biological selected agents or toxins (BSAT).

The authors challenged 96 macaques, weighing 4 to 5 kg, with a strain of *tularensis*. They used a UCTL type atomizer to disseminate aerosols with a median diameter of 2.1, 7.5, 12.5, and 24 μm into the respiratory system of the animals. They then studied the clinical effect as a function of aerosol diameter. As shown in the earlier chapter on Nipah Virus, the pathophysiology of the disease correlated with aerosol size.

The studies of Day *et al.*[318] and Teske *et al.* [35] clearly show a correlation between the size of aerosols of *tularensis* and the clinical symptoms and LD₅₀ in macaques. Indeed, the LD₅₀ in macaques was 14 cells for small (2.1 μm), 378 cells for intermediate (7.5 μm), and 6000 cells for large (24 μm) particles of aerosolized *tularensis*, showing an increase in the LD₅₀ with increasing particle size whereas there is an increase of cells number with the aerosol size.

The authors also observed a longer time to death with increasing particle size: 2 to 3 days for the small and intermediate particles and 6 to 10 days for the large particles. These results confirmed the influence of the size of aerosolized bacteria (cf. chapter on *Bacillus anthracis*) on the pathophysiology of the disease, just as studies conducted many years before confirmed that there is a true influence of aerosol particle size [10] on the respiratory median lethal dose (LD₅₀) values of bacterial respiratory pathogens in *in vivo* models [35,318-320].

4.2.4. *Yersinia pestis*

Yersinia pestis, is a short Gram-negative rod coccobacillus of the *Enterobacteria* family. Among other determinants, the virulence of the bacterium is due to its virulence factors, such as the well-established T3SS and associated factors and the Yops (*Yersinia* outer proteins) factors [321]. These factors affect phagocytosis by inhibiting anion- and cation-mediated cell-signalling pathways. This bacterium is responsible for the plague.

In humans, there are three types of plague, characterized by three different patterns of clinical expression: bubonic plague, pneumonic plague, and septicaemic plague [322]. It can be treated by antibiotics.

Van Andel *et al.*[323] infected 22 Indonesian cynomolgus macaques (*M. fascicularis*) to assess an *in vivo* model of *Yersinia pestis* with a pulmonary form of plague. A 3-jet Collison nebulizer was used to produce viable bioaerosols of the Colorado 92 (YpCO92) strain of *Y. pestis*. To target the deep lung, they created aerosols from 2-5 μm and exposed the macaques using a head-only system. The study also determined the LD₅₀ and the ED₅₀ (cf. definition on paragraph 4.2.1). They demonstrated a dose-effect relationship for 12 to 42,700 CFU, with the appearance of severe histological score lesions with increasing dose.

This is the first study on bioaerosol exposure in an NHP model to consider and discuss the limitation of the aerosolization technique. Indeed, the authors argued that there is an undefined percentage of non-viable pathogen contained in the aerosols due to shear forces and desiccation. This specific point concerning the biological compatibility

of nebulizing systems and aerosolization strategies has already been discussed above. Similarly, in a robust study using 18 animals, Warren *et al.* [324] challenged *Cynomolgus* macaques (males and females), weighting between 2.4 and 4.6 kg, using a head-exposure system with a Collison jet nebulizer that produced aerosols of *Y. pestis* CO92 (YpCO92) at 5×10^8 CFU/mL with a median aerodynamic diameter of 4.33 μm . A key strength of this study was that they calculated the nebulizer concentration required by calculating the spray factor associated with the aerosol concentrations. The authors also estimated the LD₅₀ and LD₉₀ (important for selecting the aerosol dose for use in vaccine efficacy studies) for the inhaled dose.

They concluded with the fact that there is a correlation between *Y. pestis* bioaerosol deposition in NHPs [324,325] and the inhaled LD₅₀ and disease pathophysiology, as previously shown for the Nipah virus. In this study, histopathological studies showed intense infiltration of the bacteria in the deep lung that correlated with aerosol particle size, as for the Nipah virus.

Still in 2011, Layton *et al.* exposed 10 African Green Monkeys (AGM), via a head-only exposure apparatus to 40 to 255 LD₅₀ doses of aerosolized *Y. pestis* strain CO92 [326].

They established that such exposed AGM constitute a rigorous model for antibiotic efficacy studies, as demonstrated by Hewitt *et al.* [327].

4.3. Toxin

4.3.1. Ricin

In the class of non-infectious hazards [328], non-infectious bioaerosols, such as those containing ricin, a plant toxin purified from Castor beans (*Ricinus communis*), can be included. Ricin is a heterodimeric glycoprotein toxin of 65 kDA composed of two chains, the A chain (ricin Toxin A) and the B chain (RTB), bound by a disulphide bridge. The toxin interferes with protein synthesis by inhibiting ribosomes, thus inhibiting elongation in protein synthesis. Ricin targets ribosomes by excising an adenine from the native structure of the ribosomal RNA. Such inhibition leads to cell death [329].

Among other factors, the easy access to Castor beans worldwide, the high cell toxicity, high lethality, and possibility to aerosolize ricin (fine powder of ricin suspended in air, for example), associated with the absence of a regulatory approved antidote, makes ricin, as organophosphate insecticide poisoning, an « interesting » biological bioterrorism weapon [330]. Consequently, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classifies ricin as a Category B (moderately easy to disseminate, able to cause morbidity and low mortality) agent for disease control and prevention.

When inhaled, ricin lethality is exacerbated relative to ingestion or injection [329,331]. Indeed Roy *et al.* [332] confirmed that ricin is a good example of a biological bioweapon for which exacerbation of the toxicity is governed by the respiratory route of administration. In this context of classified inhaled CDC pathogens, understanding the ricin aerosol route of administration as a means of severe pathogen dissemination

[333,334] and the development of prophylactic treatments in macaque models is crucial for the development of MCMs.

Chen *et al.* estimated the inhaled median dose of ricin that is lethal to 50% of population (LD₅₀) to be 5.8 µg/kg for macaques and 0.259 mg for a human of 70 kg. In 2019, Chad Roy and his team from the Tulane National Primate Research Center (TNPRC) of Louisiana (USA) published a paper on a potential humanized antibody (huPB10)[332] against the RTA active site. Five of 12 rhesus macaques of 3.8 to 10.2 kg received 10 mg/kg of the antibody intravenously four hours after being exposed to small aerosols of ricin toxin at a target dose of 18 µg/kg (3 x LD₅₀, equivalent to 100-200 µg toxin in the lungs). The study showed statistically significant survival and fewer clinical symptoms of ricin intoxication (severe respiratory distress) than in the control animals. Table 2 demonstrate that small aerosols of ricin (1 µm)[335] leads to lower respiratory lesions whereas big size of 8 µm [333,334] leads to URT lesions in monkeys. We can conclude of a size response relationship.

Also, Respaud *et al.*[210] developed an anti-ricin monoclonal antibody therapeutic system: a customized Aeroneb ® mesh nebulizer system (Volume Median diameter of 3 µm) for delivery of small aerosols of anti-ricin antibody to the lungs. The system was tested in macaques, in order to extrapolate the results in humans to treat ricin intoxication.

In the vaccine research pipeline, scientific efforts against agents of threat toxins, such as ricin, are a true challenge and a top priority for biodefense programs of many countries [336]. Wilhemsen *et al.* [337] developed a rhesus macaque model with specific profound gross LRT lesions after exposure to 1.2-µm particles of aerosolized ricin toxin (inhaled dose of 21- 42 µg/kg). There are currently no published results comparing the aerosol route of exposure to another respiratory route of exposure (instillation, intrabronchial) in macaque models.

4.3.2. Ethical considerations

The FDA Animal Rule justify the use of NHP in the development of medical countermeasures as human's experimentation is impossible.

However, ethical considerations regarding NHP must be taken into account. Indeed, challenge of NHP with particularly aerosols of bioterrorism agents leads to severe models of animal.

Scientist must take into account the 4Rs rule (Reduce, Refine, Replace, Rehabilitate) especially when using NHP model.

Alternative methods to animal experiments like organ on chip [338] or constrained drop surfactometer *in vitro* methodology[339] are in progress, but they require time development and must be validated by comparison to *in vivo* results.

Supplementary Materials : Airborne pathogens administration in non-human primates

Justina Rose Creppy, Benoit Delache, Julien Lemaitre, Branka Horvat, Laurent Vecellio and Frédéric Ducancel

Table S1. Summary of the data from the literature presenting the effect of the size of aerosol and the route of transmission on their clinical impact and infectivity in CDC classification of bioweapons of infectious agents and toxins. Data are obtained in Non-Human Primate preclinical models and confirm the impact of aerosolized infectious agents of various size in the physiopathology of priority agents or toxins.

*LD₅₀: Dose which causes the death of 50% of tested animals.

**LNT₅₀: Number of microorganisms (contained in volume of air) which cause the death of 50% of tested animals in a given time of exposure.

CDC Category Agents	Type of biologics	Aerosol particle size	Dose /Concentration	Results	Animal Characteristics	Generator	Exposure system	Reference
A: High-priority agents	<i>Bacillus anthracis</i> (anthrax)	1 µm	2 x 10 ⁹ spores/mL (20 % viable)	-Head: 32.4±10% - Trachea: 0.76± 10% - Lungs: 66.8 ±20%	Rhesus macaques	Collison atomizer	Aerosols hand held mask	(Harper & Morton, 1953)
		4 µm		-Head: 43.6 ± 16% - Trachea: 8.6 ± 16% - Lungs: 47.8 ± 23.5%				
		6 µm		-Head: 42.3 ±12% - Trachea: 8.8 ± 12% - Lungs: 48.8 ± 21.8%				
		12 µm		-Head: 86.4 ± 10% - Trachea: 3.4 ± 10% - Lungs: 10 ± 14.6 % -				

			**LNT ₅₀ = 0.045x10 ⁻⁶				
	1 μm	10 ⁶ spores	No massive oedema (face and head) Pulmonary disorders --> death	Rhesus macaques <i>Macacca mulatta</i>	Collison nebulizer	Exposure chamber	(Druett <i>et al.</i> , 1953)
	12.4 μm		**LNT ₅₀ = 0.64 x10 ⁻⁶ massive oedema of the face and head -> death =14 times less efficient than 1μm spores.				
	Between 1 to 2 μm	Dose of exposure 1.47x10 ³ CFU	Dose response relationship Gross pathology: Gastrointestinal Haemorrhages Oedema Pulmonary lesions Meningeal Haemorrhage Ames strain lethal by inhalation route	Cynomolgus 3 macaques	3 Jet Collison nebulizer	Head-only exposure chamber	(Vasconcelos <i>et al.</i> , 2003)
	Between 1 to 3 μm	Dose of exposure 1.4x10 ¹ to 1.9x 10 ⁵ CFU	No dose-response relationship Gross pathology Gastrointestinal Haemorrhages Oedema Pulmonary lesions No Meningeal Haemorrhage	Marmosets 3	3 Jet Collison nebulizer	Head-only exposure chamber	(Lever <i>et al.</i> , 2008)

Francisella tularensis

LD₅₀: 14 cells

Severe symptoms:
Lower Respiratory Tract symptoms (LRT)
Pneumonitis
Death : 02 to 3 days

Dose response relation

2.1 μm 4x10⁷cell/mL

LD₅₀: 378 cells

Severe symptoms:
Lower Respiratory Tract symptoms (LRT)
Pneumonitis
Death : 02 to 3 days

Dose response relation

Rhesus macaques (*Macacca mulatta*)
UCTL Atomizor
Aerosols Exposure chamber
(Day & Berendt, 1972)

7.5 μm 4 x 10⁸cell/mL

LD₅₀ : 872 cells

Mild symptoms:
Upper Respiratory Tract :conjunctivitis & purulent nose and eyes discharge & nasopharyngeal abnormalities
Death : 06 to 10 days

Dose response relation

12.1 μm 4 x 10⁹cell/mL

LD₅₀ 4447cells

Mild symptoms:
Upper Respiratory Tract:
conjunctivitis &

24 μm 4 x 10¹⁰cell/mL

								purulent nose and eyes discharge & nasopharyngeal abnormalities Death: 06 to 10 days Dose response relation
	6.5 μm							Severe active tularemia whole lungs lesions Dead/Exposed for the 4 doses in total = 19/24 Size-response relationship
	11.5 μm	4 target inhaled doses 500,1000, 2500 and 5000cells						Small focal lungs lesions, Upper Respiratory Tract Lesions (tracheitis, laryngitis, conjunctivitis) Dead/Exposed for the 4 doses in total =17/23 Size-response relationship
	22 μm							No lesions of active Tularemia Dead/Exposed for the 4 doses in total =7/23 Size-response relationship
								Rhesus macaques (<i>Macaca mulatta</i>) Three Jet Collison nebulizer Aerosols Head-only exposure chamber (Blundell, Mulder, Day, & Kerpsack, 1962)

Filoviruses - Ebola virus (EBOV)

1 µm	LD ₅₀ = 17 number (no.) of cells	LD ₅₀ values decreases as the particles sizes decreases and a dose response relation	Rhesus macaques	Collision atomizer	Exposure chamber	(Goodlow & Leonard, 1961)
7 µm	LD ₅₀ = 240 no. of cells					
12 µm	LD ₅₀ = 540 no. of cells					
22 µm	LD ₅₀ = 3000 no. of cells					
12.95 ± 0.74 µm	100, 1000 and 10. 000 PFUs	Severe pulmonary disease Delay of Mean time to death= 10 to 12 days Important URT lesions Moderate hepatocellular necrosis < 5%	Rhesus macaques (<i>Macaca mulatta</i>)	Three-Jet Collison nebulizer	Head-only chamber	(Bohannon, 2020)
1.4 µm	Challenge doses between 7.43x10 ² and 2.74 x10 ⁵ PFU	Time to deaths 7 to 10 days Aerosols challenge route for the doses: Massive respiratory-associated lymphoid tissues and mediastinal lymph nodes & Haemorrhagic fever rash	(<i>Macaca mulatta</i>)	Thre[e-Jet Collison nebulizer	Head-only chamber	(Twenhafel <i>et al.</i> , 2013)

Cowpox virus	Not defined	0.8 to 1280 PFUs	<p>Petechial rash observed with aerosols route (Rhesus and Cynomolgus)</p> <p>Fever duration modified for each species Rhesus macaques (62.7 ± 16.3 h) Cynomolgus macaques (82.7 ± 22.3 h) African green monkeys (88.4 ± 16.7 h)</p>	<p>Cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>) & Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) & African green monkeys (AGMs) (<i>Chlorocebus aethiops</i>)</p>	Three-Jet Collison nebulizer	Head-only aerosol chamber	(Reed <i>et al.</i> , 2011)
	Between 0.5 to 3 µm	5 × 10 ⁵ PFU and 5 × 10 ⁴ PFU	<p>Incubation period: 5 days</p> <p>Severe Broncho-pulmonary respiratory disease</p> <p>Fulminant respiratory tract disease</p> <p>100% of lethality</p>	Rhesus monkeys (<i>Macaca mulatta</i>)	Three Jet Collison nebulizer	Head only aerosol exposure chamber	(Johnson <i>et al.</i> , 2011)
	7.0 to 9.0 µm	5 × 10 ⁴ PFU to 5 × 10 ⁷ PFU	<p>Upper respiratory tract and large airways: sites of virus-induced pathology</p> <p>Severe URT disease (tracheitis, pharyngitis and epiglottitis)</p> <p>Limited alveoli and systemic dissemination</p> <p>75% of lethality</p> <p>Incubation period: 9 days (different incubation period for Intra-bronchial and Intranasal route)</p>	Rhesus monkeys (<i>Macaca mulatta</i>)	Centre flow tangential aerosol generator (CenTAG) produces large-particle aerosols	Head only aerosol exposure chamber	(Johnson <i>et al.</i> , 2016)

	Plague: <i>Yersinia pestis</i>	1.25 µm	Inhaled dose of exposure 30 000 cells	Incubation time post infection: 2 to 5 days Death: 24 hours post-infection Renal disorders: Glomerular fibrin thrombi Blood coagulation disorders: Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) Pneumonic plaque	Indian Rhesus macaques (<i>Macacca mulatta</i>)	Henderson apparatus	Head-only exposure system	Finegold <i>et al.</i> , 1968
		Between 2 to 5 µm	Challenge dose 12 to 42700 CFU	Clinic plague: High fever , lethargy and anorexia Study demonstrated no respiratory clinical signs	Indonesian cynomolgus macaques (<i>Macacca fascicularis</i>)	Collision nebulizers	Head-only exposure system	(Van Andel <i>et al.</i> , 2008)
B: Second highest priority agents	Ricin toxin from <i>Ricinus communis</i> (Castor beans)	1 µm	Dose of exposure : LD ₅₀ (value not specified)	Severe bronchopneumo disease after 32 H post exposure lungs diseases and 50% of animal death.		3-jet collison nebulizer (1µm)		
		8 µm	Dose higher than LD ₅₀ at 1 µm particle size until the maximum deliverable dose is obtained by exposure system	No animal death	AGMs	Spinning top aerosol generator (8 µm)	Head-only chamber	(Leffel <i>et al.</i> ,2022)

C: Third Highest Priority Agent	SARS-associated coronavirus (SARS-CoV-2)	1.2 µm	Exposure to sub and lethal dose 1.6 to 6.6 LD ₅₀ , (LD ₅₀ = 5.8 µg/kg) Exposure to Sublethal dose 3 µg/kg	Lethal dose exposure severe bronchopneumo disease, death in 24H to 48H sublethal doses exposure: no death, long term disease after recovery from lung disease	Rhesus macaques (<i>Macaca mulatta</i>)	3-jet collison nebulizer	Head-only chamber	(Pincus <i>et al.</i> , 2015)
		1 µm	3x 10 ⁴ particules / (cubic centimeter) (LD ₅₀ = 5.8 µg/kg)	Human pulmonary fibrosis	Rhesus macaques (<i>Macaca mulatta</i>)	3-jet collison nebulizer	Head-only chamber	(Bhaskaran <i>et al.</i> , 2014)
		1- 3 µm	10 ³ , 10 ⁴ , and 10 ⁵ PFU	Highly pathogenic coronavirus infection by aerosol (nonlethal)	AGMs (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	Collison Nebulizer	Aerosols Exposure System	(Totura <i>et al.</i> , 2020)
		1.7 µm	Inhaled dose of exposure 3.7– 4.2 log ₁₀ PFU	Severe lung pathology	AGMs	Aerogen Solo vibrating mesh nebulizer	Aerosols Exposure Sytem	Hartman <i>et al.</i> , 2020) [81]
		Between 1 to 3 µm	5.0 x10 ⁴ and 5.0 x 10 ⁵ PFUs	Mild disease (cyno and rhesus monkeys) uniform distribution pattern (Cynomolgus: most severe pathology after aerosol exposure) Not lethal	Cynomolgus macaques and rhesus macaques	Collison Jet nebulizer	Head exposure system	(Bixler <i>et al.</i> , 2021)

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2 µm	Estimated retained animal dose 22–250 CFU	Lung lesions: gross and microscopic pathology characteristic clinical signs and disease features of tuberculosis (TB)	Mauritian cynomolgus	3-jet Collison nebuliser in conjunction with a modified Henderson apparatus	Nares of each primate via a modified veterinary anaesthetic mask	(Sharpe <i>et al.</i> , 2017)
	Between 0.5 to 3 µm (small)	1x10 ⁴ PFUs and 500 PFUs	-Lungs damages -Absence of brain/neurological damages -Haematological troubles	AGMs (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	Nebulizer: 3-Jet Collison nebulizer	Head only Exposure inhalation	Cong <i>et al.</i> , 2017)
Nipah virus (encephalitis)	Between 6.10 to 7.19 µm (intermediate)	100 PFUs and high 1000 PFUs	Pulmonary respiratory disorders Lack of neurological signs but brain lesions (MRI)	AGMs (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	Using centered flow tangential aerosol generator	Head only Exposure inhalation	(Hammoud <i>et al.</i> , 2018)
	7 µm (intermediate)	22-90 PFU and 408-1197 PFUs	No difference observe in the two dose groups Immune response and cytokine storm (B cell immune response)	AGMs (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	Using centered flow tangential aerosol generator	Head only Exposure inhalation	(Lara <i>et al.</i> , 2019)
	Between 11. to 12.5 µm (large)	500 PFUs	Brain/neurological disorders	AGMs (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	Nebulizer not precised	Head only Exposure inhalation	(Lee <i>et al.</i> , 2020)

Conclusion

The NHP model is relevant for inhalation studies because:

- it mimics the complexity of the anatomical respiratory structures and air transmission inside healthy or pathological human lungs.
- it presents a good model of aerosol exposure and deposition
- it is a model of several respiratory infectious by bioaerosol

Various methods are used to deliver biologics to NHP airways. Instillation in NHPs allows the delivery of a reproducible and a precise dose to the respiratory tract but does not mimic the aerosol deposition profile of humans.

Aerosol delivery in NHPs allows an overall distribution profile in the airways similar to that of humans but is associated with varying deposition in the LRT. The type of nebulizer and type of exposure system can affect the deposition profile and the dose of biological agent delivered to the LRT by up to a factor of 100.

The size of aerosol particles clearly determines the site of deposition, the induction of the pathophysiological response, and the clinical and/or toxic manifestations that lead to eventual lethality.

Author Contributions: J.R.C., B.D., J.L., B.H., L.V. and F.D. participated in the review, writing and revision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments: We acknowledge the financial support from CEA- Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT), Fontenay-aux Roses, France and the Agence Innovation Défense (AID), France

Funding: Justina CREPPY: PhD grant is funded by CEA- Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT), Fontenay-aux Roses, France and the Agence Innovation Défense (AID), France, from Region ARA, France (Pack Ambition Recherche, project AerVirStop-BH) and from ANR Astrid Maturation (Project NebuNipaStop ANR 16-ASMA-0008-01-BH).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

La partie qui suit concernant les organophosphorés n'a pas été incluse dans la revue de la littérature pour soumission car nous avons souhaité focaliser la revue sur les bioaérosols d'agents pathogènes de la menace bioterroriste (classification selon le CDC), utilisés chez le Primates Non Humains. Cependant, les études de Rosenberg, démontrer que les Organophosphorés (OPs) dont des neurotoxiques létaux utilisés comme insecticides ou comme arme chimique militaire utilisée à des fins bioterroristes, bien qu'étant interdits.

L'études des dépôts d'aérosols et des effets des aérosols d'OPs, chez le PNH s'avère donc essentielle. Le chapitre qui suit, qui aurait pu s'intégrer dans la revue, résume, les points essentiels sur les OPs, et leurs aérosols déposés chez le PNH.

Organophosphorus

The recent news on the probable poisoning with highly neurotoxic Novichok type substances, without forgetting the previous international news on the use of toxic nerve agents or pesticides (sarin gas used in Syria or Afghanistan) that can penetrate the body through the pulmonary pathways, including aerosols, reiterates the importance of having robust and relevant preclinical models for the development of prophylactic treatment and precise knowledge of the acute clinical pathophysiology post intoxication/infection.

Organophosphorus (OP) toxins are nerve poisons that belong to the large family of organophosphate chemical pesticides. They are irreversible inhibitors of acetylcholine esterase (AChE), an enzyme involved in the transmission of nerve impulses. OPs inhibit the red blood cell cholinesterase, acetylcholinesterase (AChE), and the plasma cholinesterase, butyrylcholinesterase (BuChE), and can inhibit a brain carboxyesterase called neuropathy target esterase [340]. The well-known antidotes of OP intoxication are oximes (pralidoxime, Contrathion[®]), which reactivate the esterase and therefore reverse the effects of OPs by forming an oxime-OP complex.

Generally used in criminal intoxication (these pesticides can also be used for "beneficial" purposes, such as insecticide biocides in agriculture, the class of pyrethroid insecticides), these organic compounds have well known toxicity. They can cause acute (< 24 h) or subacute (< 1 month) neurotoxicity, most often resulting in chronic sequelae, with damage to the central and peripheral nervous system.

It is consequently important to develop preclinical models that can mimic the potential route of administration in case of a terrorist attack with these agents delivered by the aerosol route. Developing such a preclinical model of aerosol toxin deposition led to strengthening of the MCMs in this field. It is therefore important to find the nebulizers that can best aerosolize these chemical compounds with the appropriate physical characteristics to achieve representative deposition in the URT and LRT and that can

deposit them throughout the respiratory tract [225] in the event of the development of potential new aerosolised antidotes or potential prophylactic aerosolized treatments used as a bio shield [341].

These countermeasures will then be used to provide robust toxicology data, in accordance with the FDA's Animal Rule for *in vivo* studies in NHPs.

In this context and in light of the details presented in this review and according to the principle of the Animal Rule, Dr Rosenberg and her team (PlantVax) have become a world reference in the study of OPs and their antidotes in macaque models. They again confirm NHPs as an exclusive and valuable model for the deposition of OP aerosols or potential new antidotes. Indeed, following exposure to toxic or therapeutic aerosols via a facemask or head-only exposure, mimicking environmental exposure (criminal or accidental), they develop clinical signs of intoxication similar to those of humans (tremors and/or muscle rigidity, breathing difficulties) in a few hours post-exposition [342].

The goal in terms of finding new antidotes, assessing the development of post-exposure countermeasures, and seeking regulatory approval by the authorities in the field of insecticide poisoning is to find the oximes that best cross the blood-brain barrier to quickly reactivate OP-inhibited AchE or BChE and reverse the clinical symptoms. In this context, aerosolization is a key route of pulmonary lung administration in macaque models, which mimic human physiology. This technique has been used both to test an interesting new oxime post-aerosol exposition to a member of the oxon family of OPs, paraoxon [342], and to assess the long-term prophylactic development of an aerosolized solution of recombinant human BchE (aer-rHuBChE) used as a bio shield that neutralizes inhaled OPs [343]. Indeed, several years before, scientists [341] showed that vibrating mesh nebulizers are likely the "gold standard" for broad lung deposition of large amounts of high molecular-weight biopharmaceutical proteins, such as rHuBChE, relative to ultrasonic and jet nebulizers. Vibrating mesh nebulizers show optimal and protective long-term deposition in the lungs in macaque models.

Conclusion sur la revue

La revue de la littérature démontre qu'au-delà de ses caractéristiques physiologiques proches de l'Homme, le PNH est le modèle le plus pertinent pour les études d'inhalation notamment pour des agents pathogènes à haut risque de létalité comme les agents de bioterroriste classés par le CDC. Dès lors que ces agents sont aérosolisés, le risque de létalité est important à cause de leur potentiel de pénétration et de dissémination par les différences orifices respiratoires.

L'effet des particules infectieuses sous forme aérosol dépend non seulement de la dose déposée mais également du site de dépôt dans les voies respiratoires.

Il est encore nécessaire d'étudier le dépôt des aérosols dans les modèles PNH pour mieux comprendre ce qui se passe chez l'humain.

Dans le cadre de la règle de 3Rs, il est nécessaire d'avoir des modèles alternatifs aux études chez le PNH, qui est une espèce structurellement et physiologiquement complexe. C'est pourquoi nous avons développé un modèle de macaque, physiologique *in vitro* en 3D Cast pour les différentes mises au point d'expérimentation avant les essais chez le macaque.

Chapitre II: Article publié dans le journal **Pharmaceutical Research**, « **Comparison of Aerosol Deposition Between a Cynomolgus Macaque and a 3D Printed Cast Model of the Animal** »

Développement d'un modèle alternatif in vitro 3D Cast pour l'étude du dépôt des aérosols chez le macaque

Creppy, J., M. Cabrera, N. Kahlaoui, J. Pardessus, J. Lemaitre, T. Naninck, B. Delache, G. Roseau, F. Ducancel and L. Vecellio (2023). "Comparison of Aerosol Deposition Between a Cynomolgus Macaque and a 3D Printed Cast Model of the Animal." *Pharmaceutical Research*: 1-11.

Les modèles *in vitro* sont nécessaires pour étudier le dépôt et le devenir des particules inhalées dans les voies aériennes.

Il existe différents modèles alternatifs pour étudier ces dépôts. Il s'agit des modèles *in silico*, modèles numériques basés sur les données des études *in vivo* et *in vitro* ; les modèles *in vitro* 3D Cast développés à partir d'impressions 3D ou des modèles d'études du dépôt des aérosols à partir de moulage des voies aériennes.

Il est important de noter que les essais sur les modèles animaux, en particulier le PNH sont réglementés et surveillés par des comités d'éthique. C'est pourquoi, dans le cadre de la règle des 3 Rs, établie en 1959 par William Russel et Rex Burch [344], il est important de Remplacer, Réduire et Raffiner l'usage des animaux en recherche préclinique.

Pour cela, nous avons conçu un modèle *in vitro* 3D Cast imprimé jusqu'à la troisième division bronchique à partir de scanner de macaque sélectionné.

La conception de ce modèle est un raffinement des précédents modèles *in vitro* 3D Cast de macaque développés par le CEPR de Tours, qui sont imprimés uniquement jusqu'au début de la trachée des macaques sélectionnés pour l'impression 3D.

Le modèle développé a fait l'objet d'un article intitulé « **Comparison of Aerosol Deposition Between a Cynomolgus Macaque and a 3D Printed Cast Model of the Animal** » publié en janvier 2023 dans le journal « *Pharmaceutical Research* » [165]. Copie ci-dessous.

La présentation de cet outil développé, a remporté le deuxième prix financé par Sanofi, lors du concours « My 3Rs in 180 secondes » durant le congrès FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) à Marseille en juin 2022.

Le résumé de la présentation qui a obtenu le prix a été publié sur les sites internet respectivement du Centre Français de Références des 3R (FC3R) et du CEA de Fontenay-aux-Roses.



Comparison of Aerosol Deposition Between a Cynomolgus Macaque and a 3D Printed Cast Model of the Animal

Justina Creppy^{1,2} · Maria Cabrera² · Nidhal Kahlaoui¹ · Jeffrey Pardessus² · Julien Lemaitre¹ · Thibaut Naninck¹ · Benoît Delache¹ · Georges Roseau³ · Frédéric Ducancel¹ · Laurent Vecellio²

Received: 19 October 2022 / Accepted: 19 December 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

Purpose Preclinical aerosol studies using animals are essential for evaluating toxic or therapeutic effects on human respiratory tract.

Macaques are relevant animal models for respiratory studies, but they are sensitive, expensive and difficult-to-access.

Methods In the context of preliminary studies before animal experiments, we set up an alternative *in vitro* anatomical model of macaque airways to reduce, refine and replace (3Rs) the animals. We printed an *in vitro* anatomical cast until the third bronchial division from X-ray computed tomography data of a healthy cynomolgus macaque. This *in vitro* model was then connected to a respiratory pump to mimic macaque's breathing. We assessed the relevance of this *in vitro* model, by comparing aerosol deposition patterns obtained with the anatomical model and in three macaques using planar gamma camera imaging. DTPA-^{99m}Tc aerosols were produced using three jet nebulizers, generating three different particle sizes: 13.1, 3.2 and 0.93 μm in terms of the mass median aerodynamic diameter (MMAD).

Results The data showed no statistical differences between the animal and anatomical *in vitro* models in terms of total aerosol deposited in the airways. However, the distribution of the deposition in the airways showed a higher deposited fraction in the upper respiratory tract in the animals than the *in vitro* model for all particle sizes.

Conclusions The anatomical printed model appears to be a relevant *in vitro* tool to predict total aerosol deposition in macaque airways.

Keywords aerosol · deposition · gamma camera · inhalation · macaque

Introduction

Aerosol inhalation is a long-standing practice, mainly used in the treatment of upper respiratory tract/ URT (nose and nasal cavity, pharynx, and larynx) diseases, such as sinus disorders [1–4], or lower respiratory tract/

LRT (trachea, bronchi, bronchioles, and alveoli) pulmonary diseases [1–3], such as asthma [4], cystic fibrosis, some infectious diseases, and chronic obstructive pulmonary disease [5–8].

Their efficacy and dispersion in the airways depend on the size of the generated particles used to target the URT and/or LRT, how the aerosols are administered and the interface between the host and aerosol delivery device (mask for example). Thus, in 2003, US-FDA authorities confirmed that it is essential to assess and quantify the amount of aerosols deposited inside nasal airways [9] and to determine, by extrapolation, the amount deposited in the LRT. Furthermore, different types of nebulizers generating the same size aerosols can result in different deposition sites inside the airways [10]. Consequently, aerosol size is not the only critical parameter for predicting regional deposition inside the body.

Thus, studies targeting the different parts of the airways are essential for predicting aerosol deposition.

✉ Justina Creppy
Justina.creppy@cea.fr

¹ Center for Immunology of Viral, Autoimmune, Haematological and Bacterial Diseases (IMVA-HB/IDMIT), Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, 18, Route du Panorama, DRF/JACOB/IDMIT, BAT 62 - Pce 308, 92265 Fontenay-Aux-Roses, Cedex, France

² Université de Tours, Centre d'Étude Des Pathologies Respiratoires, INSERM U1100, Tours, France

³ Université de Tours, Plateforme Scientifique Et Technique-Animalerie (PST-A), Tours, France

Furthermore, inhalation studies are necessary for inhaled-drug marketing authorization and the transposition of pre-clinical results to clinical application [11].

Preclinical studies are also necessary for the testing of toxic aerosols (biological infectious agents, toxins, environmental compounds) [12, 13], and the development or evaluation of medical countermeasures [14].

Relevant animal models for inhalation studies are non-human primates (NHPs) and pigs [15] due to their similarity to humans in terms of anatomy and lung lobation. NHPs are the only animal model that depicts the complexity of the anatomical respiratory structures and air transmission inside the lungs of humans.

Nevertheless, even for regulatory, purposes (drug or vaccine development for example) NHP models are difficult to access (availability and cost) and require specific housing combined with dedicated animal welfare procedures.

It is therefore crucial, in accordance with the reinforcement of the 3Rs (replace, refine, and reuse), rule, to favor alternative NHP aerosol models [16] before experimentation on living NHPs, such as macaques. One attractive possibility is to use an *in vitro* replica of the NHP respiratory system. Such an *in vitro* tool would allow a better understanding of aerosol deposition, predict pharmacokinetics/dynamics of any aerosolized substance, and reduce the use of NHPs. Using such a tool during the pre-characterization step (before using animals) would allow the set-up of all technological elements required for aerosols delivery before moving on to animals, which, ultimately, would allow extrapolation to humans.

Such printed *in vitro* 3D models are already available for humans and have been recently validated for the study of aerosol deposition in the upper airways [10, 17–19]. Furthermore, it is undeniable that, preclinical experimentation on animals is facing a re-evaluation, given the increasing of restrictions and demanding procedures required to justify the use of animals. Ehrmann *et al.* [20], confirmed that many alternative models are already available in the clinical domain, from *ex vivo* cell models to others diverse models of respiratory tracts. Thus, deposition studies have been performed with human airways cast from cadavers [21] or that have been 3D printed [18, 22].

We aimed to develop, describe, and evaluate an alternative *in vitro* anatomical model of the macaque respiratory tract and compare it to that of animals and assess the deposition aerosols of different size.

The resulting 3D cast was designed using a X-ray scan of the respiratory tract of a living macaque. We assessed the relevance of this model, by comparing the aerosol deposition in the 3D *in-vitro* model to that in three female macaques. The aerosol deposition studies were performed using three different nebulizers and measured by gamma camera imaging using radiolabelled aerosols.

Materials and Methods

In Vitro Cast Printed Model

Two highly similar models were printed using 3D-printing technology from the whole head until the first bronchia divisions of a healthy living male *cynomolgus* macaque at IDMIT (Infectious Diseases Models for Innovative Therapies, CEA, Fontenay-aux-Roses, France). The casts were generated using the 3D printing stereolithography technique from raw computed tomography CT data of the macaque. The chosen macaque was large (6.6 kg), with large airways, a recommended condition for the printing technique that was used.

CT Equipment and Whole-Body Scanning of Macaques: First Step for the Printing of the *In Vitro* 3D Cast

A clinical CT imaging system (Vereos-Ingenuity, Philips Healthcare, Best, Netherlands) was used with a 64 × 0.6 mm CT detector collimation using a tube voltage of 120 kV and an intensity of approximately 120–130 mAs. CT images were reconstructed with a slice thickness of 1.25 mm and an interval of 0.25 mm. The clinical CT equipment was used to produce the scans needed for the 3D printing of the *in vitro* cast.

The selected macaque (6.6 kg body weight) underwent a whole-body high-resolution X-ray CT scan after being anesthetized with an intramuscular injection of ketamine (0.03 mg/kg, Centravet, Dinan, France) and Domitor® (0.22 µg/kg, Viatrix, Meyzieu, France). During the scans, the animal was lying on its back in a dorsal decubitus position and was spontaneously breathing. CT acquisition lasted approximately about 15 s. The obtained DICOM raw images were converted into STL files using Materialise (Materialise® NV, Leuven, Belgium) Mimics 23 software (Materialise® Mimics Innovation Suite, Leuven, Belgium). We printed the trachea and bronchial trees with major branches according to the capabilities of the printer, with a layer thickness of \geq 2 mm (stereolithography).

Description of the *In Vitro* 3D Printed Cast Model

The final printed model hereafter called the *in vitro* 3D cast model was made of a rigid transparent washable tusk® material (tusk XC2700T, Materialise, NV, Leuven, Belgium). The printed cast model (described in Fig. 1) is composed of two parts attached to each other:

- The **first part** of the cast model (URT) consists of the whole head, segmented into four longitudinal parts,

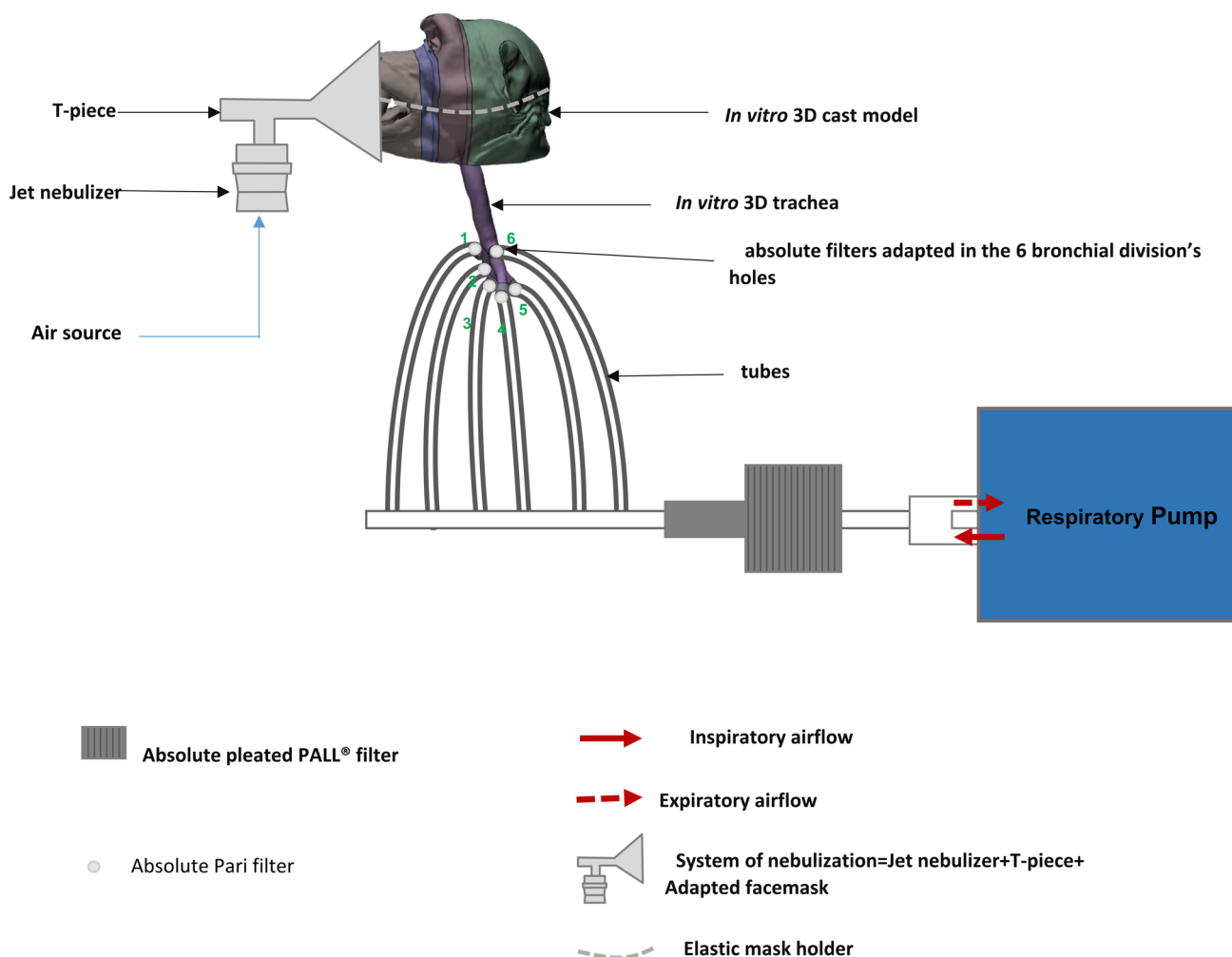


Fig. 1 *In vitro* experimental set-up. A pediatric human facemask (DTF Medical, Saint Etienne, France) was used with the three types of nebulizers. The facemask covers the nose and mouth when placed on the face. The total duration of nebulization (for each of the three nebulizer experiments) was 10 min.

allowing visualization of the aerosol and deposition inside the transparent waterproof nasal cavities. The head was printed from the exterior details (ears, forehead, and complete mouth, with the teeth etc.) to the internal details (sinuses and, ostia of the naso-pharynx).

- The **second part** of the model, which constitutes the LRT, is connected to the first part. It includes the trachea and bronchial tree with six bronchial divisions.

Holes were printed at the extremity of the six bronchi, allowing connection to filters (PARI® filter 041B0523, Starnberg, Germany) and a respiratory pump (Harvard Apparatus, Massachusetts, USA; tidal volume = 26 mL, respiratory rate = 33 cycles /minute, I/E (inspiratory/expiratory) = 40/60) to simulate the spontaneous physiological breathing of a healthy macaque.

The experimental setup is presented in Fig. 1.

Nebulizers

Three medical jet nebulizers were used to generate submicrometric and micrometric aerosols: Microcirrus® (Intersurgical, Berkshire, UK), Sidestream® (Philips Healthcare Andover, USA) and a prototype NL20® (DTF Medical, Saint-Etienne, France). The Microcirrus® and Sidestream® nebulizers were loaded with a 150 MBq (3 mL) solution of diethylenetriamine penta-acetic acid (^{99m}Tc -DTPA), (Curium Life Forward, Gif-sur-Yvette, France). The NL20® prototype nebulizer was filled with a 150 MBq (5 mL) solution of ^{99m}Tc -DTPA. The Sidestream® and Microcirrus® nebulizers were connected to an air source operating at 8 L/minute to produce aerosols. The NL20® prototype operates at an airflow source rate of 4 L/minute; air was added at 4 L/minute in a second opening of the nebulizer, making a total of 8 L /minute, to have the same aerosol velocity for the three nebulizers.

Animals and *In Vivo* Experimental Design

Three female *cynomolgus* macaques (*Macaca fascicularis*), bred in Mauritius were used to compare aerosol deposition with that of 3D cast model.

The experimental animal protocol was conducted in accordance with the European regulations for animal experimentation committee, under ethics committee agreement number 29462#2021020212179142V2.

Following acclimation, the three macaques (3.3 kg, 4.3 kg, and 4.5 kg) received veterinary check-ups to ascertain their global health, in particular, their respiratory capacity, before inclusion in the study. The integrity of the lungs was evaluated before the aerosol deposition studies using a thoracic scanner (CT, IRIS-CL, Inviscan, Strasbourg, France). A two-bed CT scan was performed consisting of 576 projections over 360 degrees, at 80 kV and 0.9 mA, with an exposure time of 90 ms, leading to a total acquisition time of 104 s. The three-dimensional image was reconstructed using beam hardening correction, ring artifact pre-correction, resulting in 1190 slices with a voxel size of $160 \times 160 \times 160 \mu\text{m}$.

Each macaque in our experimental setup randomly received aerosols generated from each of the three selected nebulizers two times ($n=6$). For inhalation of the aerosols, animals were sedated in a unique contention chair. Acclimatization and training of the macaque in the chair and to breath spontaneously through a facemask were performed, for each animal one week before each experiment, to limit stress.

The animals received aerosols after being anesthetized by intramuscular injection of ketamine (3 mg/kg), (Imalgene® 1000, Centravet, Dinan, France) and Sedorm® (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Medetomidine 1 mg/Kg).

A gel (Ocry-gel®) was used to lubricate and close the eyes of the animals to avoid eye exposure and dryness. Once the mask was in place on the face, the nebulizer was connected, and the nebulization started simultaneously with a timer (to achieve a 10 min nebulization process) and a saturometer placed on their fingers to control vital parameters (blood saturation and cardiac rate).

Once back in their cage, the macaques were slowly awakened using an intramuscular injection of Alzane® (Atipamezole, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Particle- Size Measurements

Particles-size distributions of the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA aerosols generated by each of the three jet nebulizers were measured three times for each nebulizer using cascade impactors. A new generation impactor, (NGI, Copley Scientific Ltd, Nottingham, United Kingdom) operating at 15L/min

was used for the NL20® and Sidestream® nebulizers and a DEKATI® low-pressure Impactor (DLPI) operating at 10L/min for the Microcirrus® nebulizer. At the end of nebulization process, the quantity of particles deposited for each stage of either the DLPI or NGI was determined by scintigraphy imaging using a gamma camera (Single Head Ecam Siemens healthcare, Erlangen, Germany). Thus, the median mass aerodynamic diameter (MMAD) was calculated for the polydisperse aerosols of the three nebulizers. We also calculated the particle fractions for diameters smaller than 0.5 μm , 1 μm , 2 μm and 5 μm . These fractions were calculated using the European and French guideline (EN13544-1) [23, 24] for characteristics and performance of inhalation systems. Providing particles fractions, helps to predict the fraction of aerosols likely to be deposited in the URT and LRT [25] as function of aerosol size [23].

Deposition Measurements: *In vivo* and *in vitro* Image Acquisition

Comparative CT Scans of the *In Vitro* vs *In Vivo* Models

Comparative X-Ray CT scans (Vereos, Philips, Netherlands) were performed to compare the geometry of the *in vitro* 3D cast model to that of the initial animal model. We compared scans of the 3D cast model with those of the real macaque model by specifically measuring various defined distances: sinuses, ostia, and trachea. Measurements on the *in vitro* and *in vivo* scans were performed using IntelliSpacePortal 8.0 software (Philips Healthcare, Netherlands). We measured the diagonal diameter and height of the sphenoid sinuses, named a and b and a' and b' respectively, for the *in vivo* and *in vitro* CT scans. We also measured the diameter of the left and right maxillary ostia of the sinuses, named c and c' respectively *in vivo* and *in vitro*. Finally, we measured the beginning of the tracheal lumen, named d and d'. The measured distances are presented in Fig. 2.

Assessment of Aerosol Deposition and Acquisition by Gamma Scintigraphy Imaging

After 10 min of nebulization, aerosol deposition was measured by gamma camera scintigraphy imaging (Single Head Ecam, Siemens healthcare, Erlangen, Germany) for the *in vitro* and *in vivo* models under the same experimental and analytical conditions for both models (*in vitro* vs *in vivo*). Images were recorded using a Siemens planar gamma camera (Single Head ECAM, Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) with a resolution matrix of 128×128 using a single planar detector.

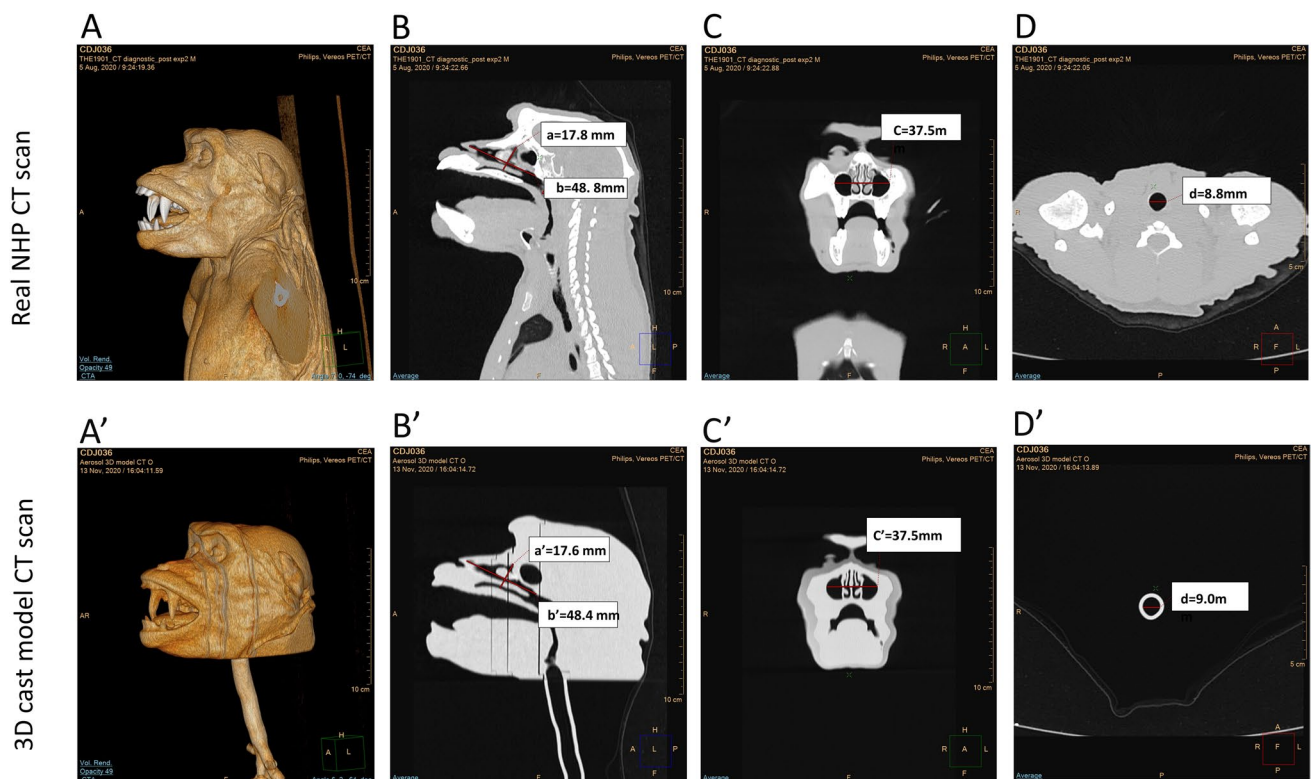


Fig. 2 Comparison of CT scans and measurements of the printed *in vitro* 3D cast model and *in vivo* macaque model. (A) Comparison of the whole body and head until the third bronchial division of a 6.6 kg male *fascicularis* macaque (*in vivo*) and the *in vitro* 3D model printed using a stereolithography manufacturing process (A') until the third bronchial divisions, lateral view. Comparison of the internal face of the macaque (C) and *in vitro* 3D cast model (C'), frontal view and of the tracheal lumen, *in vivo* (D) and *in vitro* (D'), dorsal view.

Before starting nebulization, a 1-min acquisition was performed for each nebulizer to assess the initial radioactive scintigraphy signal. Then, after nebulization, the gamma scintigraphy images of the animals or 3D cast model were acquired for 5 min.

Image Analysis: Gamma Scintigraphy Measurement

To quantify the amount of aerosol deposition by gamma camera imaging, the regions of interest (ROI) were separated into two regions for the *in vivo* and *in vitro* models: the URT and LRT. We applied three different corrections to estimate aerosol deposition: the radioactive decay of ^{99m}Tc , tissues attenuation, and the acquisition time.

Tissue Attenuation for Scintigraphy Image Analysis

We used a 2 min scintigraphy image acquisition time after internal or external radioactivity exposure to determine the attenuation coefficient for each tissue.

Attenuation was calculated for four tissues. The same calculation method for the attenuation coefficients was applied

to the *in vitro* model and the animal, except for the stomach and lungs, as the *in vitro* 3D cast model does not have these elements.

- 1) **Lung tissue attenuation:** an intravenous bolus injection of 1 mL/37 MBq of radiolabelled macroaggregated albumin (LyoMAA- ^{99m}Tc , Pulmocis, France) was performed on each macaque. ^{99m}Tc -LyoMAA particles were biodistributed solely in the pulmonary capillaries by introduction through the saphenous vein to visualize them by scintigraphy imaging (perfusion scintigraphy) of the lung. Due to the limited printing of the *in vitro* model lower airways, lung attenuation consisted of bronchial attenuation (6): the same volume of radioactivity (^{99m}Tc -DTPA) was introduced to each of the six (6) divisions and then measured by scintigraphy imaging.
- 2) **Stomach tissue attenuation:** a gastric catheter was introduced by oropharyngeal route down to the stomach. The stomach was then filled with 10 mL 0.9% NaCl - ^{99m}Tc -DTPA.
- 3) **Nasal cavity attenuation:** each model (animal and 3D cast) received approximately 150 μL /18.5 MBq per nostril of a radioactivity through a thin adapted intranasal

atomization syringe device (MAD 30, Teleflex®, Morrisville, USA).

- 4) **Oral cavity attenuation:** a tube filled with 1 mL/37 MBq of radioactivity was placed inside the oral cavity of the animal or the nasal cast.

We used the average of the nasal and oral cavity attenuation to determine the attenuation of each, as the nasal attenuation calculations were similar to those for oral attenuation and we could not distinguish between the two cavities by gamma camera imaging.

Quantification of Deposited Aerosolized ^{99m}Tc -DTPA

The ROIs were then adapted to each aerosols image to estimate the *in vivo* and *in vitro* radioactivity deposited in the URT and LRT. All calculations considered the background radiation, the radioactive decay of the ^{99m}Tc (radioactive period of 6 h) and previously calculated tissue attenuation coefficient. The lungs were delimited manually using the perfusion scintigraphy ROIs, describe above for the lung attenuation coefficient with LyoMAA. Results are expressed in terms of total aerosol mass deposited (URT + LRT) in the airways based on the nebulizer load counted by a gamma camera and relationship between liquid and mass (density = 1). Results are also expressed in terms of the distribution of deposition between the URT and LRT using a normalization calculation.

Statistical Analysis

Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD). GraphPad® software (GraphPad® Prism 9 version 9.2.0, San-Diego California, USA) was used for graphical results. Statistical analyses were performed using StatXact® software (StatXact-3 3.0.2, Cytel Software Corporation, France). Non-parametric stratified permutation tests were used to compare the *in vitro* and *in vivo* aerosol deposition in terms of the total aerosol mass deposited (URT + LRT) and the distribution of deposition between the URT and LRT. P-values (p) ≤ 0.05 were considered statistically significant and $p > 0.1$ were not.

Results

Aerosol Particle Size Distribution

The jet nebulizers used in this study produced different poly-disperse aerosols.

The results for the particles characterized by their MMAD and their % distribution (particle fraction) are summarized in Table I.

The MMAD obtained ranged from 13.1 μm for the NL20® prototype nebulizer to 3.2 μm for the Sidestream® and 0.93 μm for the Microcirrus® nebulizers.

The NL20® prototype nebulizer produced the largest aerosols (13.1 \pm 9.7 μm) among the three nebulizers tested. The percentage of the fine particle fraction was: 21.6 \pm 3.9% for particles < 5 μm and 2.4 \pm 1.4% for particle < 1 μm for this device.

The Microcirrus® nebulizer produced the smallest aerosol particles among the three nebulizers tested. Indeed, 76.3 \pm 7.0% of the particles generated were < 5 μm and 53.9 \pm 8.2% were < 1 μm .

The percentage of particles < 0.5 μm was 19.5% for the Mircocirrus®, 6.6% for the Sidestream® and 1.9% for the NL20®.

Among the three nebulizers, the NL20® prototype produced the smallest (21.6%) percentage of particles < 5 μm , whereas, the Sidestream® and Microcirrus® produced 69.5 and 76.3% respectively.

This suggests that the NL20® nebulizer generated aerosols in a size range > 5 μm , likely to be deposited predominantly in the URT.

In Vitro 3D Printed Cast Model Validation

We compared the CT scans and anatomical measurements of the *in vivo* and *in vitro* models to evaluate whether the *in vitro* 3D cast model was anatomically and accurately printed up to the third bronchial divisions. The height of the frontal sinuses for the *in vivo* and *in vitro* models were **17.8 (a)** and **17.6 (a')** mm respectively (Fig. 2B & B'). The diagonal distances of the frontal sinuses *in vivo*

Table I Characteristics of the Three Jet Nebulizers: MMAD (Mass Median Aerodynamic Diameter)

Jet nebulizer (Q = 8 L / minute)	MMAD (μm): NGI / DLPI (Microcirrus®) and gamma camera	Particle fraction < 5 μm (FP)	Particle fraction < 2.5 μm	Particle fraction < 1 μm	Particle fraction < 0.5 μm
NL20®Prototype	13.1 \pm 9.70	21.6 \pm 3.9%	10.1 \pm 3.3%	2.4 \pm 1.4%	1.9 \pm 1.0%
Sidestream®	3.2 \pm 1.05	69.5 \pm 12.1%	38.6 \pm 2.7%	10.1 \pm 2.0%	6.6 \pm 1.3%
Microcirrus®	0.93 \pm 0.19	76.3 \pm 7.0%	75.5 \pm 5.7%	53.9 \pm 8.2%	19.5 \pm 10.4%

and *in vitro* were **48.8 (b)** and **48.4 (b')** mm respectively. The measured distances from the left to right sinuses were **37.5 mm** for both models (Fig. 2C & C'). Finally, the tracheal lumen diameters were **8.8 (d)** and **9.0 mm (d')** respectively, (Fig. 2D & D').

The distances and diameters measured in the scans of both models' (*vivo* and *vitro*) were similar. The CT scan measurements confirm the high preservations of the anatomy.

The printed *in vitro* model accurately reproduces the *in vivo* model in terms of anatomy.

Comparison of *In vivo* and *In vitro* Deposition

Data of qualitative scintigraphy images showed three deposition patterns of aerosols depending on the three different sizes of the aerosols generated and tested (Fig. 3). Images show two spots in the URT *in vivo* results likely corresponding to hair in the animals' jowls. This was not the case of the *in vitro* model, as it lacks fur. The LRT deposition of the *in*

vitro 3D cast model showed three spots, corresponding to the three of the six filters of the bronchial divisions.

In vivo and *in vitro* deposition data obtained for the three size ranges studied are presented in Fig. 4. The total aerosol deposition in the URT and LRT, showed no statistically significant, ($p=0.4$) differences (ns) between *in vitro* and *in vivo* total airway deposition. These data show that, the macaque *in vitro* 3D cast model is predictive of global aerosol airway deposition in defined conditions of aerosolization. The difference in total deposition (expressed as the quantity (g) of the aerosol) between the types of nebulizers can be explained by the difference of nebulizer output.

There was a statistically significant difference ($p<0.0001^*$) between the *in vivo* and *in vitro* models in terms of the distribution of deposition (URT/LRT).

Globally, fewer particles were deposited in the LRT *versus* the URT for the three particle sizes *in vitro* and *in vivo* (Fig 5).

LRT (grey colour) deposition was consistently higher in the *in vitro* 3D-cast model than in the *in vivo* model for all the three sizes tested:

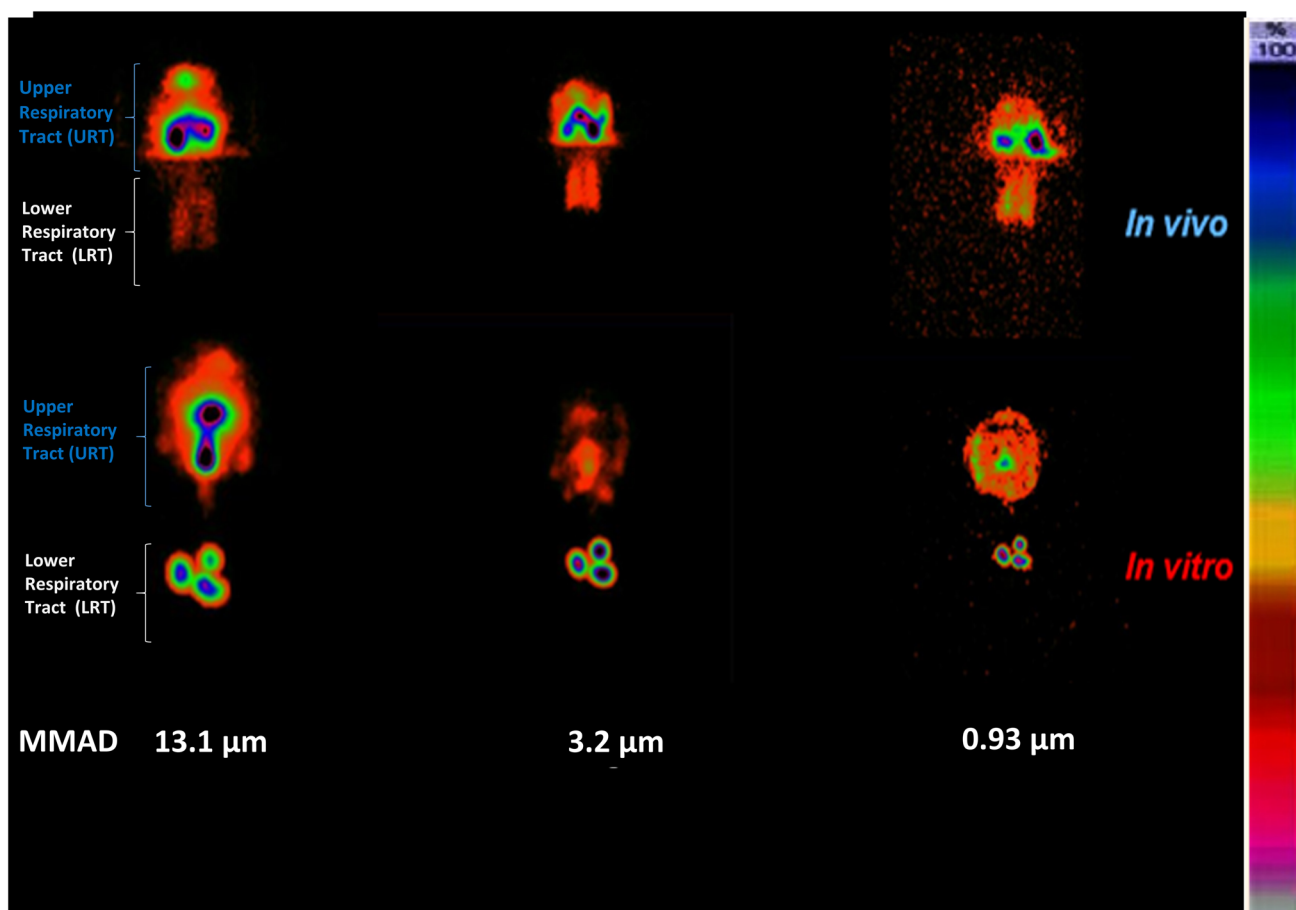


Fig. 3 *In vivo* (top images) and *in vitro* (bottom images) comparative scintigraphy images of the URT and LRT of aerosol deposition experiments. Images were recorded after 10 min ^{99m}Tc -DTPA aerosols inhalation of particles of large to small MMAD with the three jet nebulizers. All images are from the same macaque and same *in vitro* 3D cast model of aerosolization. The blue and red colours indicate a high concentration of radioactivity, whereas orange color represents a low concentration of radioactivity.

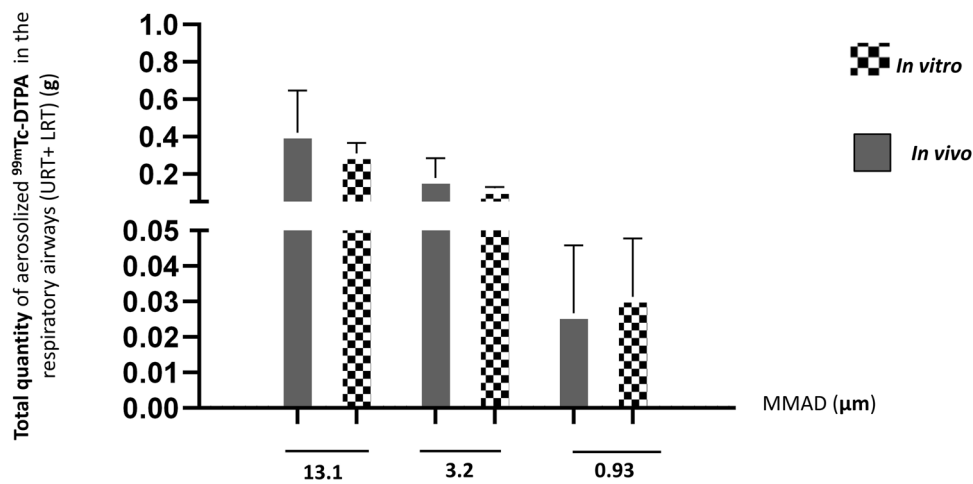


Fig. 4 Comparative results of the total amount (URT+LRT) of aerosol mass (mean ± SD) deposited in the respiratory airways depending on aerosol size (13.1, 3.2, 0.93 μm) for the *in vitro* 3D- cast model (tiled columns) and macaque model (grey column).

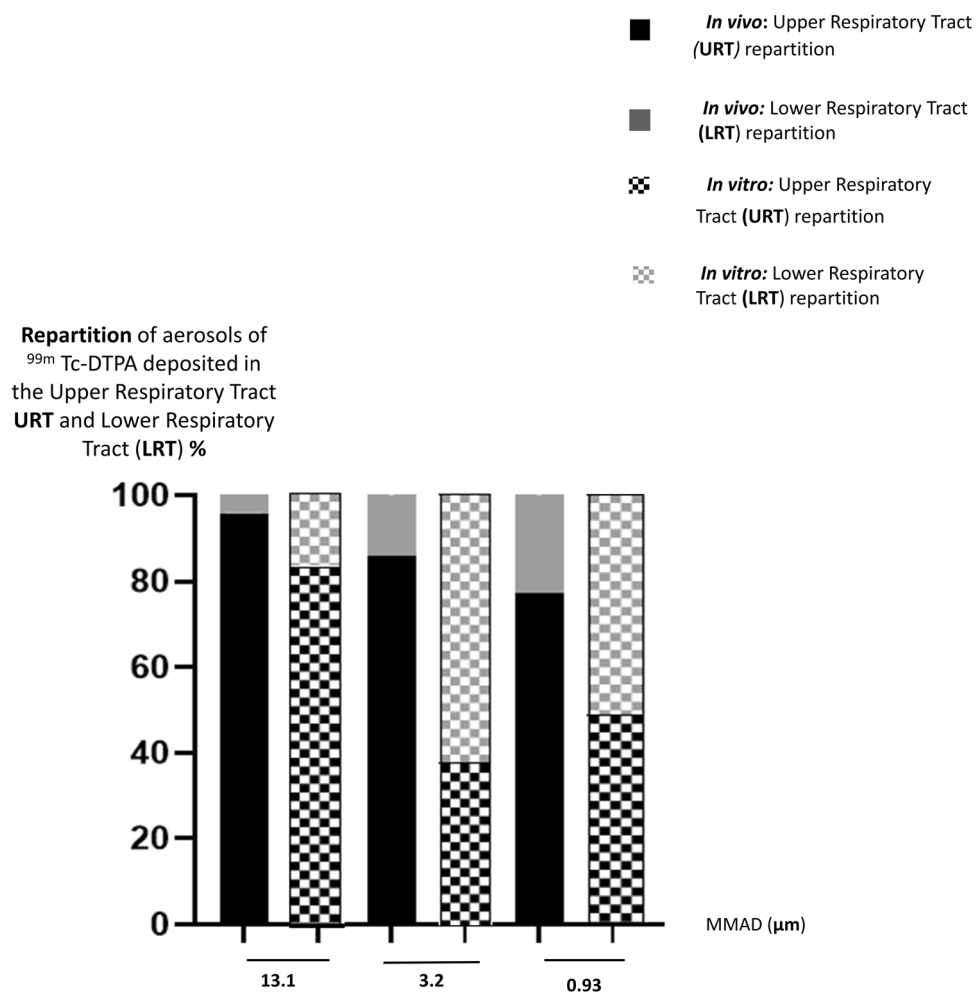


Fig. 5 Distribution of deposition in the URT versus the LRT (mean), for aerosols from 0.93 to 13.1 μm.

$17.0 \pm 1.8\%$ (*in vitro*) vs $4.5 \pm 1.2\%$ (*in vivo*) for $13.1 \mu\text{m}$; $62 \pm 6.5\%$ (*in vitro*) vs $14.0 \pm 6.9\%$ (*in vivo*) for $3.2 \mu\text{m}$, and; $51.0 \pm 26.2\%$ (*in vitro*) vs $22.6 \pm 8.1\%$ (*in vivo*) for $0.93 \mu\text{m}$.

Overall, the *in vitro* 3D cast model overestimates LRT deposition relative to the *in vivo* macaque.

Discussion

No other study has compared aerosol deposition between a macaque *in vitro* 3D-cast model and living macaques [26, 27].

Our *in-vivo* $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA aerosol deposition data, can be compared to the *in vivo* data of Albuquerque-Silva *et al.* [25] measured by scintigraphy imaging in three healthy living baboons. They quantified the deposition in what they called extra-thoracic (ET) and thoracic (TH) regions of interest (ROIs), which are similar to what we defined as our URT and LRT ROIs. Interestingly, their largest particles ($2.8 \mu\text{m}$) and our intermediate sized particles ($3.2 \mu\text{m}$) showed similar deposition values for the URT deposition in baboons and macaques: $72 \pm 17\%$ vs. $86 \pm 7\%$, respectively.

Among tested nebulizers, only jet nebulizers have provided clear-cut values for small-, intermediate-, and large-sized particles, whereas the mesh nebulizers tested were not able to generate droplet sizes with an MMAD $< 1 \mu\text{m}$. In a comparative clinical study, Vecellio *et al.* [22] determined the percentage of URT deposition of $5.6\text{-}\mu\text{m}$ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ aerosols, in terms of volume mean diameter (VMD), using a nasal jet nebulizer in seven healthy human male volunteers by gamma camera imaging. Their values of $73 \pm 10\%$ obtained in human beings are close to ours ($86.0 \pm 6.9\%$) obtained in macaques for a comparable particle size [22, 28].

In terms of *in vitro* cast models, our results share several similarities with those of two similar studies of aerosol deposition using 3D cast models of NHP. Kelly *et al.* [26] compared nasal airway deposition inside an acrylic transparent mould nasal cast replica of a male monkey cadaver and human *in-vitro* mould nasal airway replicas manufactured by stereolithography. Kesavan *et al.* [27] conducted an *in vitro* study of aerosol deposition using 3D cast models from living macaque (four females and one male) CT scans and compared it to that in humans. To simulate natural mucus, they coated their cast with Mazola corn oil®.

These authors showed that aerosol deposition is not influenced by the gender of the monkeys but rather by the physical parameters that characterize the behaviour of aerosols (Stokes and Reynolds number). Of note, using a NHP cadaver to develop a cast model was shown to introduce geometric differences relative to humans [24]. Thus, it is likely more appropriate to use living NHPs to produce a macaque *in vitro* cast model.

Another important element is the printing technique. We used the same stereolithography printing technique

based on CT scans of a healthy macaque as Kesavan *et al.* [26]. However, we printed a realistic trachea and bronchial tree, whereas they used "plastic tubing" to mimic the LRT. In addition, they modified the original macaque printed 3D-cast model by closing the mouth. In doing so, they did not accurately reproduce the physiological characteristics of macaque nose and mouth-breathing [12].

Of note, our *in vitro* and *in vivo* deposition data show that the macaque *in vitro* cast is predictive of total aerosol deposition. However, it underestimates URT deposition and consequently overestimates that in the LRT.

One possible explanation for the URT underestimation is that, despite macaques being nose and mouth breathers [29, 30], it is not possible to exclude that they breathed more by the nose during the aerosolization process. On the contrary, the 3D-cast model imposes simultaneous nose and mouth "breathing". In addition, the fact that the nose, contrary to the mouth, is an anatomical filtration zone could explain the higher URT deposition in the *in vivo* model than the *in vitro* model. Another possibility is that although we showed anatomical similarities between the *in vitro* and *in vivo* models, the actual *in vitro* 3D cast models do not accurately depict the exact texture of all the internal structures that exist *in vivo* [10]. Thus, it cannot be excluded that the synthetic material used to print the *in vitro* models could have influenced the deposition in the upper cavities, possibly explaining the differences between *in vivo* and *in vitro* aerosol deposition. Another explanation could be that we applied the same method for the URT attenuation coefficients, whereas the 3D cast is made of plastic and the airways of the macaque are composed of physiological tissues. In addition, because gamma camera imaging is unable to precisely distinguish anatomical structures, what is called the URT is, in fact, the entire face of the animals, with aerosols that penetrate to the URT. Indeed, the aerosol droplets can stick to the fur of the animal in the *in vivo* model, whereas fur was not an issue in the *in vitro* model. Overall, these factors could explain why the quantified URT deposition was underestimated by the *in vitro* model relative to the *in vivo* model.

The *in vivo* LRT aerosol deposition was consistently less than *in vitro*. This may be related to the fact that only fine to ultra-fine particles target the LRT, particularly the lungs, and depend on various parameters, such as the animals' breathing parameters and the effects of the anaesthesia. A second possibility is that the 3D cast model was printed until the first bronchial division, which was then connected to artificial tubes and filters. This setup is obviously not entirely physiological. Consequently, as filters were used, it is likely that all of the aerosol crossing the filter was retained in the filter and not exhaled, as occurs in the real lung. In addition, the overestimation of aerosol deposition in the LRT airways *in vitro* could be explained by anatomical differences between the *in vitro* and *in vivo* models. In particular,

deep deposition (LRT) is expected to be higher for a 6.6 kg animal (*in vitro* model) than in the animals used (*in vivo* assays), which had a weight ranging from 3 to 4 kg. The flow velocities in the ducts were necessarily different for the same volume/minute setting between the different tracheal/bronchial diameters.

Finally, the observed differences could have been influenced by the lack of mucus and mucociliary clearance in the 3D cast. Indeed, the thickness of the mucus and mucociliary clearance condition the deposition and behaviour (rheology characteristics, such as surface tension and viscosity) of deposited particles [31], especially in the URT. Williams and Suman [32] also described that the lack of mucosal surface and ciliary clearance constitutes a limitation for nasal anatomical models. The moisture content and temperature in the airways could also modify the particle size, affecting the deposition along the airways [33]. However, despite a similar lack of mucus, moisture, and body temperature (37 °C) in the airways model, a human 3D cast model was shown to provide results comparable to those obtained with *in vivo* human CT scans [10]. Thus, the use of the stereolithography technique based on accurate healthy macaque CT scans appears to provide researchers with valuable and accurate *in vitro* models, as shown by MRI images [34] or cadavers [11, 18, 26, 35, 36].

Conclusion

The *in vitro* 3D cast model we developed from a macaque scan printed until the third bronchial divisions provides a good overall predictive model of the total amount of aerosols deposition inside the respiratory tracts for aerosols ranging from 0.93 to 13.1 µm in term of MMAD.

Despite the observed overestimation of URT deposition, this is a helpful tool for preliminary experiments prior to animal studies.

Further studies concerning nasal cast development should improve the relevance of this tool to predict aerosol deposition.

Although macaques are still necessary for aerosol studies, using such an *in vitro* model will help to reduce the number of macaques included in aerosol studies, in accordance with the requirements of the 3Rs rule.

Acknowledgements We thank all collaborators from the CEPR of the University of Tours for their expertise in aerosolization and their help in the animal experimentation.

Special thanks are addressed to Deborah Le PENNEC for her practical help concerning the development of the 3D cast model and the use of nebulizers and their characterization process.

We particularly acknowledge PST-A platform for its important support for the *in vivo* experimentation, from the regulatory aspects (Jerome MONTHARU) to the technical aspects of the macaque experimentation and housing conditions (Lucas GARANGER).

Concerning the macaque whole-body check-up CT scans before the beginning of the study, we thank Laurent GALINEAU and Sophie SERRIERE from the “Département d’Imagerie Préclinique, Plateforme Scientifique et Technique Analyse des Systèmes Biologiques”, and “UMR 1253, IBrain, Equipe Imagerie, Biomarqueurs et Thérapie”, University of Tours, Inserm, Tours, France.

We also thank Sandrine Le GUELLEC from DTF medical for providing the NL20[®] Prototype and her expertise.

We finally acknowledge Quentin PASCAL (DVM) from the CEA of Fontenay-aux-Roses for his clinical expertise in validating the 3D cast model.

Funding This project was funded by the French Agency Innovation Defence (Former General Direction of Army), DGA, for their NRBC program and by the CEA of Fontenay-aux-Roses.

Justina CREPPY thanks the same Institutions for her PhD Fellowship.

Data Availability The data associated with this work will be made available on request.

Declarations

Conflict of Interest Laurent Vecellio was employed by DTF Medical from 2001 to 2018 and by Nemera from 2018 to 2020.

References

1. Anderson S, Atkins P, Bäckman P, Cipolla D, Clark A, Daviskas E, *et al.* Inhaled Medicines: Past, Present, and Future. *Pharmacol Rev.* 2022;74(1):48–118.
2. Ferré A, Dres M, Roche N, Antignac M, Becquemin M-H, Trosini V, *et al.* Les dispositifs d’inhalation: propriétés, modélisation, réglementation et utilisation en pratique courante. *Aérosol-storming du GAT*, Paris 2011. *Revue des maladies respiratoires.* 2012;29(2):191–204.
3. Laube BL, Janssens HM, de Jongh FH, Devadason SG, Dhand R, Diot P, *et al.* What the pulmonary specialist should know about the new inhalation therapies. *Eur Respiratory Soc*; 2011.
4. Asthma Gf. The global initiative for Asthma: GINA report, global strategy for asthma management and prevention. 2012.
5. Brocklebank D, Ram F, Wright J, Barry P, Cates C, Davies L, *et al.* Comparison of the effectiveness of inhaler devices in asthma and chronic obstructive airways disease: a systematic review of the literature. *Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE): Quality-assessed Reviews [Internet]*. 2001.
6. Pauwels RA. GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Resp Crit Care Med.* 2001;163:1256–76.
7. van Velzen A, Uges J, Le Brun P, Shahbabai P, Touw D, Heijerman H. The influence of breathing mode on tobramycin serum levels using the I-neb AAD system in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2015;14(6):748–54.
8. Heijerman H, Westerman E, Conway S, Touw D, group GDftcw. Inhaled medication and inhalation devices for lung disease in patients with cystic fibrosis: a European consensus. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2009;8(5):295–315.
9. Food U, Administration D. Draft guidance for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for nasal aerosols and nasal sprays for local action. *Fed Regist.* 2003;137.

10. 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.
11. Janssens HM, de Jongste JC, Fokkens WJ, Robben SG, Wouters K, Tiddens HA. The Sophia Anatomical Infant Nose-Throat (Saint) model: a valuable tool to study aerosol deposition in infants. *J Aerosol Med.* 2001;14(4):433–41.
12. DeSesso J. The relevance to humans of animal models for inhalation studies of cancer in the nose and upper airways. *Quality assurance (San Diego, Calif.)*. 1993;2(3):213–31.
13. Lemaitre J, Naninck T, Delache B, Creppy J, Huber P, Holzapfel M, *et al.* Non-human primate models of human respiratory infections. *Mol Immunol.* 2021;135:147–64.
14. Aebersold P. FDA experience with medical countermeasures under the animal rule. *Advances in preventive medicine.* 2012;2012.
15. Guillon A, Sécher T, Dailey L, Vecellio L, De Monte M, Si-Tahar M, *et al.* Insights on animal models to investigate inhalation therapy: relevance for biotherapeutics. *Int J Pharm.* 2018;536(1):116–26.
16. Fröhlich E. Replacement strategies for animal studies in inhalation testing. *Sci.* 2021;3(4):45.
17. Chen JZ, Finlay WH, Martin A. In vitro regional deposition of nasal sprays in an idealized nasal inlet: Comparison with in vivo gamma scintigraphy. *Pharmaceutical Research.* 2022:1–8.
18. Le Guellec S, Ehrmann S, Vecellio L. In vitro– in vivo correlation of intranasal drug deposition. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;170:340–52.
19. Zhou Y, Xi J, Simpson J, Irshad H, Cheng Y-S. Aerosol deposition in a nasopharyngolaryngeal replica of a 5-year-old child. *Aerosol Sci Technol.* 2013;47(3):275–82.
20. 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.* 2020;17(4):463–78.
21. Durand M, Pourchez J, Louis B, Pouget J-F, Isabey D, Coste A, *et al.* Platinated nasal model: a new concept of anatomically realistic cast. *Rhinology.* 2011;49(1):30–6.
22. Vecellio L, De Gerssem R, Le Guellec S, Reychler G, Pitance L, Le Pennec D, *et al.* Deposition of aerosols delivered by nasal route with jet and mesh nebulizers. *Int J Pharm.* 2011;407(1–2):87–94.
23. Fauroux B, Bonfils P, Dautzenberg B, Diot P, Faurisson F. Bonnes pratiques de l'aérosolthérapie par nébulisation. Propositions des Assises nationales de la nébulisation. Paris, 4–5 avril 1997 (version du 15 septembre 1997). *Archives de pédiatrie.* 1998;5(2):175–80.
24. Vecellio L. Système de nébulisation: savoir lire la nouvelle norme. *Info Respiration.* 2005;60:16–7.
25. Albuquerque-Silva I, Vecellio L, Durand M, Avet J, Le Pennec D, De Monte M, *et al.* Particle deposition in a child respiratory tract model: in vivo regional deposition of fine and ultrafine aerosols in baboons. *PLoS ONE.* 2014;9(4): e95456.
26. Kelly JT, Asgharian B, Wong BA. Inertial particle deposition in a monkey nasal mold compared with that in human nasal replicas. *Inhalation Toxicol.* 2005;17(14):823–30.
27. Kesavan JS, Alstadt VJ, Laube BL. Aerosol deposition in 3D models of the upper airways and trachea of rhesus macaques. *Aerosol Sci Technol.* 2020;54(8):983–91.
28. 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.* 2014;462(1–2):135–41.
29. Tian L, Dong J, Shang Y, Tu J. Detailed comparison of anatomy and airflow dynamics in human and cynomolgus monkey nasal cavity. *Comput Biol Med.* 2022;141: 105150.
30. Harvold EP, Tomer BS, Vargervik K, Chierici G. Primate experiments on oral respiration. *Am J Orthod.* 1981;79(4):359–72.
31. Kublik H, Vidgren M. Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;29(1–2):157–77.
32. Williams G, Suman JD. In vitro anatomical models for nasal drug delivery. *Pharmaceutics.* 2022;14(7):1353.
33. Majoral C, Coates AL, Le Pape A, Vecellio L. Humidified and heated cascade impactor for aerosol sizing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2020;8: 589782.
34. Golshahi L, Noga ML, Thompson RB, Finlay WH. In vitro deposition measurement of inhaled micrometer-sized particles in extrathoracic airways of children and adolescents during nose breathing. *J Aerosol Sci.* 2011;42(7):474–88.
35. Gao P, Liu A, Zuo F, Kong J, Li X. 3D Printing technology-assisted endoscopy surgery in the treatment of skull base tumors: A retrospective study. 2020.
36. Zwart G, Guilmette R. Effect of flow rate on particle deposition in a replica of a human nasal airway. *Inhalation Toxicol.* 2001;13(2):109–27.

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

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Cet article de revue nous montre que le modèle physiologique *in vitro* 3D Cast développé reste un modèle intéressant et innovant pour les expérimentations préliminaires dans le cadre d'études du dépôt d'aérosols chez le macaque. Il nous a permis de réaliser des essais de prototypes de nébuliseurs avant de passer *in vivo* chez le macaque. Ce modèle physiologique *in vitro* 3D Cast reste perfectible, notamment par l'ajout d'éléments tels que poils et mucus qui le rendraient plus proche de la réalité *in vivo*.

Chapitre III: Mise au point de systèmes de génération d'aérosols liquides pour administration chez le Primate Non Humain

III.1 Objectif principal

L'objectif de ce chapitre est de présenter le résultat de l'étude réalisée sur le développement de deux prototypes d'aérosolisation (précliniques chez le macaque) de pathogènes, de toxines et/ou de molécules thérapeutiques (objectif dual), pouvant également être utilisés chez l'humain en ce qui concerne les molécules thérapeutiques. De tels outils ont pour objectif de permettre l'administration précise et reproductible d'aérosols chez les macaques et chez l'Homme.

En effet, l'utilisation de systèmes permettant à la fois l'administration d'aérosols chez l'animal et l'humain pourrait permettre d'accélérer la mise au point de solutions thérapeutiques par voie inhalée en s'affranchissant du coût et du temps de développement galénique nécessaires pour obtenir le dispositif d'inhalation humain. De plus, l'utilisation d'un même système d'inhalation adapté à des aérosols infectieux, toxiques, mais compatibles également à leurs antidotes constituerait une avancée majeure dans le but d'étudier l'effet du thérapeutique au même site de dépôt au sein des voies respiratoires que le toxique ou l'agent infectieux.

Deux brevets ont été déposés (Annexes 4 et 5) concernant un système de nébulisation et le prototype T.

III.2 Le système de référence Chad Box[®] pour l'administration d'aérosol de pathogènes chez le PNH

Pour administrer les aérosols dans les voies aériennes du primate non humain, il existe différentes techniques d'administration.

Les différents types d'outils et de méthodes existantes pour l'administration des aérosols chez le PNH ont été détaillés dans la revue de la littérature (Cf. chapitre 1).

Parce que le système d'administration d'aérosols de type Head-only, la « Chad Box[®] », est considéré comme le modèle de référence d'administration d'agents biologiques chez le PNH (Cf. revue de la littérature, chapitre 1), nous allons le décrire de manière plus détaillée. Ce système « Chad box », est du nom du co-inventeur le Dr. Chad Roy. Le système reproduit une exposition ambiante atmosphérique à un aérosol toxique.

Ce système intègre au sein de la même enceinte l'outil de délivrance des aérosols (un nébuliseur pneumatique) et l'interface d'administration des aérosols (système d'exposition tête entière). La tête est placée dans un réceptacle adaptable au sein de

l'enceinte d'administration, enceinte étanche et en dépression de confinement classe 3 (Class-3 Biological Safety Cabinet), présentée dans la figure 53.

L'Automated Bioaerosol Software (**ABES** sur la figure 53) permet de régler le débit, la pression, la température et l'humidité au sein de cette enceinte. L'animal est exposé à un aérosol produit à concentration constante au cours du temps. Le contrôle de la quantité d'aérosol déposée est réalisé de manière indirecte par l'intermédiaire d'un calcul prenant en compte la durée de l'exposition, le volume inhalé en une minute par l'animal (volume minute) et la concentration de l'aérosol dans l'air [345]. L'administration non invasive de l'aérosol et le calcul automatique de la dose inhalée (D_{inh}) d'un agent infectieux, constituent autant d'avantages de ce système. Le détail de la dose inhalée est décrit en Annexe 1.

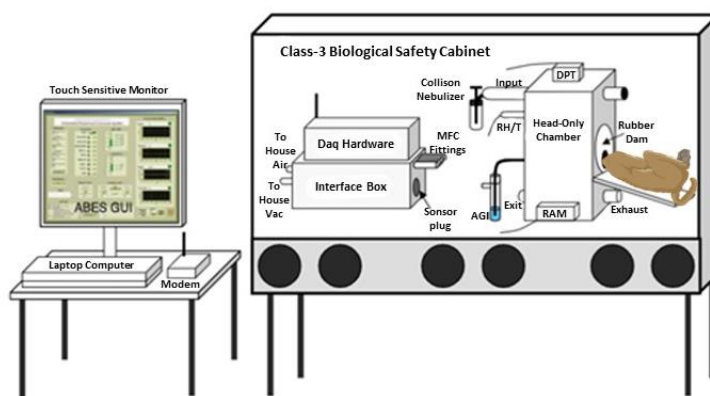


Figure 53 : Système Chad Box[®], d'exposition automatisée aux aérosols pour des Primate Non Humains, modifié d'après Hartings et Roy., 2004 (Hartings and Roy 2004).

Au sein de ce système, l'aérosol produit est liquide et est généré à l'aide d'un nébuliseur pneumatique de référence, fonctionnant avec de l'air. Il s'agit des nébuliseurs de type Collision Nebulizer [345,346] ou BANG (Bio Aerosol Nebulizer Generator). Ils sont couramment utilisés dans les études d'inhalation d'aérosols infectieux. Ils génèrent des particules d'aérosols de l'ordre de 1 à 3 μm décrites comme étant relativement monodispersées, résultant en un dépôt essentiellement pulmonaire [347]. En effet, des études confirment que le diamètre des particules de 1 μm est la taille optimale pour cibler les voies respiratoires inférieures des PNH [216,218]. La métrologie des aérosols se déroule durant l'aérosolisation grâce à un compteur optique à particules. La Chad Box[®] comprend aussi un biocollecteur qui permet de récolter les échantillons d'aérosols nébulisés afin de caractériser à l'aide d'un Impinger (AGI sur la figure 53) la viabilité post-nébulisation. Un système de filtre à gélatine peut également être utilisé en alternative à l'Impinger [348].

Toutefois, ce système complet possède un **faible rendement de nébulisation**, estimé à environ 0.0001 % dans les poumons par rapport à la charge introduite dans le système, ce qui nécessite d'augmenter les quantités de toxiques manipulés.

De plus, le débit d'aérosol produit par la Chad Box® nécessite des **durées d'exposition pouvant être longues** (plusieurs dizaines de minutes) et contraignantes pour l'animal anesthésié. L'utilisation quotidienne se voit donc limitée et pose le problème de décontamination sans endommager le dispositif.

Par ailleurs, ce système en plus d'être très **onéreux** (> 100 000 euros) n'est pas totalement satisfaisant dans le cadre d'études du dépôt des aérosols dans les voies respiratoires. Car, une partie de l'aérosol est déposée sur les parties extérieures de l'animal. Ceci conduit à un risque d'hygiène et de sécurité lors de la manipulation de l'animal après son exposition ainsi qu'une possible diffusion de l'aérosol au travers du pelage de l'animal (pénétration par voie ophtalmique et transcutanée) ne permettant pas l'étude exclusive de l'aérosol dans les voies respiratoires.

De plus, la Chad Box® ne permet pas une utilisation chez l'humain pour l'administration de solutions thérapeutiques inhalées. Enfin, l'outil s'utilise uniquement chez un animal en position allongée.

En dépit de ces limites, ce système est disponible depuis peu de temps dans les laboratoires A3 du CEA pour administrer des aérosols toxiques chez le PNH et développer des modèles précliniques de PNH par aérosolisation selon ce système de référence. Les premiers essais de mise au point et de réglages du système Chad Box® (CH Technologies, Westwood, NJ) ont été réalisés au CEA avec des aérosols de fluorescéine (solution à 1g/L) dans le modèle *in vitro* 3D Cast (Cf. partie III.4.1.1).

III.2.1.1 Aérosols de fluorescéine administrés avec la Chad Box ®

Le système de génération d'aérosol était réglé à 6,5 L/min air (1,5 L/min pour le nébuliseur, + 4 L/min d'air humide, + 1 L/min air sec), 100 µL/min de fluorescéine administré dans le nébuliseur à l'aide d'un pousse-seringue qui permet de fournir une alimentation liquide externe pour les nébuliseurs du dispositif Chad Box®.

La seringue était remplie de 10 mL d'une solution de fluorescéine à 10 mg/mL. Le modèle anatomique était le même que celui utilisé précédemment dans la thèse et avait un volume minute de 810 mL. Ce modèle démontre une fois de plus son utilité pour la mise au point et la pré-caractérisation avant les essais *in vivo* chez l'animal.

Après la nébulisation de la solution de fluorescéine durant 80 min, l'aérosol déposé dans le modèle était dosé par spectrophotométrie UV-Visible. Une photo de l'installation du modèle 3D dans la Chad Box® est présentée dans la figure 54.

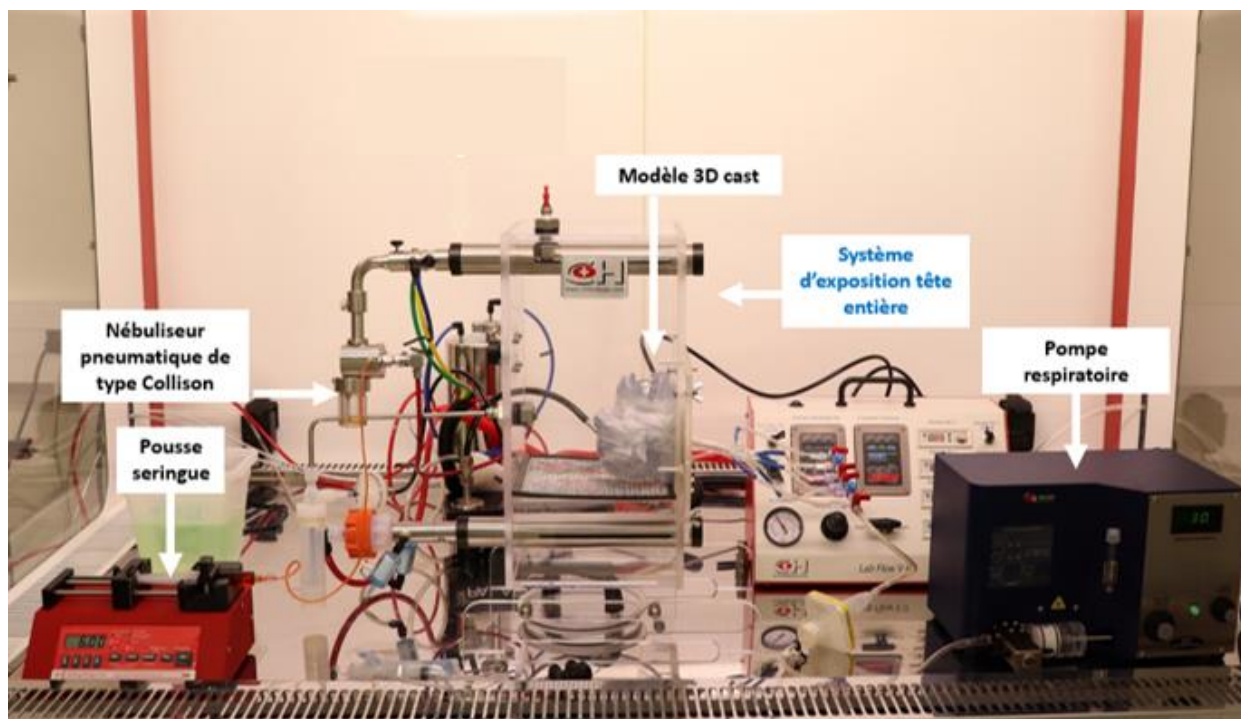


Figure 54 : Photo du modèle de macaque *in vitro* 3D Cast installé dans la Chad Box® au CEA-IDMIT pour la mise au point de l'outil d'aérosolisation. Fonctionnement en zone de confinement A3.

III.2.1.2 Résultats de dépôts d'aérosols de fluorescéine dans le modèle *in vitro* 3D Cast à l'aide de la Chad Box®

Les résultats sur le modèle 3D Cast doivent être interprétés avec les limites que contient ce modèle décrit dans le chapitre 2. Ils montrent (Cf. tableau 7) que le dépôt dans les voies aériennes supérieures n'était pas détectable. Le dépôt sur la face du modèle était 3 fois plus important que le dépôt dans les voies respiratoires inférieures. Le rendement du système était de 1.5×10^{-6} , nécessitant d'utiliser théoriquement 10^6 fois plus de pathogènes que nécessaire pour atteindre la dose respiratoire cible.

Ces résultats *in vitro* démontrent le ciblage spécifique des voies respiratoires inférieures (en accord avec les petites tailles d'aérosols de 0,9 à 2,5 μm générées par le nébuliseur pneumatique de type Collison®) mais un dépôt important sur la face, ainsi que la nécessité d'utiliser de fortes doses pour atteindre la zone respiratoire cible. Il serait intéressant de comparer par la suite les résultats *in vitro* avec les résultats *in vivo* obtenus dans les mêmes conditions expérimentales pour la nébulisation d'un agent pathogène.

Tableau 7 : Dépôt d'aérosol dans le modèle anatomique avec un aérosol de fluorescéine.

Rendement du système (dose respiratoire/ dose chargée dans le système)	Débit d'aérosol déposé dans les voies respiratoires ($\mu\text{L}/\text{min}$)	% dépôt voies aériennes inférieures	% dépôt voies aériennes supérieures	% dépôt face animal
1,5 x 10 ⁻⁶	0,015	24%	0%	76%

III.3 Développement de prototypes originaux de générateurs d'aérosols pour le PNH

Le processus de développement a été engagé en fonction d'un cahier des charges préalablement défini par le CEA- IDMIT (Fontenay-aux-Roses), le CEPR (Université de Tours), la DGA et l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées, IRBA (Brétigny-sur-Orge). Deux prototypes légèrement différents ont ainsi été obtenus.

Les prototypes ont été mis au point, ajustés et testés dans un premier temps sur le modèle *in vitro* de macaque 3D Cast préalablement décrit dans le chapitre 2. Les prototypes ont été ensuite évalués sur 3 macaques au CEPR, au moyen d'un système d'imagerie par gamma camera, puis au CEA-IDMIT au moyen d'un PET Scan.

Une des caractéristiques de ces générateurs prototypes, est de permettre *in fine* l'administration des aérosols toxiques et/ou leurs antidotes thérapeutiques à l'aide d'un même dispositif constitué entre autres d'un masque étanche applicable sur la bouche et le nez du macaque.

En ce qui concerne les aérosols toxiques, le fil conducteur de notre étude est l'aérosolisation de spores (forme de résistance de la bactérie à un moment de son cycle) liquides viables de *Bacillus anthracis* chez le macaque pour simuler une exposition environnementale à cet agent de la menace bioterroriste.

Dans le cadre de la thèse, il était prématuré d'utiliser au stade du développement de prototypes des spores de *Bacillus anthracis* pour des raisons de biosécurité des expérimentateurs et des macaques. C'est pour cette raison que nous avons utilisée en étape intermédiaire des simulants de spores.

Des essais d'aérosols ont été tout d'abord réalisés avec le Beclospin[®], un corticoïde inhalé, utilisé comme mime de spore bactérienne compte tenu de sa formulation sous forme de suspension.

Nous avons également utilisé un anticorps thérapeutique nébulisé et une spore de *Bacillus atropheus* non pathogène comme mime de *Bacillus anthracis*. Ces essais ont été réalisés dans le chapitre 4.

La mise au point préalable des prototypes était réalisée avec de la fluorescéine, car elle permettait une mesure rapide et visuelle de l'aérosol.

III.3.1 Cahier des charges

Le cahier des charges indiquant les spécifications, les ressources, les attentes et les besoins en termes de conception et de maniabilité lors du développement des outils d'administration d'aérosols chez le PNH a été établi conjointement avec les différents collaborateurs. Il est résumé dans le tableau 8 ci-dessous. Il consiste en la mise au point d'outils d'administration d'aérosols thérapeutiques, prophylactiques, pathogènes ou de toxine à des doses constantes et contrôlées dans le temps, dans les voies respiratoires du macaque.

Les dispositifs ou prototypes développés doivent être à usage unique et permettre d'administrer des aérosols liquides, de telle sorte que le MMAD des gouttelettes générées soit constant à $\pm 20\%$ au cours du temps d'exposition. Le débit auquel l'aérosol est généré doit être tel que la durée d'exposition maximale de l'animal n'excède pas 30 minutes.

Les aérosols ainsi générés doivent cibler l'ensemble des voies respiratoires du PNH (VAS et VAI). Nous n'avons pas de préconisation quant aux pourcentages respectifs des dépôts des aérosols à l'aide des prototypes développés : répartition VAS *versus* VAI. Néanmoins, il nous paraît indispensable d'avoir des aérosols majoritairement administrés dans les poumons. Une précision du dépôt global de $\pm 20\%$ de variabilité maximale, par rapport à la dose initiale, dans les voies respiratoires a été proposée.

Par ailleurs, ces dispositifs doivent être conçus avec des outils de fabrication Française de préférence, pour un coût maximal de 1000 euros. Les caractéristiques du cahier des charges sont résumées dans le tableau qui suit. Ils sont comparés avec la Chad Box® (le détail du cahier des charges est décrit en Annexe 2).

Tableau 8 : Récapitulatif du cahier des charges pour le développement de dispositifs de génération d'aérosols chez le macaque. Comparaison avec le système d'administration d'aérosols Chad Box®.

Cahier des charges	Détails		Chad Box®	Prototype développé
Technique	Nébuliseur	Transformation d'un liquide en aérosol - système pouvant être utilisé dans l'idéal pour la contre mesure associée	Oui	Nébuliseurs à tamis ou à jet d'air
	Masque	Masque étanche pour exposition nez bouche	Non	Masque spécifique oro-nasal
	Enregistrement des paramètres ventilatoires	Enregistrement du volume cumulé à 0,1mL près, et enregistrement de la fréquence respiratoire (pneumotachographe)	Oui	Pneumotachomètre connecté sur la branche inspiratoire
	Fonctionnement position couchée à minima	Animal placé sur le dos dans un PSM ou une enceinte spécifique	Oui	Prototypes qui fonctionnent quelle que soit la position couchée ou assise de l'animal.
Performances	Taille particulière des gouttelettes constante	MMAD constant \pm 20% au cours du temps d'exposition	Oui	Oui
	Stabilité de l'aérosol généré	Concentration constante \pm 20% de l'aérosol au cours du temps	Oui	Oui

	Nébulisation de pathogènes	Concentration constante en termes de cfu/m ³ /min ± 1 log	Oui : fonctionne uniquement pour des pathogènes	Oui : système d'administration dual : utile pour les aérosols thérapeutiques et/ou aérosols infectieux (ou simulant des toxiques)
	Quantité déposée dans les voies respiratoires	Précision à $\pm 20\%$	Pas d'information	Validation du système par imagerie
	Répartition ORL/poumons	Obtenir un dépôt pulmonaire avec le prototype développé	Pas d'information	Non précisé
	Débit	Débit tel que durée d'exposition de l'animal < 30min	Oui	Oui
	Quantification du dépôt des aérosols générés par les dispositifs	Imagerie post-aérosolisation	Non	Imagerie : Scintigraphie par gamma caméra et TEP/TDM
Sécurité	Dispositif < 1000 euros par exposition	Dispositif à usage unique incluant nébuliseur, zone de transport, interface	Non	Pneumatique ou à tamis, système en plastique à usage unique
	Biosécuritaire	Pas de contamination extérieure, tient compte du transport de l'animal, rendement maximum du nébuliseur	Oui	Masque étanche + filtre absolu + PSM ou enceinte

III.3.2 Description et fonctionnement des prototypes développés

III.3.2.1 Sélection et choix de l'interface d'administration des aérosols chez le macaque

Dans un contexte d'aérosolisation d'agents pathogènes ciblant les VAS et VAI (Cf. cahier des charges, Annexe 2) notamment pour des agents hautement toxiques, il est important de sélectionner un système d'administration étanche permettant une protection de l'expérimentateur, de l'environnement de travail et limitant l'exposition des aérosols dans les zones non ciblées (yeux, pelage, oreilles) de l'animal. C'est pourquoi, préalablement au choix du masque le plus adapté, un criblage et différents essais de masques oro-nasaux, de différentes tailles, formes, et présentant des principes d'étanchéité différents ont été réalisés en premier sur la face du modèle *in vitro* 3D Cast. Il s'agit de masques d'anesthésie ou de masques de nébuliseurs, à usage unique, commercialisés et utilisés en clinique. Un masque étanche en impression 3D a également été fabriqué.

Pour réaliser ce criblage des six masques présélectionnés, quatre (4) critères ont été établis pour la sélection du masque adéquat à partir du modèle *in vitro* et numérotés d'A à F dans la figure 55 :

- **Étanchéité du masque,**
- **Taille et largeur du masque,**
- **Capacité du masque à couvrir uniquement le nez et la bouche du macaque sans exposition des autres organes comme les yeux,**
- **Confort sur la face de l'animal.**



Figure 55 : Essais des masques oro-nasaux chez le macaque comme interface d'administration d'aérosols. Figure masquée pour des raisons d'éthique et de sensibilité.

Les masques ont été testés *in vivo* par la suite sur la face d'un macaque anesthésié suite à une sédation légère par voie intramusculaire (IM) : Kétamine 3 mg/kg (Imalgene® 1000) et Médétomidine chlorhydrate 40 µg/kg (Domitor® 1 mg/ml) puis réversion avec Atipamézole 200 µg/kg (Alzane® 5 mg/ml).

Après l'anesthésie, l'animal est rasé au niveau de la face (museau et moustache) afin d'assurer l'étanchéité maximale du masque sur la face glabre.

A l'issue des tests, le masque sélectionné par inspection visuelle pour répondre aux 4 critères précédents (masque de la photo D de la figure 55) est un masque à usage unique d'anesthésie pour adulte moyen 22 F Taille 4, (Intersurgical Ltd, Berkshire, UK). Il dispose de bourrelets et de crochets permettant d'attacher des élastiques de maintien du masque sur la face. Il a une coque transparente et souple (confort du masque) qui permet de visualiser l'aérosol présent dans le masque et de contrôler les signes cliniques respiratoires de l'animal durant l'aérosolisation.

Les pièces qui composent chaque prototype sont commercialisées et utilisées en clinique chez l'humain. Ainsi, en cas de résultats précliniques satisfaisants chez le PNH, le transfert en clinique chez l'Homme sera aisé. Les résultats jouiront aussi d'un haut niveau de confiance, dans le cas où une étude humaine d'administration d'aérosols n'est pas possible.

Le premier dispositif prototype dispose d'un système de **nébulisation pneumatique** (nébuliseur à jet d'air) et le deuxième une nébulisation à l'aide d'un **nébuliseur à tamis** ou à mailles.

Ce deuxième système, peut se décliner lui-même en deux systèmes différents, en fonction de la forme du dispositif : **prototype de nébulisation en forme de Y** (dispositif numéro 2) et **prototype de nébulisation en forme de T** (dispositif numéro 3).

Dans ce chapitre nous allons décrire en détail la conception et le mode de fonctionnement de chaque prototype d'administration d'aérosols développés : le prototype fonctionnant avec un nébuliseur pneumatique (prototype numéro 1) et le prototype intégrant dans son fonctionnement un nébuliseur à tamis décliné en prototype à tamis Y (prototype 2) et prototype à tamis T (prototype 3). Chaque prototype se compose de 3 éléments : un nébuliseur, une zone de transport et une interface d'administration étanche de type masque couvrant le nez et la bouche du macaque (Figure 56).

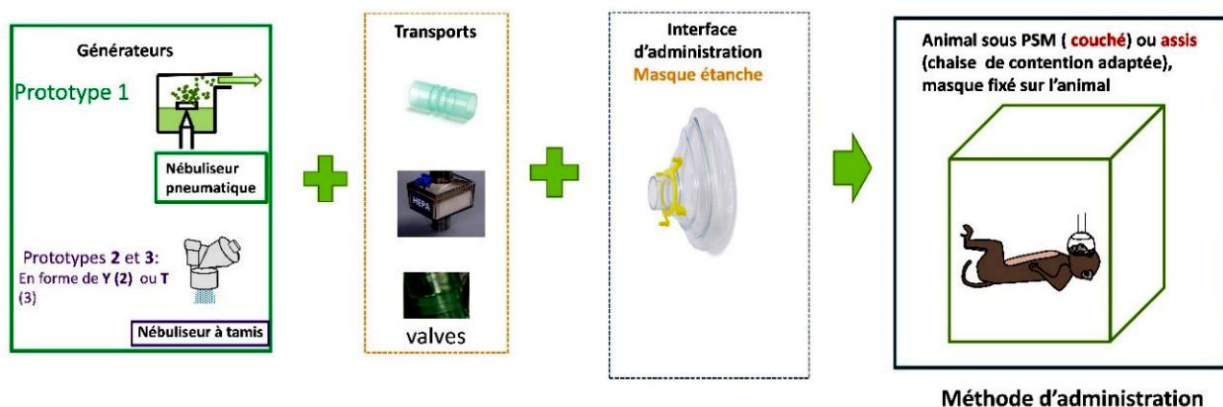


Figure 56 : Composition de systèmes de nébulisation sélectionnés pour l'administration d'aérosols infectieux ou thérapeutique chez le macaque.

III.3.2.2 Prototype pneumatique (prototype 1) :

- **Description du prototype 1**

Ce prototype est en photo dans la figure 57, et son descriptif dans la figure. En partant de la face de l'animal on trouve les éléments suivants :

- 1-** Le masque oro-nasal à crochets (1) (précédemment décrit dans la figure 55) est représenté en « 1 » sur la figure 57. Ce masque a été modifié et comprend deux ouvertures. Il contient une zone de transport « 4 » de l'aérosol contenant un orifice (« 3 » sur la figure 58) permettant de connecter un compteur optique (CEL-712 Microdust pro, Casella, UK) mesurant en temps réel la concentration des particules d'aérosols générées.
- 2-** Un nébuliseur pneumatique à jet d'air connecté au masque (« 1 » sur la figure 57).
- 3-** Un filtre à particules PALL®, (BB50T, PALL Corporation® Saint Germain-en-Laye France) est connecté au deuxième trou du masque pour retenir les aérosols exhalés (Cf. Figure 57 et le point « 2 » de la figure 58). Il permet une haute efficacité de filtration (efficacité de filtration > 99, 99%) [349] et de rétention des particules d'air exhalées pour éviter toute contamination de l'air ambiant (contamination environnementale).
- 4-** Un spiromètre ou (pneumotachomètre) pour macaque, (AD Instruments®, Australie), représenté sur la figure 57 (point « 5 »). Il mesure les paramètres respiratoires de l'animal. Ce dernier est connecté à une station d'analyse pour mesurer les volumes respiratoires. Elle est présentée en Annexe 3.

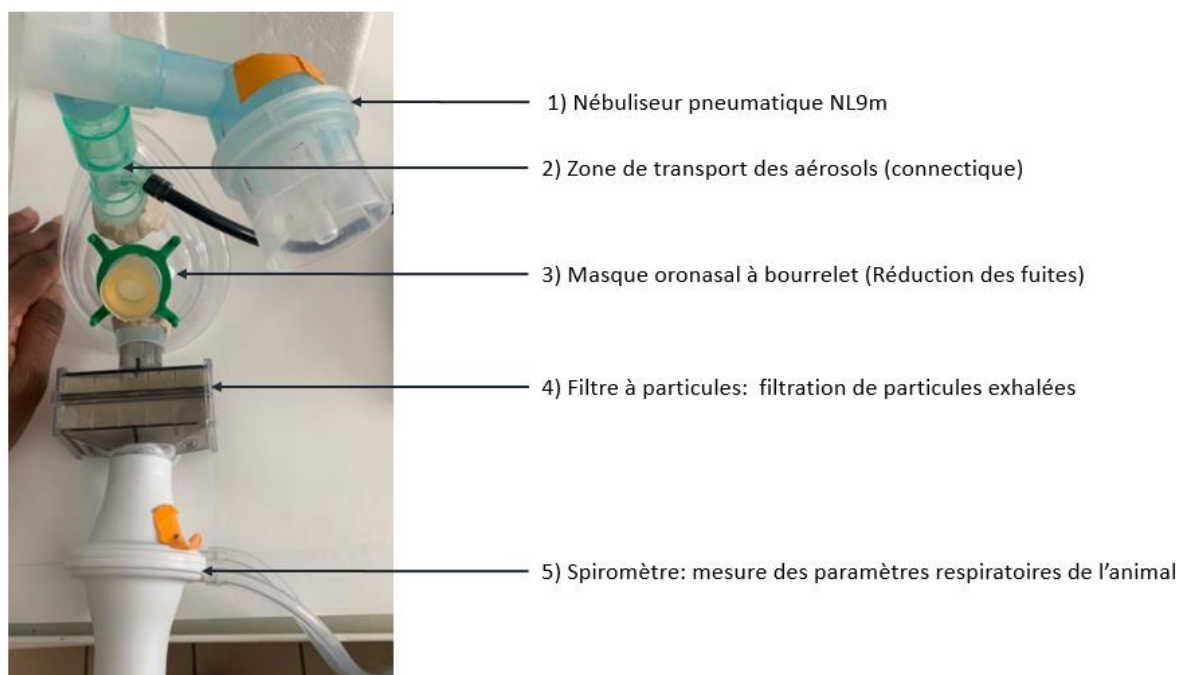
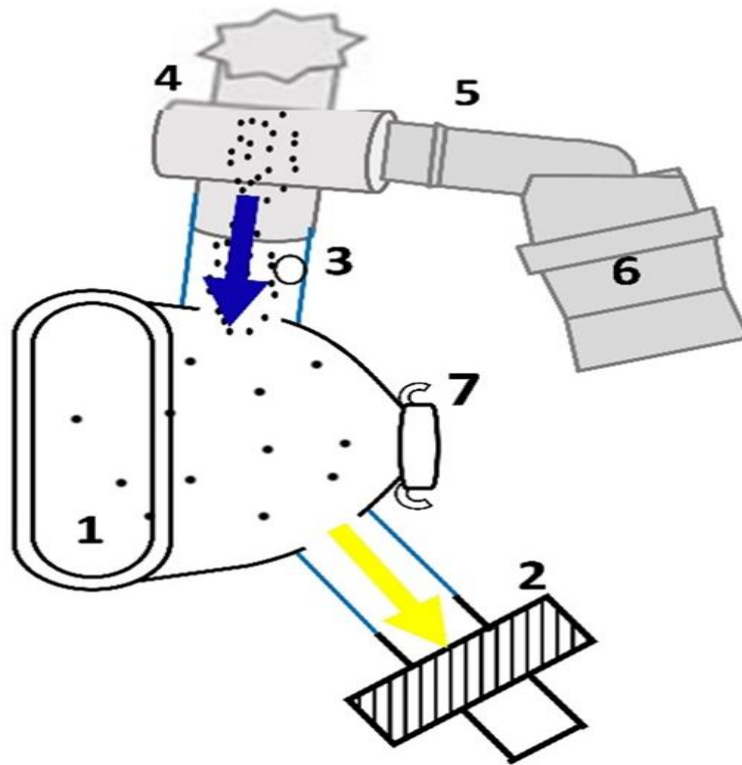


Figure 57 : Photo de l'agencement des outils du prototype fonctionnant avec le nébuliseur pneumatique (prototype 1).

La figure 58 décrit le fonctionnement du nébuliseur pneumatique NL9m[®] (La Diffusion Technique Française, DTF, Saint Etienne, France) (Cf. Point 6) qui est connecté et adapté au masque facial du prototype à travers un orifice dans le masque.

Ce nébuliseur a la spécificité de disposer d'une « rotule » (4) et d'un « coude » (5) permettant une rotation aisée du nébuliseur pour qu'il s'adapte au masque, et ce quelle que soit la position de l'animal durant l'aérosolisation (assis ou couché). Le sens du flux d'aérosol produit par le NL9m[®] est représenté sur la figure 58 par la flèche en bleue et la flèche jaune représente le sens du flux d'air des aérosols exhalés.



Légende

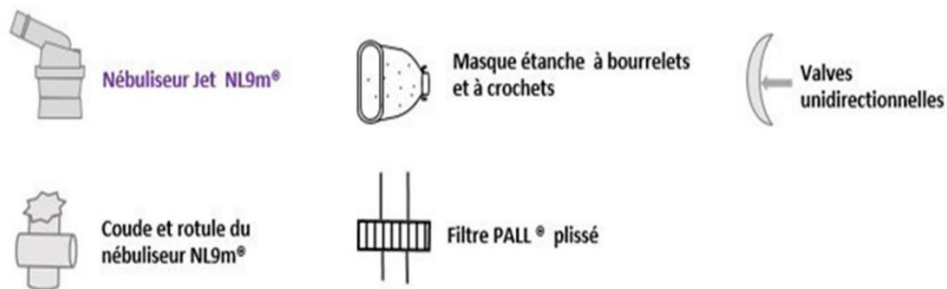
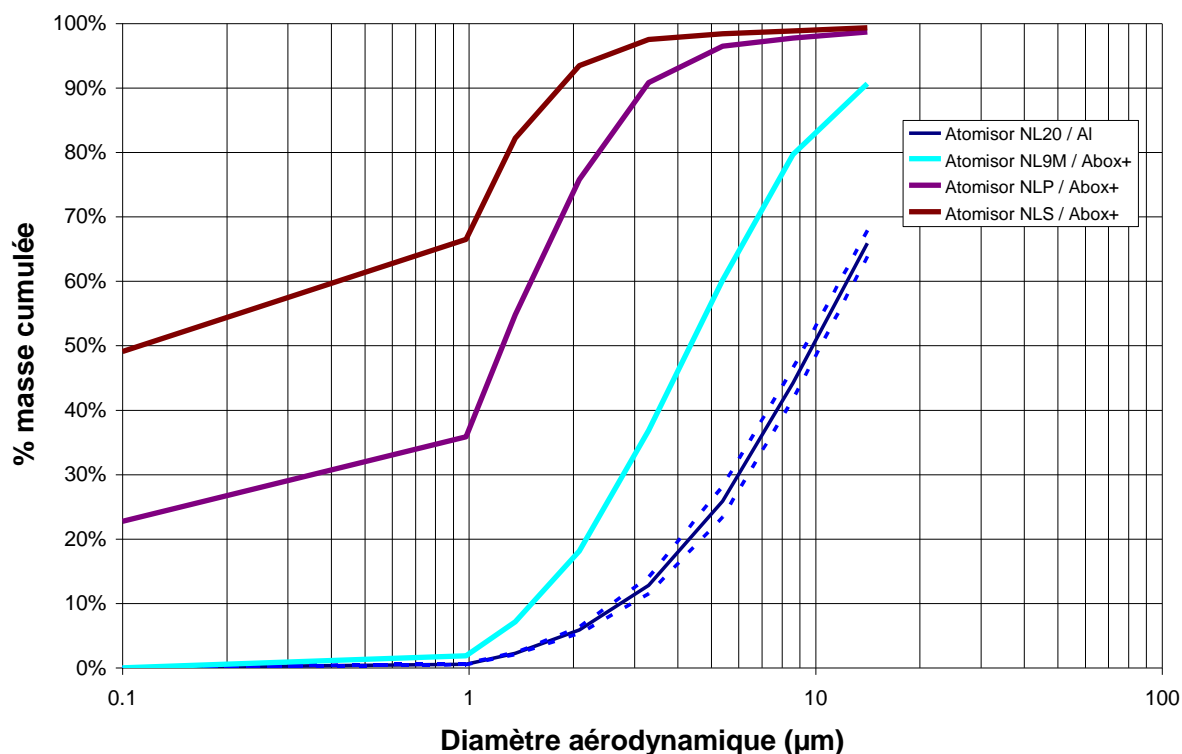


Figure 58 : Composition et fonctionnement des différentes parties du prototype 1.

Le masque du prototype pneumatique dispose également de crochets (7), qui permettent d'ajouter un élastique qui s'attache à l'arrière de la tête de l'animal. Le masque est percé d'un orifice supérieur sur lequel se connecte une rotule (4) et un coude amovible (5) permettant la rotation du nébuliseur NL9m[®] (6). Au niveau de l'orifice inférieur du masque, un filtre à particules est connecté à une tubulure (2). Le chiffre 3 correspond au compteur optique.

Le nébuliseur NL9m[®] de ce dispositif d'administration d'aérosols a la particularité d'être connecté à une source d'air humide permettant de produire un aérosol à concentration stable dans le temps sans évaporation du liquide dans le réservoir du nébuliseur. Ce type de nébuliseur dispose de différentes versions permettant de générer des fortes concentrations (0,1 à 1 g/m³), une large gamme de taille (Figure 59) de particules (50 nm à 10 µm), et pouvant nébuliser des liquides avec une large gamme de viscosité (jusqu'à 200 cP) et différentes formulations liquides (suspension et solution). Cet ajout d'air humide au nébuliseur a fait l'objet d'un dépôt de brevet en cours d'analyse, présenté en Annexe 4.



Nébuliseur	MMAD (µm)	Fraction de particules < 5 µm	Fraction de particules < 2 µm
Atomisor NL20 / AI	10.1 ± 0.6	23% ± 2%	5% ± 1%
Atomisor NL9M / Abox+	4.2 ± 0.2	56% ± 2%	17% ± 2%
Atomisor NLP / Abox+	1.4 ± 0.4	95% ± 2%	73% ± 4%
Atomisor NL2 / Abox+	0.2 ± 0.1	98% ± 1%	91% ± 3%

Figure 59 : Exemple de gamme de tailles de particules pouvant être produites avec les différentes versions du nébuliseur pneumatique de la Diffusion technique Française (Document de la Diffusion Technique Française, Saint Etienne, France).

L'intérêt du nébuliseur pneumatique est sa capacité à générer différentes tailles d'aérosols en changeant seulement la partie supérieure du nébuliseur et/ou les paramètres de la nébulisation.

- **Fonctionnement du prototype pneumatique (prototype 1)**

Ce prototype a été développé pour tenter de mimer une exposition à des aérosols à concentration constante au cours du temps. La nébulisation est arrêtée lorsque la dose cible a été théoriquement atteinte dans les voies aériennes du macaque. Dans le cas où la nébulisation excède 30 minutes, mais que la dose cible n'est pas atteinte dans les voies respiratoires, la nébulisation est automatiquement arrêtée pour éviter le réveil ou la prolongation de l'anesthésie chez l'animal. La notion de dose inhalée puis déposée dans les voies respiratoires pour les études d'inhalation des aérosols, nécessite un calcul décrit en Annexe 1 pour exemple.

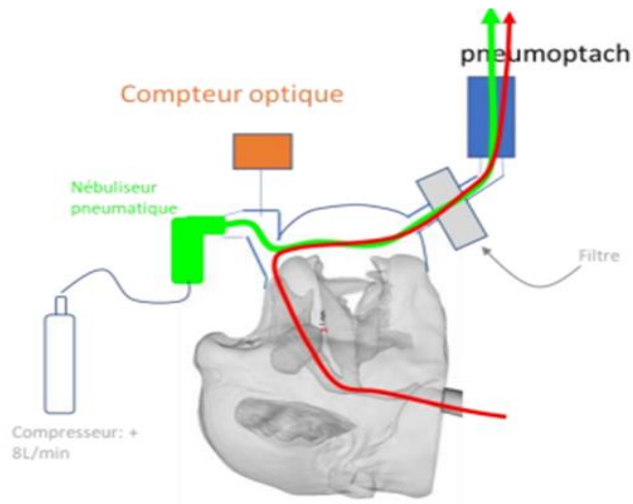
Il est à noter qu'une spore bactérienne dispersée étant assez stable, le but sera d'avoir une relation linéaire entre la durée d'exposition et la quantité déposée dans les voies aériennes respiratoires avec le prototype pneumatique.

La concentration en termes de CFU (Unité formant colonie) de l'aérosol produit est le paramètre principal pour calculer le cumul de dose dans les poumons du macaque. Le calcul de la dose à administrer dans les voies aériennes est en fonction de la Dose létale 50 (DL₅₀). Ainsi, chez le PNH cette DL₅₀ est comprise entre 10⁴ et 10⁵ [350] pour des spores de *B. anthracis*. Pour avoir une quantité (masse) administrée dans les voies aériennes supérieures à la DL₅₀, nous avons utilisé une quantité cible déposée dans les voies aériennes de 10⁷ spores. Lors des essais réalisés sur le PNH au CEPR à Tours, nous avons utilisé du Beclospin[®], mimant les spores de *B. anthracis*. La concentration de l'aérosol est mesurée par le compteur optique à particules connecté au masque (n° 3 de la figure 58), la nébulisation étant arrêtée dès qu'on atteint la valeur cible.

Les volumes respiratoires sont enregistrés à l'aide du pneumotachomètre. La multiplication du volume par la concentration de l'aérosol généré permet d'obtenir la masse cumulée d'aérosols réellement inhalée (Volume cumulé x Concentration = Masse inhalée). Le volume cumulé est le volume d'aérosols inhalés au cours du temps.

De plus, afin de calculer la dose déposée à partir de la dose inhalée (toutes les particules ne se déposant pas dans les voies respiratoires), nous avons appliqué un facteur de correction de 22% issu des expériences précédentes du laboratoire [133].

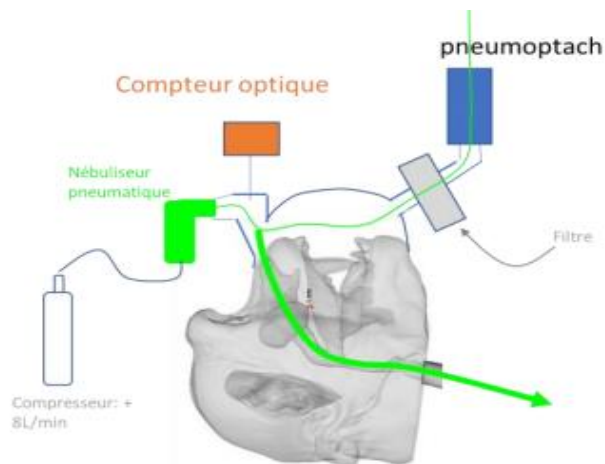
Lors du fonctionnement du prototype, l'animal inspire et expire dans le masque. Lors de la **phase expiratoire** de l'animal (trajectoire en rouge sur la figure 60), l'aérosol produit par le nébuliseur pneumatique NL9m[®] transite par le masque et est acheminé vers le filtre à particules connecté au pneumotachomètre mesurant les paramètres respiratoires de l'animal. Afin de ne pas comptabiliser le débit d'air du nébuliseur lors de la mesure des paramètres ventilatoires du PNH, le « zéro » du pneumotachomètre était initialement calibré avec le débit d'air du nébuliseur en fonctionnement.



Phase expiratoire

Figure 60 : Fonctionnement du prototype pneumatique en phase expiratoire.

Durant la **phase inspiratoire**, l'aérosol à concentration constante est inhalé par le PNH (trajectoire de l'aérosol inhalé représentée en vert sur la figure 61).



Phase inspiratoire

Figure 61 : Schéma du fonctionnement du prototype pneumatique.

Ainsi, le prototype pneumatique produit un aérosol à concentration constante au cours du temps qui est inhalé par le PNH. La figure 62, illustre une courbe sinusoïdale représentant le débit respiratoire de l'animal au cours du temps mesuré par le pneumotachomètre et le débit d'air du nébuliseur qui est toujours supérieur au débit respiratoire du PNH. L'aérosol disponible pour l'inhalation correspond aux zones vertes : il n'y a pas de dilution d'aérosol par l'air extérieur, garantissant une concentration constante et homogène de l'aérosol inhalé durant le volume courant et permettant ainsi la réalisation des calculs pour la dose cible.

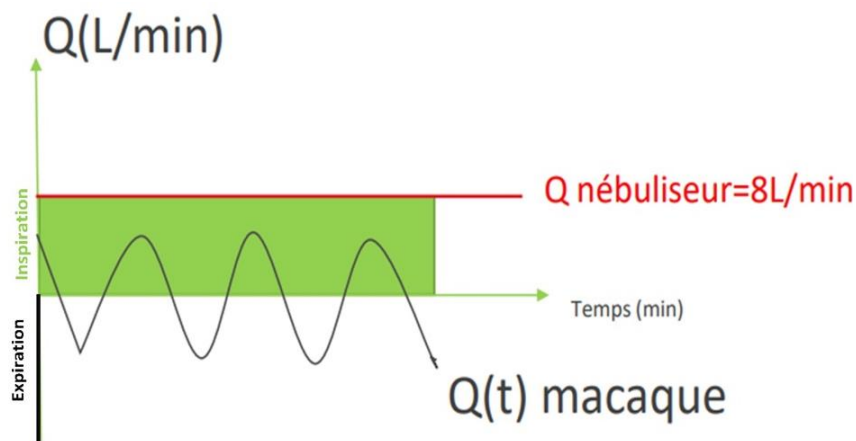


Figure 62 : Courbe sinusoïdale de l'aérosol produit à concentration constante par le prototype 1. La nébulisation est arrêtée quand la dose cible est atteinte.

III.3.2.3 Prototypes à tamis (prototypes 2 et 3) :

- **Description commune**

Les prototypes fonctionnant avec un nébuliseur à tamis, ont une zone de transport qui comporte les raccords en plastique (22M/15F-22M-22F, Intersurgical[®]) agencés en forme de Y (prototype 2) ou de T (prototype 3). Ces deux prototypes utilisent un nébuliseur Aerogen[®] à tamis vibrant connecté à un masque facial étanche à l'air. Ces dispositifs peuvent aussi être utilisés en ventilation spontanée chez un animal en position assise ou couchée. Des valves sont placées sur les branches de transport pour l'inhalation et l'exhalation. La branche dédiée à l'exhalation des aérosols se termine par un filtre PALL plissé (BB50T, PALL Corporation[®] Saint Germain-en-Laye France). Ce système utilise le concept des systèmes de nébulisation de médicaments. Dans ce contexte, la dose inhalée n'est pas associée à une durée d'inhalation mais est associée directement à une dose préalablement chargée dans le réservoir du nébuliseur : la dose cible qui va atteindre les voies respiratoires est uniquement dépendante de la dose chargée dans le réservoir du nébuliseur. Cette dose est atteinte à la fin de la production de l'aérosol, lorsque le réservoir du nébuliseur à tamis est vide.

- **Description détaillée du « prototype à tamis en forme d'Y » (prototype 2)**

Ce prototype se compose de six éléments présentés dans les figures 63 (A et B).

En partant de la face de l'animal on retrouve :

- 1-** Le masque oro-nasal à crochets (1) précédemment décrit. Les figures 63-A et 63-B illustrent ce masque comprenant un orifice sur lequel se connecte la zone de transport en forme d'Y,
- 2-** Une zone de transport en forme de Y. Cette connectique a une branche inspiratoire et une branche expiratoire,
- 3-** Un nébuliseur à tamis vibrant (2) connecté sur la branche inspiratoire de la pièce en Y,
- 4-** Un filtre à particules PALL® (4), (BB50T, PALL Corporation® Saint Germain-en-Laye France) est connecté à la branche inspiratoire,
- 5-** Un deuxième filtre à particules PALL® (4) pour filtrer les aérosols exhalés est connecté à la branche expiratoire de la connectique Y. Il permet aussi une haute efficacité de filtration (efficacité de filtration > 99, 99%) comme pour le prototype 1,
- 6-** Des valves inspiratoires et expiratoires, à sens unique, « one-way valve ». Elles sont représentées par les flèches noires sur la figure 63-A. Elles constituent le cœur du fonctionnement du dispositif. Elles sont respectivement à l'intérieur des branches inspiratoires et expiratoires de la connectique en Y. Elles permettent un système d'administration des aérosols en bolus qui permet à l'animal de recevoir l'aérosol uniquement à des doses unitaires générées par le mouvement de va- et-vient des valves le long de la nébulisation.

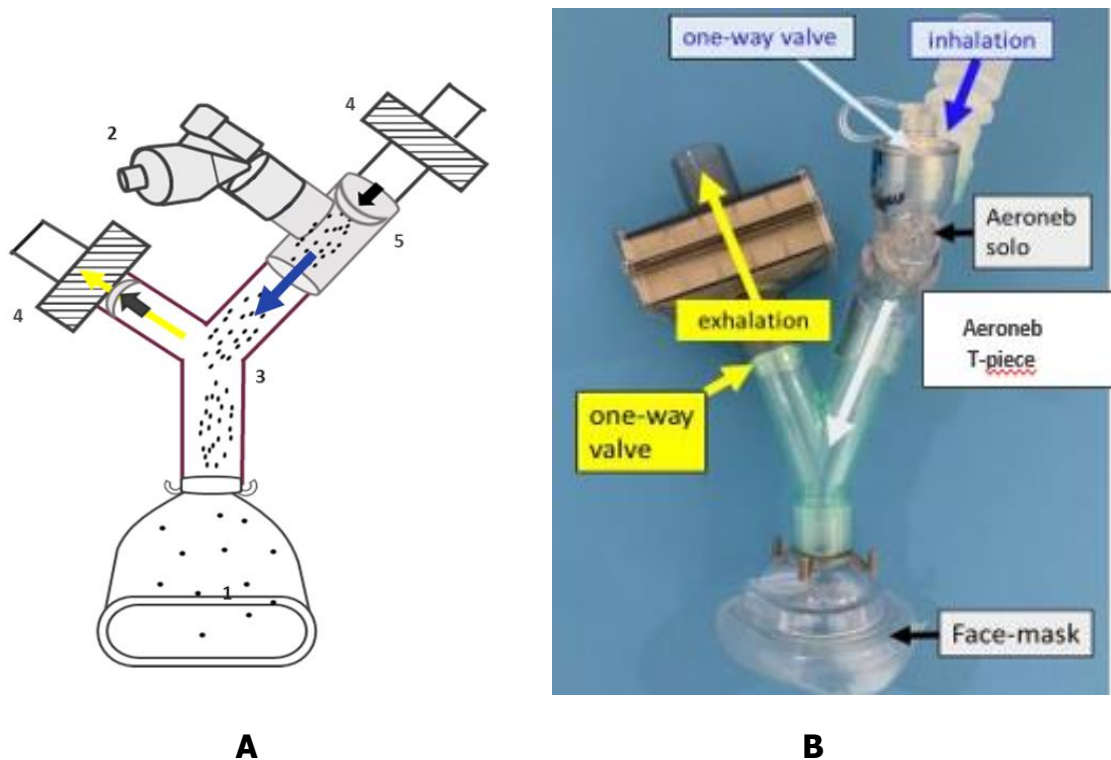


Figure 63 : Descriptif et fonctionnement du prototype à tamis Y. Le sens du flux de l'aérosol produit par le nébuliseur Aerogen® est représenté sur les figures A et B par la flèche en bleue. La flèche jaune représente le sens du flux d'air des aérosols exhalés.

- **Fonctionnement du prototype à tamis en forme d'Y :**

A l'**expiration de l'animal**, l'aérosol produit par le nébuliseur à tamis est tout d'abord concentré dans la chambre de stockage, puis la valve inspiratoire se ferme et la valve expiratoire s'ouvre. Ainsi, l'air expiré par le PNH est dépourvu d'aérosols et exhalé vers le filtre à particules.

Sur le graphique de la figure 64, lors de la **phase inspiratoire de l'animal**, l'aérosol stocké et concentré dans la chambre de stockage est inhalé depuis la chambre jusqu'aux voies aériennes du PNH (illustré par les parties en vert).

L'air inspiré par le PNH génère une dépression dans la partie supérieure de la chambre de stockage permettant d'ouvrir la valve inspiratoire. L'aérosol est transporté par l'air vers les voies inspiratoires du macaque, où il est inhalé.

L'aérosol disponible pour l'inhalation correspond aux zones vertes tandis que les zones sans couleur indiquent les pertes de l'aérosol dans l'air ambiant. L'aérosol est administré en bolus grâce aux mouvements de va-et-vient des valves unidirectionnelles qui permettent à l'animal de recevoir l'aérosol uniquement à doses unitaires tout au long de la nébulisation. Ainsi, le système s'adapte à la respiration de l'animal pour envoyer des bolus d'aérosols calibrés tout en limitant les pertes dans le système

d'inhalation. Le nébuliseur à tamis Aeroneb solo[®] (Aerogen Ltd. Galway, Ireland) a été utilisé avec un débit de fonctionnement du nébuliseur de 0,1mL / minutes.

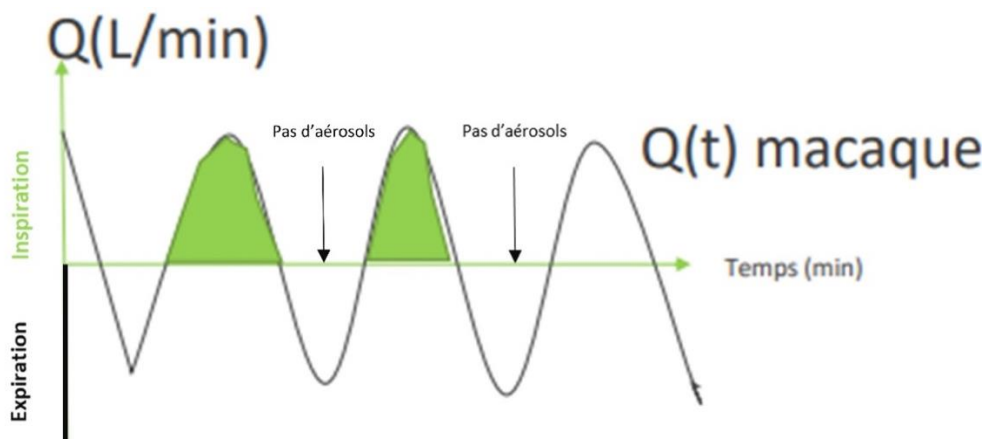


Figure 64 : Courbe sinusoïdale des rapports inspiration/expiration des prototypes à tamis.

L'aérosol disponible pour l'inhalation correspond aux zones vertes tandis que les zones sans couleurs indiquent les pertes de l'aérosol dans l'air ambiant. L'aérosol est administré en bolus. L'aérosol délivré a donc une concentration variable au cours du temps.

- **Description et fonctionnement du « prototype à tamis en forme de T » (prototype 3) :**

Ce prototype 3 a fait l'objet d'un brevet joint en Annexe 5 intitulé « Système de nébulisation par masque sans dépôt sur la face ». La description et le fonctionnement de ce prototype 3 étant décrits en détail dans le brevet (Cf. Annexe 5) nous allons ici en faire un résumé succinct.

L'invention se compose d'éléments présentés et détaillés dans les figures 65-A et 65-B. En partant de la face de l'animal, on a :

- Un **masque étanche** comprenant deux ouvertures : une en position inférieure (flèche noire en pointillé sur le schéma 65-B) et l'autre en position supérieure (flèche noire en trait plein sur le schéma 65-B). La distance entre les deux ouvertures sur le masque permet de rincer le masque à l'aide de l'air expiré par le PNH afin de ne pas favoriser l'existence de zones non ventilées qui concentreraient l'aérosol et favoriseraient son dépôt sur la face du PNH.
- Une **zone de transport de l'aérosol en forme de T** (point « 2 » du schéma 64-B) orientée selon un axe longitudinal et vertical (en forme de T) par rapport à la force de la pesanteur. Cette zone assure la fonction d'une zone de stockage de l'aérosol. Cette zone est connectée à la première ouverture munie d'une valve unidirectionnelle (6) permettant le passage de l'air extérieur vers la zone de stockage (2), et est connectée à un nébuliseur à tamis (5) tel que l'aérosol projeté

par le nébuliseur à tamis (5) est situé dans l'axe longitudinal de la chambre de stockage (flèche verte, schéma 64-B).

- Une **valve unidirectionnelle** (4) connectée sur la deuxième ouverture du masque et permettant le passage de l'air depuis le masque vers l'air extérieur.
- Un **filtre à particules PALL®**, (BB50T, PALL Corporation® Saint Germain-en-Laye France) est connecté à la branche inspiratoire et un deuxième, pour collecter les aérosols exhalés, est connecté à la branche expiratoire de la connectique T. L'aérosol inhalé est schématisé par la flèche en vert et l'aérosol exhalé par la flèche bleue. La valve expiratoire « 4 », connectée sur le raccord de l'ouverture inférieure du masque permet l'exhalation de l'air du masque vers le filtre à particules PALL® (5) selon le sens indiqué par la flèche bleue en pointillé.

Succinctement, comme le prototype 2, à la phase expiratoire, l'aérosol est stocké puis lors de la phase inspiratoire il est inhalé.

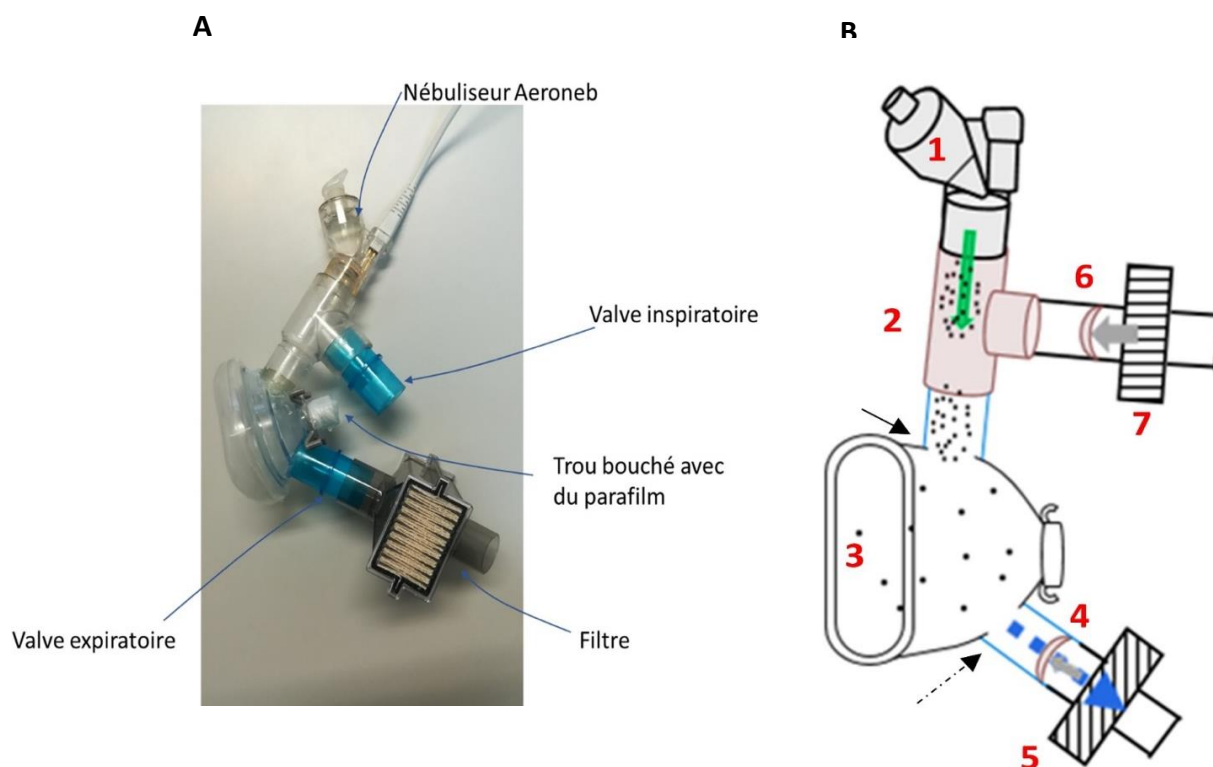


Figure 65 : Photo et Description de l'invention prototype T.

III.4 Métrologie des aérosols produits par les prototypes développés

III.4.1 Mesure de la taille des particules des solutions nébulisées avec les prototypes développés

III.4.1.1 Les substances nébulisées à l'aide des prototypes :

- **La Fluorescéine**

La fluorescéine est un colorant utilisé comme traceur fluorescent pour visualiser qualitativement (à l'œil nu) les zones de dépôts des aérosols générés à l'aide des prototypes. Facile d'utilisation (pas de contrainte de laboratoire), une gamme de solutions de fluorescéine (Fluorescéine Sodique, Saint Louis, MO 63103, USA Sigma-Aldrich®) produite à une concentration de 10 g/L a été préparée pour les premiers essais de nébulisation.

L'absorbance ou la densité optique des différentes solutions de la gamme de dilution sont mesurées par spectrophotométrie UV-visible (WPA Biowave, Morangis, France, Bioserv®). Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans une cuve en quartz selon les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert qui décrit qu'à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est

proportionnelle à sa concentration (C), et à la longueur (l) du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C.$$

(A = Absorbance, l = longueur de la cuve, C = concentration, ϵ représente le coefficient d'extinction molaire de la substance absorbante en solution.

La densité optique des échantillons est déterminée par un spectromètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier.

- **Beclospin® : corticoïde inhalé utilisé comme mime de spores liquide de bacille**

Le CEPR étant un laboratoire de type BSL-1, une suspension de corticoïde liquide pour inhalation disposant de l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) en France, chez l'Homme, le Beclospin® (Laboratoire Chiesi®, Italie) a été utilisé dans les prototypes en tant que mime de spores. Le Béclospin® est une suspension contenant des particules de corticoïdes de taille similaires à celles des spores.

- **Les nanoparticules**

Au vu de l'essor de la nanomédecine et des différentes possibilités de synthèse de nanoparticules (NPs) constituées de polymères de tailles variables, l'objectif est d'évaluer si des nanoparticules (NPs) chargées en iode sont prédictives de la distribution dans les voies respiratoires de primates non humains par imagerie par TEP/CT. Les études ont été réalisées uniquement dans le modèle 3D Cast de PNH. Les suspensions de nanoparticules d'acide poly-lactique (PLA) (Adjuvatis®, Rockfeller, Lyon, France) ont été formulées par le laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique de Lyon, (laboratoire du Dr Bernard Verrier). Ces nanoparticules jouent un rôle de biomimétisme. Elles sont biocompatibles et biodégradables, approuvées par la FDA, et ont une gamme de tailles de 130 à 220 nm. L'étude sera une preuve de concept concernant le modèle de dépôt des NP-PLA radio-opaques dans un modèle de macaque *cynomolgus* exposé par voie oro-nasale à l'aide d'un masque nez-bouche. Cette étude pilote nous permettra de savoir si l'utilisation de NPs radio-opaques peut prédire la distribution/répartition des particules après la nébulisation. Le signal a été quantifié en utilisant l'imagerie CT-Scan.

Les nanoparticules (NP) utilisées sont des suspensions de couleur laiteuse. Leur formulation a été personnalisée pour imiter une particule de taille de 209 nm (petites particules de NP) et 946 nm (grandes particules de NP). Ces particules ont été encapsulées respectivement à 94% par une forte concentration (5200 µg / ml) et à 99 % à 27800 µg/ml de produit de contraste iodé, radio-opaque, le Lipiodol® (Guerbet, Aulnay-Sous-Bois, France) permettant leur visualisation par une technique d'imagerie. On parle ainsi de NP-iodées ou NP-LP (Nanoparticules de Lipiodol®). Après leur

réception, 1mL de NP ont été suspendues 5 fois à la pipette et insérées dans le réservoir d'un nébuliseur à tamis de type Aerogen® (VMD = 3,5 µm). Entre la nébulisation des petites et grosses particules de NPS, le nébuliseur a été rincé par du PBS. Les aérosols de NPs sont ensuite administrés à l'aide d'un masque oro-nasal dans les voies aériennes du modèle physiologique 3D Cast *in vitro* pour caractériser les dépôts à l'aide d'imagerie CT-scan durant 5 minutes.

Avant l'exposition de l'animal, une quantification *in vitro* des NP a été effectuée afin de détecter un signal qui puisse être quantifiable dans les voies respiratoires du modèle 3D Cast de PNH.

- **La solution de DTPA-^{99m}Tc**

Le DTPA-^{99m}Tc est utilisé comme radiotracer pour quantifier les dépôts des aérosols par scintigraphie par gamma caméra. Le DTPA-^{99m}Tc est homogénéisé avec une solution de NaCl 0,9% ou de Béclospin® chargée dans le réservoir du nébuliseur. L'activité de la solution de DTPA-^{99m}Tc introduite dans la cuve des nébuliseurs des trois prototypes est de 150 MBq.

- **La solution de ¹⁸F- FDG**

Le fluor 18 couplé au FDG est utilisé comme radiotracer pour quantifier les dépôts des aérosols par imagerie par TEP couplée à une analyse radiographique après nébulisation de ¹⁸FDG. L'activité des solutions de ¹⁸FDG utilisée avec les différents prototypes est de 40MBq.

III.4.1.2 Granulométrie des aérosols nébulisés à l'aide des prototypes

Les différentes substances décrites dans le chapitre précédent, ont été nébulisées par des nébuliseurs pneumatique ou à tamis, connectés aux prototypes. Leur métrologie a été réalisée à l'aide d'impacteur en cascade ou du système à diffraction laser Spraytec (Malvern Panalytical). Les résultats sont présentés dans le tableau 9 qui suit.

Tableau 9 : Résultats granulométriques (moyenne des 3 répliques pour chaque solution)

(A : MMAD mesuré par impacteur en cascade ; B : MMAD mesuré par DLPI+ ; C : VMD mesuré par spraytec).

Solution	Prototype 1 (pneumatique)	Prototype 2 (Y)	Prototype 3 (T)
Fluorescéine*	Non déterminé		
Sérum physiologique (NaCl, 0,9%)	4,3 µm (C)		3,8 µm (C)
Béclospin®	3,3 µm (A, C)		4,2 µm (C) 3,9 µm (A)
[¹⁸ F]-FDG	4,2 µm (C)		2,7 µm (B) 4,2 µm (C)

*Mesure non réalisée dans le cas de ma thèse car risque de contamination de l'appareil de mesure. Mais, des études préalables au CEPR montrent que la fluorescéine a les mêmes caractéristiques que le NaCl 0,9% (document interne).

III.4.1.3 Mesure de la distribution particulaire par microscopie en flux et par NGI

Nous souhaitons voir si la distribution particulaire du Béclospin® est similaire à celles des spores liquides de *Bacillus atrophaeus* qu'on utilisera dans le cadre de l'aérosolisation des spores chez le macaque au CEA-IDMIT. A partir d'un millilitre de suspension de Béclospin® à 800 µm/2mL, la distribution particulaire (taille) de la suspension de Béclospin®, considérée comme solution mère, est d'abord étudiée par microscopie en flux (Flowcell FC-100-IPAC, Occhio®). Les résultats (Figure 66) démontrent que la taille moyenne des particules de beclospin contenues dans un mL d'une suspension mère de Béclospin® est comprise entre 2 et 3 µm. Pour comparaison, la taille moyenne des spores de *Bacillus anthracis* est de 1µm (données provenant de l'IRBA).

Par la suite, après une série d'aérosolisation, 1mL de suspension de Béclospin® est prélevé de chaque étage du NGI et transféré dans un système de cellule à flux. Les mesures dans la cellule à flux ont été réalisées en appliquant un flux continu dans du PBS.

Après la réalisation de la distribution particulaire en microscopie en flux pour 1mL de Béclospin®. Il est radiotracé au DTPA-^{99m}Tc, nébulisé et son dépôt dans les différents plateaux d'un impacteur en cascade (NGI), sera suivi par imagerie pour quantifier le pourcentage de dépôt dans les plateaux et définir le MMAD de la particule.

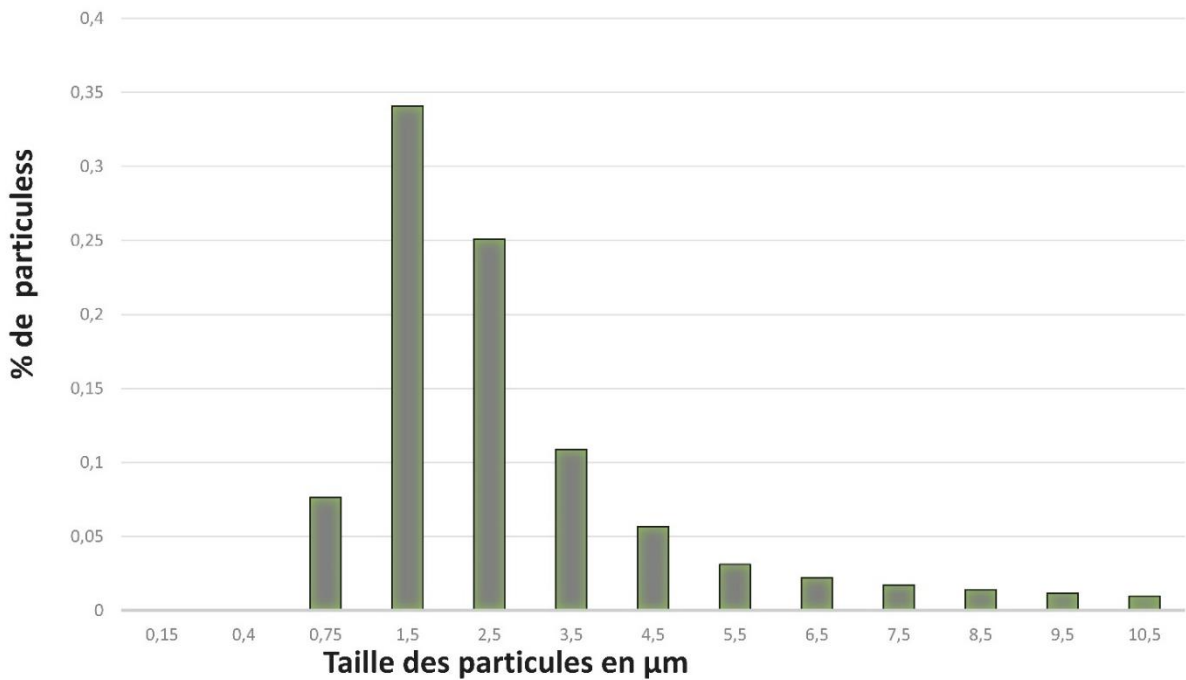


Figure 66 : Distribution des particules contenues dans 1 ml d'une suspension de Beclospin®.

La taille et la morphologie d'une suspension de Beclospin® (CEPR, Tours) ont également été comparées à celle de spores bactériennes (IRBA, Brétigny sur Orge) par microscopie optique afin de savoir s'il s'agit d'un bon mime de spores. L'image de microscopie optique confirme que la taille d'une particule de Beclospin® a le même aspect visuel en Microscopie (MO) (Figure 67) et est à peu près du même ordre de taille qu'une spore de *Bacillus anthracis* (souche vaccinale STERNE) et qu'une spore de *Bacillus atrophaeus* (forme non pathogène) en solution. *Bacillus atrophaeus* sera utilisé ultérieurement dans les essais d'aérosolisation chez le macaque, au CEA- IDMIT.

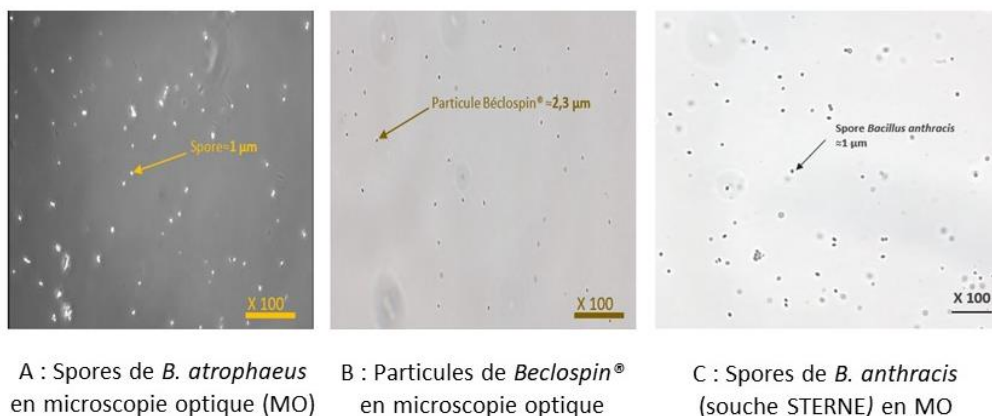


Figure 67 : Spores de *Bacillus atrophaeus* en microscopie optique (MO) (image A), particule de Beclospin® en MO (image B) à un grossissement X 100 et spores de *Bacillus anthracis*, souche STERNE (image C).

III.4.2 Expérimentation *in vitro*, à l'aide du modèle 3D Cast de macaque

Le modèle 3D Cast (*in vitro*) a été utilisé en amont des études *in vivo* pour pré-caractériser et mettre au point les éventuels ajustements expérimentaux : emplacement des dispositifs sur la face des animaux, essais de nébulisation, dépôt des aérosols etc.

Les essais qualitatifs *in vitro* ont été réalisés à l'aide d'aérosols de fluorescéine. Par la suite ils ont été réalisés à l'aide d'une solution de Beclospin® couplée à un radiotracteur (DTPA-^{99m}Tc), et ce pour quantifier le dépôt des aérosols dans les voies respiratoires du modèle *in vitro*.

Les quantités de ^{99m}Tc-DTPA déposées dans les voies respiratoires et restant dans le nébuliseur ont été déterminées à partir des images numérisées en tenant compte des coefficients d'atténuation des tissus, préalablement déterminés par scintigraphie (Cf. chapitre 2, « article *in vitro* versus *in vivo* »). Le contour de l'organe a été spécifié à l'aide d'une région d'intérêt spécifique (ROI), et les poumons ont été délimités à l'aide de la région d'intérêt. La dose d'aérosol délivrée aux différents organes modèles est rapportée en pourcentage de la dose nominale placée dans le nébuliseur et du volume équivalent de liquide pour une expérience donnée, en tenant compte de la désintégration du technétium pour toutes les mesures.

III.4.2.1 Essais à l'aide d'aérosols de fluorescéine (1g/L)

Les dispositifs mis au point sur le modèle 3D Cast sont représentés pour le prototype pneumatique fonctionnant avec l'air humide (Cf. Annexe 4) (Figure 68 A) et pour le prototype à tamis (Figure 68 B). La disposition du montage a été ajustée et validée pour un fonctionnement avec un animal en position assise. Les élastiques verts sont accrochés à l'ensemble du dispositif pour maintenir le masque sur la tête.



A



B

Figure 68 : Essais de montage des prototypes sur le modèle *in vitro* 3D Cast de macaque.
A : Montage du prototype pneumatique fonctionnant avec le nébuliseur NL9m® et l'air humide.
B : Montage du prototype à tamis fonctionnant avec le nébuliseur Aérogen solo®, générant des aérosols en bolus.

La visualisation d'aérosols de fluorescéine dans les différentes parties du 3D Cast (Figure 69) démontre que le nébuliseur génère d'une part des aérosols et d'autre part ces aérosols se déposent dans les VAS, les VAI, mais également sur le museau de l'animal et la face interne du masque.

Ces résultats obtenus sur le modèle *in vitro* nous ont alertés quant à la manipulation des prototypes à l'aide d'aérosols radioactifs ou infectieux lors des essais *in vivo* chez le macaque, dans les laboratoires dédiés.



Figure 69 : Essais d'aérosolisation à l'aide du prototype pneumatique et des aérosols de fluorescéine pour visualiser le dépôt dans le modèle *in vitro* 3D Cast. Les images représentent (de la gauche vers la droite) les dépôts visibles sur la face (museau) ; la trachée, les filtres représentant les divisions bronchiques, les VAS du macaque et le masque après la nébulisation.

III.4.2.2 Résultats de dépôts de nanoparticules dans le modèle *in vitro* 3D Cast

Les images CT des NPs de 946 nm ne montrent pas de dépôts après nébulisation avec un nébuliseur à tamis de type Aerogen® (Figure 70). Ceci peut s'expliquer par le fait que ces NPs s'agrègent, bouchant les mailles du tamis du nébuliseur. Seul le liquide de suspension semble avoir été nébulisé. Une autre hypothèse est que le produit de contraste s'est dégradé au cours du temps. Les nanoparticules d'une taille de 946 nm sont très proches de la taille d'une bactérie. Elles auraient dû être un bon mime d'une bactérie mais aucune image de dépôt n'a été observée au CT.

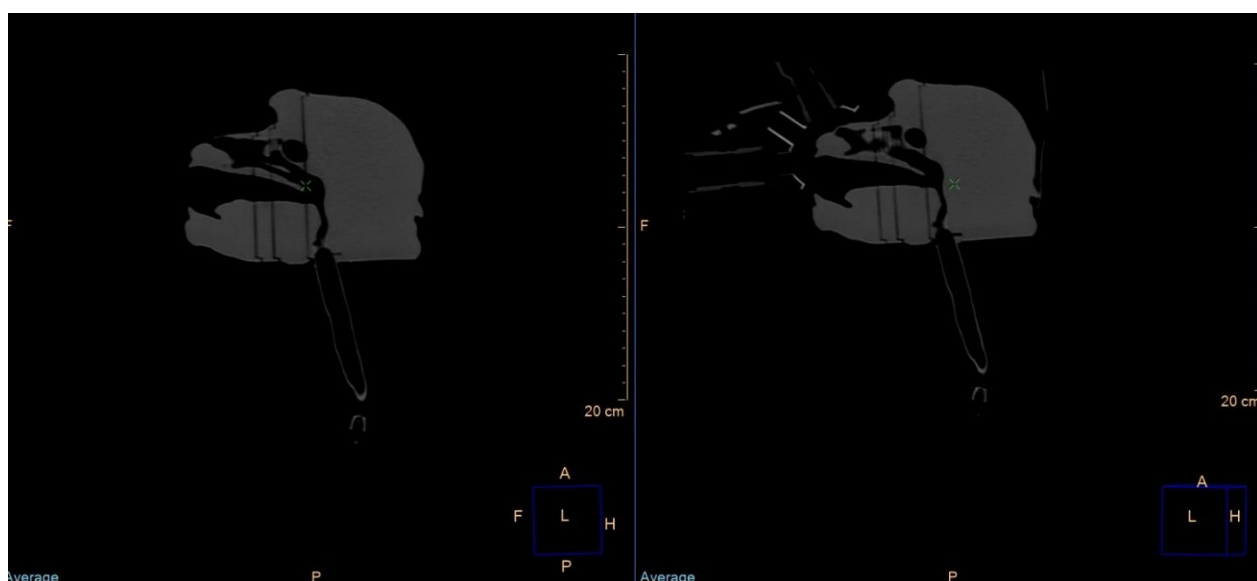


Figure 70 : Images de dépôts par CT (computer tomography) de particules de grandes tailles de nanoparticules iodées avant (image de gauche) et après nébulisation (image de droite).

Les images de dépôt des NPs aérosolisées de 209 nm montrent un léger dépôt dans les voies aériennes respiratoires (Figure 71). Le dépôt est plus marqué dans la partie terminale de la trachée du modèle 3D Cast en comparaison aux VAS.

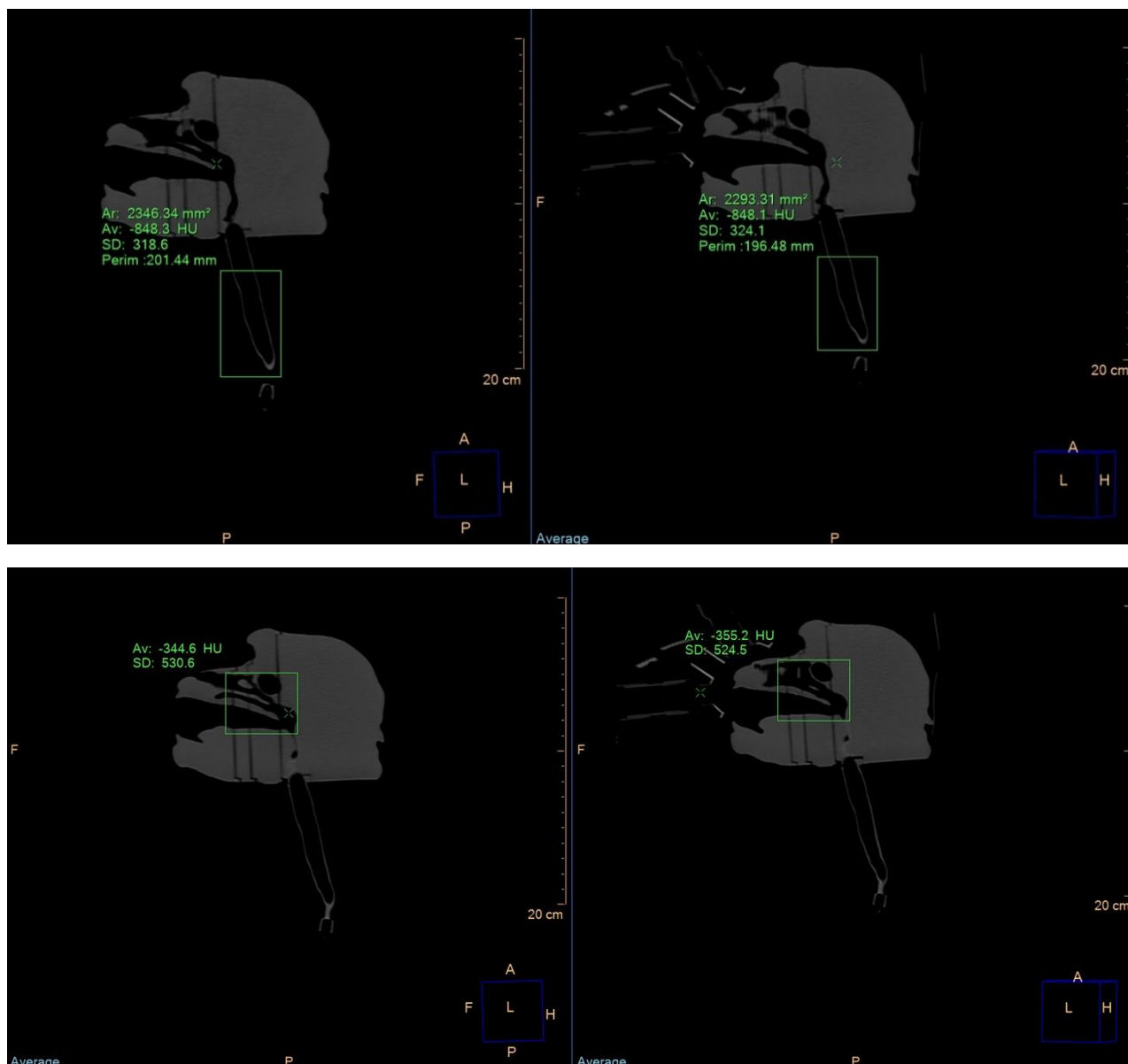


Figure 71 : Images de dépôts par CT de particules de petites tailles de nanoparticules iodées avant (image de gauche) et après nébulisation (image de droite).

Ainsi, le développement et l'utilisation des formulations actuelles en NPs, utilisées comme mimes d'agents infectieux apparaissent instables et nécessitent d'autres améliorations galéniques pour obtenir des mimes proches de la taille du micromètre. Les nanoparticules n'ont donc pas été retenues pour la suite des expériences.

III.4.2.3 Dépôt des aérosols par scintigraphie par gamma caméra

Des essais de nébulisation et de suivi des dépôts d'aérosols de DTPA – ^{99m}Tc (≈150MBq) couplés au Beclospin®, ont été réalisés (n=3) sur le modèle *in vitro* uniquement avec le dispositif pneumatique.

III.4.2.3.1 Résultats qualitatifs des essais *in vitro* à l'aide d'aérosols de DTPA-^{99m}Tc (prototype 1)

Les images de dépôts obtenues par scintigraphie par gamma caméra (Figure 72) prises avec le modèle 3D placé face à la gamma caméra, illustrent un dépôt à la fois dans les VAS et les VAI. Ce dépôt régional était confirmé qualitativement dans la figure 72. Les régions entourées sont les régions d'intérêts sélectionnées ou ROI.

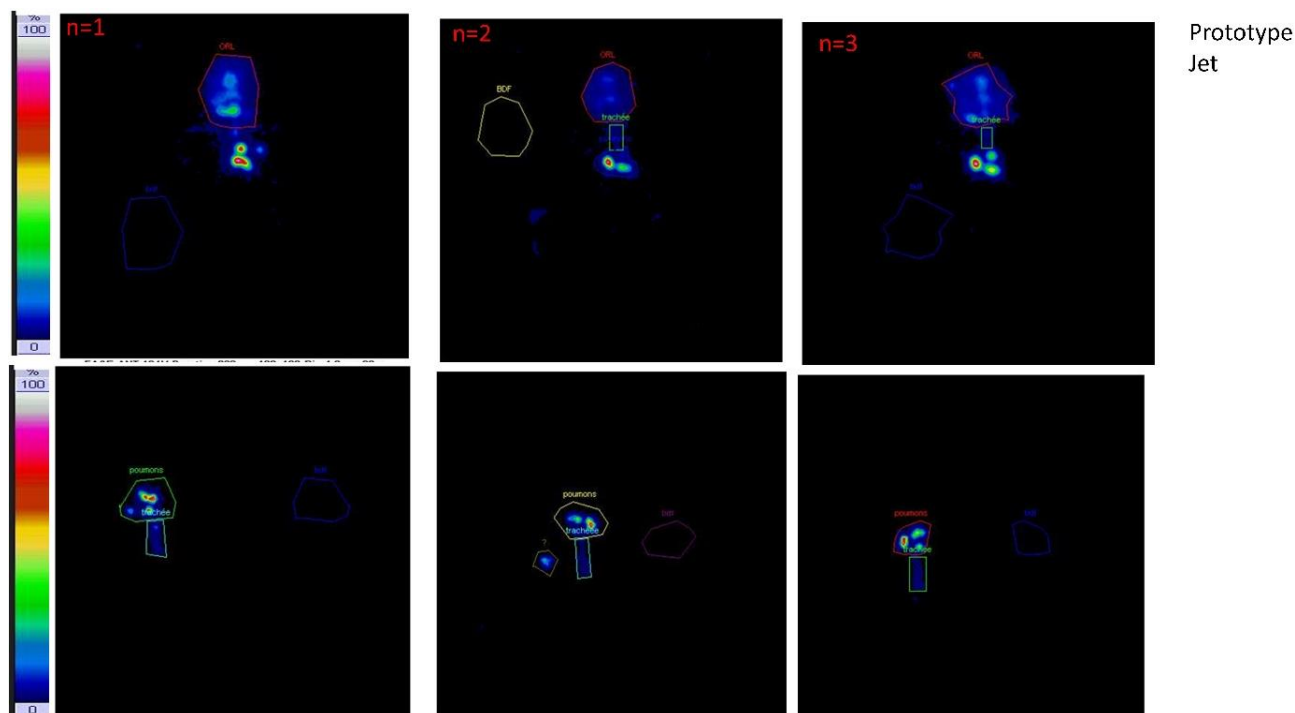


Figure 72 : Images de dépôts d'aérosols radioactifs couplés au Béclospin, pour le prototype pneumatique dans le modèle *in vitro* 3D Cast de macaque, sur 3 essais. Les régions d'intérêt sont sélectionnées pour estimer le dépôt dans les VAS (entourées en rouge) et les VAI (encadrées en vert).

III.4.2.3.2 Résultats quantitatifs des essais *in vitro* à l'aide d'aérosols de DTPA-^{99m}Tc (prototype 1)

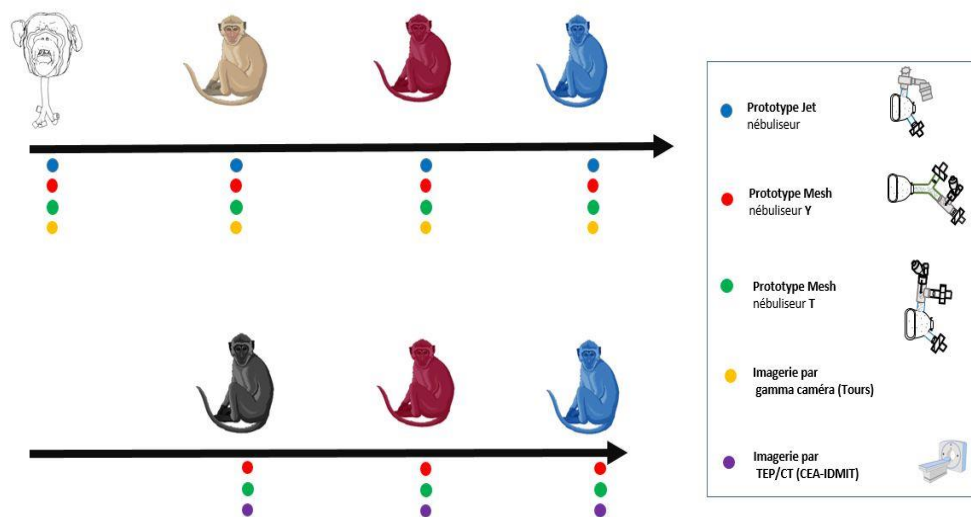
Les résultats de quantification des premiers essais d'aérosolisation à l'aide du prototype 1, démontrent que le pourcentage de dépôts des aérosols dans les voies respiratoires est plus important dans les voies aériennes supérieures (Tableau 10). Les pourcentages de dépôts obtenus sont cohérents avec les précédentes études. L'utilisation du nébuliseur associée à une source d'air humide est donc compatible avec un dépôt pulmonaire.

Tableau 10 : Résultats de la quantification des dépôts d'aérosols nébulisés par le prototype 1 chez le macaque.

Modèle <i>in vitro</i>	Temps de nébulisation (minutes)	Activité introduite dans le nébuliseur (MBq)	% VAS	% Trachée	% VAI (incluant trachée)	% VAI (sans trachée)
n=1	18	159	3,61%	0,13%	3,09 %	2,95 %
n=2	10	143,07	14,42 %	0,54 %	7,93 %	7,32 %
n=3	13	140,4	9,58 %	0,30 %	5,62 %	5,32 %

III.4.3 Mesure par imagerie scintigraphique du dépôt des aérosols chez le macaque avec les différents prototypes

Après cette évaluation *in vitro* des prototypes, nous allons présenter les essais réalisés *in vivo* chez le macaque. L'objectif est de quantifier, à partir de l'imagerie, les aérosols déposés dans les voies respiratoires. Le schéma expérimental qui suit (Figure 73) résume les expériences menées au CEPR, *in vitro* sur le modèle de macaque 3D Cast de macaque, puis *in vivo* chez 3 macaques vigiles au CEPR et au CEA.



Created with BioRender.com

Figure 73 : Schéma expérimental *in vivo* et *in vitro*. Nébulisation d'aérosols à l'aide des prototypes développés et quantifications des dépôts par imagerie TEP/CT au CEA-IDMIT.

III.4.3.1 Protocole expérimental

- **Animaux et nébulisation**

Trois macaques *cynomolgus* adultes femelles, (*Macacca fascicularis*) provenant d'un élevage de l'Ile Maurice avec un poids moyen de 3,6 à 4.5 kg ont été inclus dans cette étude.

Toutes les procédures expérimentales ont été menées conformément aux lignes directrices européennes sur le soin et l'utilisation des animaux à des fins scientifiques (Directive 63-2010, "Journal Officiel des Communautés Européennes", L276, 22 septembre 2010) et les protocoles expérimentaux à Tours et au CEA ont été menés conformément à la réglementation européenne pour le comité d'expérimentation animale, respectivement sous les numéros d'accords des comités d'éthique locaux et de l'administration française, APAFIS #29462#2021020212179142 et APAFIS#29191-2021011811505374 . L'intégrité des poumons a été évaluée avant l'étude des dépôts d'aérosols, par un scanner thoracique (CT, IRIS-CL, Inviscan, Strasbourg, France).

Le scanner à deux lits a été réalisé en considérant 576 projections sur 360 degrés, à 80 kV et 0,9 mA avec un temps d'exposition de 90 ms, conduisant à un temps d'acquisition total de 104 s. L'image bidimensionnelle a été reconstruite avec une correction du durcissement du faisceau, une précorrection des artefacts d'anneau, résultant en 1190 tranches avec une taille de voxel de 160 × 160 × 160 µm.

Afin de limiter le stress, les animaux ont été entraînés à respirer spontanément un aérosol avec un masque facial une semaine avant l'expérimentation. L'aérosol a été administré aux macaques. Une fois anesthésié puis placés dans une chaise de contention ou en décubitus dorsal, légèrement en position déclive, le prototype est posé sur la face de l'animal et la nébulisation a démarrée.

Le jour de l'expérimentation, les macaques ont reçu des aérosols au masque après avoir été anesthésiés par injection intramusculaire de kétamine (3 mg/kg), (Imalgene® 1000, Centravet, Dinan, France) et de Medetomidine (40 µg/kg) (Sedodorm® 1 mg/ml). Une prise de température rectale est effectuée avant le début de l'expérimentation. La saturation en oxygène et la fréquence cardiaque sont mesurées au doigt de l'animal à l'aide d'un saturomètre, durant toute la durée de la nébulisation. Un gel (Ocry-gel®) a été utilisé à la fois pour lubrifier et fermer les yeux des animaux afin d'éviter l'exposition des yeux.

Au niveau du bourrelet du masque se posant sur la face du macaque, un gel échographique aqueux de couleur transparente, non gras, non irritant et non corrosif utilisable en clinique, (ASEPT Plus, Unigel) est appliqué sur tout le pourtour du masque pour maximiser et assurer une meilleure étanchéité, avant d'être posé et attaché sur la face de l'animal.

Lorsque l'ensemble du dispositif est fixé sur la face préalablement rasée de l'animal (au niveau du museau), le masque est connecté et la nébulisation commence simultanément avec un minuteur.

Pour induire un réveil lent, les macaques, une fois de retour dans leur cage, ont reçu, par voie intramusculaire, de l'Atipamezole (200 µg/kg) (Alzane® 5mg/ml).

- **Prototypes testés et formulation**

Les prototypes testés sont le prototype 1 (pneumatique) et les prototypes à tamis vibrant, 2 (Y) et 3 (T).

Chaque macaque a reçu 2 nébulisations par prototype lors de l'utilisation de la gamma-caméra, ce qui a donné 6 mesures par prototype. Les réservoirs des nébuliseurs sont chargés d'une solution de DTPA-^{99m}Tc avec une activité d'environ 150 MBq.

Les 150 MBq sont dilués dans 1mL de Beclospin® : 8,1mL au total sont placés dans le réservoir du nébuliseur pneumatique et 1,1 ml dans celui des nébuliseurs Aerogen® à tamis.

Un exemple de l'utilisation du prototype pneumatique (animal en position assise) avec les prototypes à tamis, T et Y apposés sur la face d'un macaque pendant une séance de nébulisation est représenté dans la figure 74 qui suit.

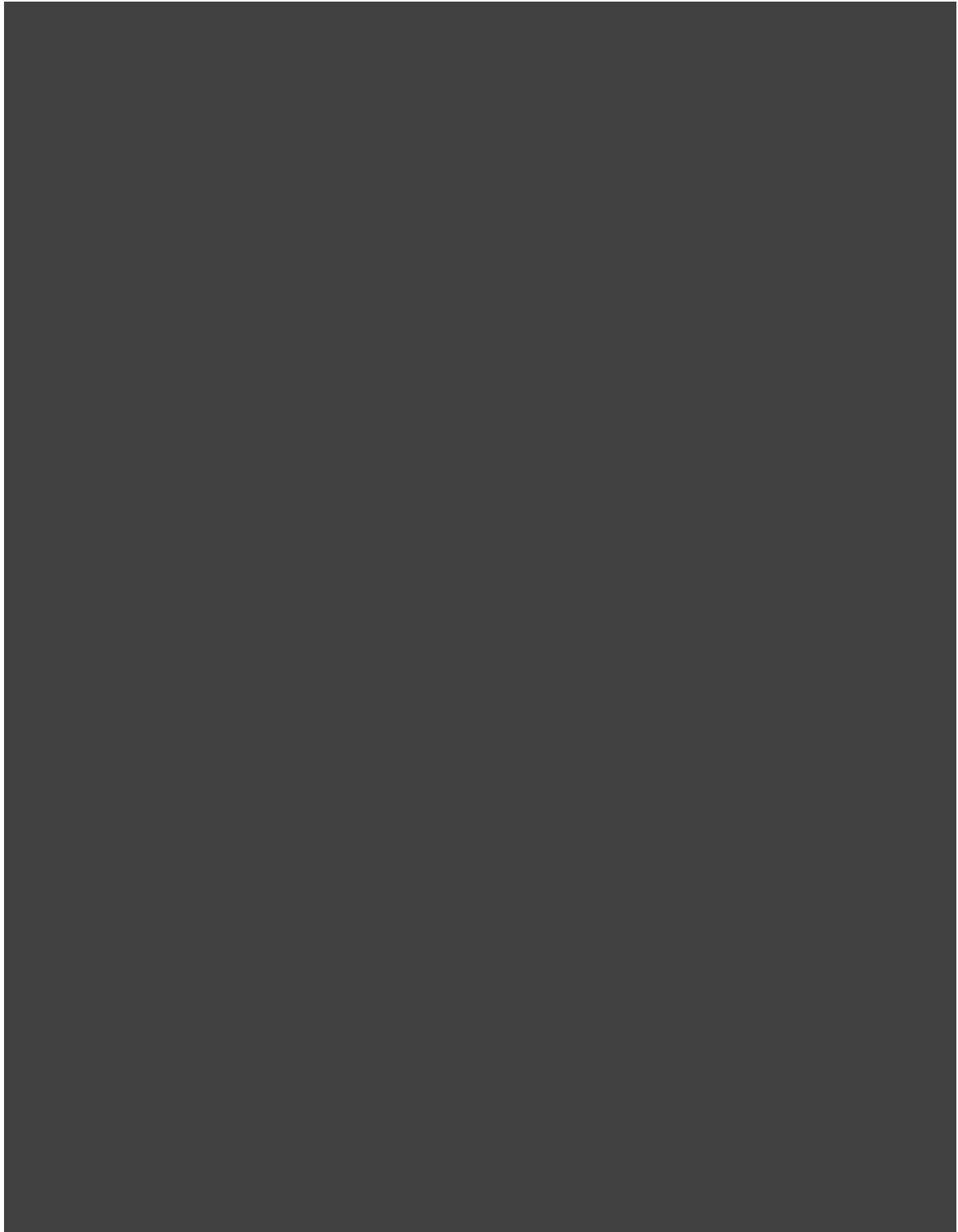


Figure 74 : Essais de nébulisation avec le prototype pneumatique et les prototypes T et Y installés sur la face d'un macaque.
Figure masquée pour des raisons d'éthique et de sensibilité.

- **Mesures de l'air ambiant du laboratoire après nébulisation avec les prototypes**

Après la nébulisation, pour estimer l'étanchéité que confère le masque à bourrelet des prototypes, des mesures radioactives ont été réalisées à l'aide d'un contaminamètre à radioactivité alpha/ bêta RadEye 20[®] (Fischer Thermo Scientific) (CEPR) et d'un contaminamètre LB 124 BERTHOLD[®] (Monitor LB 124 SCINT - 300, Berthold Technologies, Allemagne).

Les mesures sont réalisées sur différentes surfaces environnantes aux expérimentations afin d'évaluer la contamination après la nébulisation. Les mesures concernent le coussin d'inclinaison avec l'alèse sur laquelle sont posés l'animal, les plans de travail et la chaise de contention. Le bruit de fond ambiant de la radioactivité est mesuré en coups par seconde.

- **Acquisition des images**

Le dépôt des aérosols a été estimé sur la base du signal de ^{99m}Tc-DTPA mesuré à la fin de la nébulisation à l'aide d'une gamma-caméra (Orbiter 75 Ecam, Siemens healthcare, Erlangen, Allemagne). La charge du nébuliseur a été mesurée en comptant la radioactivité dans la seringue (qui contenait le ^{99m}Tc-DTPA) avant et après le chargement des réservoirs des nébuliseurs. Immédiatement après l'administration de l'aérosol, l'acquisition de la scintigraphie statique est réalisée pendant 5 minutes.

- **Traitement des images**

Le traitement des images *in vivo* suit la même méthodologie que celle mise en œuvre *in vitro* et précédemment décrite. Les données quantitatives d'imagerie 2 D par scintigraphie sont comparées avec les pourcentages de dépôt de nébuliseurs standards pneumatiques commercialisés (chapitre 2 de la thèse). Les paramètres déterminés à partir des images sont le pourcentage de dépôts dans les VAS et les VAI par rapport à la quantité chargée dans le réservoir du nébuliseur.

Le rendement du nébuliseur est la quantité d'aérosol dans les voies aériennes par rapport à la charge du nébuliseur. La variabilité de dépôt des aérosols est le rapport de l'écart type sur la quantité moyenne d'aérosols déposée dans l'ensemble des voies respiratoires.

La dose d'aérosol délivrée aux différents organes est rapportée en pourcentage de la dose nominale placée dans le nébuliseur et du volume équivalent de liquide pour chaque expérience, en tenant compte de la décroissance du technétium pour toutes les mesures. Les dépôts dans les voies aériennes supérieures ont été définis par la

somme des dépôts dans la bouche, le nez et l'estomac. Les dépôts dans les voies aériennes inférieures ont été définis par les dépôts dans les poumons et la trachée.

III.4.3.2 Résultats

- **Résultats des mesures de concentration dans l'air ambiant du laboratoire après nébulisation avec les prototypes**

La contamination radioactive dans l'enceinte de sécurité biologique (air ambiant dans la pièce) et des points clés de mesure (élastique vert, alèse posée sur le coussin sur lequel l'animal est posé) démontre une absence de contamination, les mesures étant inférieures à deux fois le bruit de fond ambiant mesuré par le contaminamètre. Néanmoins, une contamination mesurée (> à 2 fois le bruit de fond) a été observée suite à certaines expérimentations utilisant le prototype pneumatique où l'animal a bougé la tête lors de la nébulisation nécessitant de replacer le dispositif prototype.

- **Résultats qualitatifs**

Le prototype 1 confirme le dépôt qualitatif observé visuellement sur les images de dépôts *in vitro* : il délivre des aérosols qui ciblent l'ensemble des voies aériennes (Figure 75) chez un macaque anesthésié, en position assise.

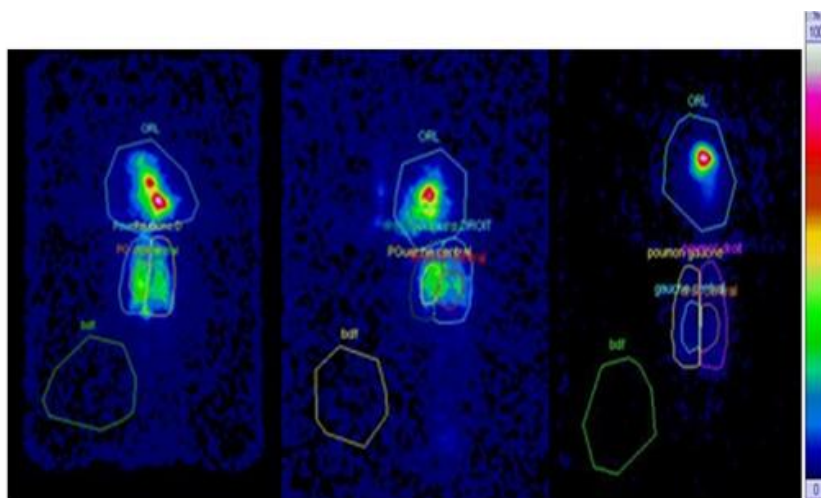


Figure 75 : Exemple d'images de dépôts d'aérosols de Beclospin® radiotracés au $DTPA-^{99m}Tc$, générés à l'aide du prototype 1 chez trois macaques en position assise dans une chaise de contention.

La figure 76 ci-après, présente les images de dépôts d'aérosols prises en face postérieure à l'aide des prototypes T et Y. Les régions entourées sont les régions d'intérêts sélectionnées ou ROI.

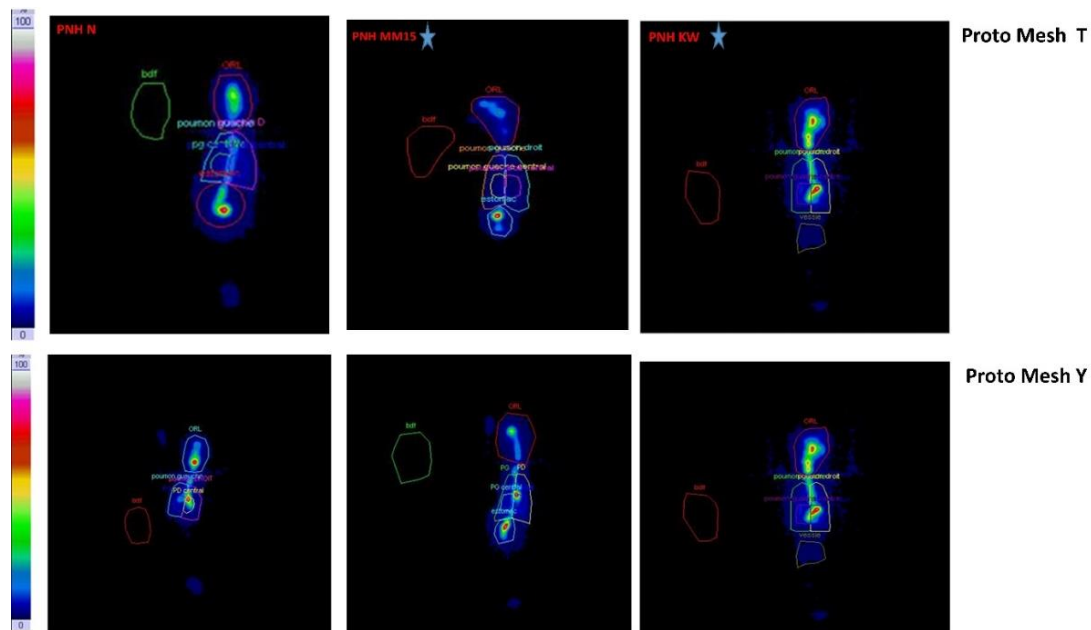


Figure 76 : Visualisation des aérosols générés à l'aide des prototypes par la technique d'imagerie scintigraphique par gamma caméra.

- **Résultats quantitatifs**

La mesure du dépôt d'aérosols chez les 3 macaques a été réalisée par gamma-caméra. Les résultats de 3 différents nébuliseurs pneumatiques commerciaux existant sur le marché, un nébuliseur à jet standard avec un MMAD de 0,4 μm , un nébuliseur à jet standard avec un MMAD de 3,2 μm , un autre avec un MMAD de 3,2 μm , un nébuliseur à jet standard avec un MMAD de 13,9 μm , ont été utilisés pour comparer les résultats de dépôts avec les nébuliseurs associés aux prototypes développés (Tableau 11).

Tableau 11 : Résultats des dépôts d'aérosols obtenus avec la gamma-caméra sur 3 macaques et comparaison des résultats de dépôts avec des nébuliseurs standards commerciaux.

Outils d'administration d'aérosols	MMAD (μm)	VAS	VAI	Variabilité de dépôt dans les VAR (Écart-type / moyenne)	Efficacité de dépôt après 10 minutes	Débit de dépôt ($\mu\text{L}/\text{min}$)
Nébuliseurs standards existants sur le marché						
Microcirrus®	0,4	84%	17%	54%	0,8%	2,5
Sidestream®	3,2	90%	10%	61%	5,7%	17
NL20®	13,9	97%	3%	75%	8%	41
Prototypes						
Proto. Pneumatique (1)	3,9	81%	19%	34%	2,5%	20
Proto. Tamis Y (2)	3,9	59%	41%	30%	37%	37
Proto. Tamis T (3)	3,9	65 %	35%	24%	56%	56

Les résultats obtenus avec des nébuliseurs standards pneumatique, démontrent :

- Globalement un meilleur dépôt dans les voies respiratoires inférieures lorsque la taille des particules diminue, et une diminution du dépôt lorsque la taille des particules diminue. Néanmoins, le pourcentage de dépôt dans les voies respiratoires supérieures reste élevé par rapport au dépôt dans les voies respiratoires inférieures (84% vs 17%) (Cf. Tableau 11).
- La variabilité en termes de dépôts total dans les voies respiratoires, est diminuée en fonction de la taille des aérosols. Cette variabilité reste tout de même élevée (supérieure à 50%).
- Les résultats obtenus avec le prototype 1 démontrent : une variabilité de dépôt plus faible par rapport aux nébuliseurs (34% vs 54%).
- Un dépôt amélioré mais faible dans les voies respiratoires inférieures par rapport au dépôt dans les voies respiratoires supérieures (19 % vs 81%). Ce dépôt dans les VAS qui est supérieur à celui des VAI a également été observé dans les résultats du modèle *in vitro* précédemment décrit.
- L'efficacité du dépôt reste faible pour le nébuliseur prototype pneumatique après 10 minutes de nébulisation (2,5% en termes de charge du nébuliseur).

Les résultats obtenus avec les prototypes à tamis (2 et 3) améliorent nettement le dépôt dans les VAI par rapports aux nébuliseurs standards et au prototype pneumatique. Le prototype T présente les meilleurs résultats.

La proportion de dépôts dans les poumons est de 3%, 10% et 17% respectivement pour des particules de 13,9, 3,2 et 0,4 μm avec des nébuliseurs commerciaux alors qu'elle est de 35% avec le prototype T générant une taille de particule de 3,9 μm . De plus, la variabilité du dépôt des aérosols est réduite avec ce prototype à tamis comparé au prototype pneumatique (24 % (T) vs 34 %).

III.4.3.3 Conclusions

Les nébuliseurs pneumatiques commercialisés ne sont pas totalement satisfaisants en termes de variabilité des dépôts des aérosols. Le prototype pneumatique corrige les limites des nébuliseurs standards, mais les résultats sont moins satisfaisants qu'avec les prototypes à tamis Y et T.

III.4.4 Dépôts mesurés par imagerie TEP-TDM

III.4.4.1 Protocole expérimental

- **Animaux et nébulisation**

Compte tenu de la meilleure performance des nébuliseurs à tamis en comparaison des nébuliseurs pneumatiques, les essais en PET Scan ont été conduits uniquement avec les nébuliseurs prototypes à tamis.

Trois macaques ont reçu une nébulisation avec les prototypes à tamis suivi d'une imagerie TEP-TDM au CEA. Chaque macaque est anesthésié par voie intramusculaire (IM) avec 10 mg / kg de Kétamine (Imalgene 1000[®] 10 mg/kg) et 0,1mg de médétomidine (Domitor[®] 1mg/ml). Les 3 macaques utilisés sont leurs propres témoins. Un résumé des expériences de nébulisation à l'aide des prototypes chez le macaque, est présenté dans le tableau 12.

Tableau 12 : Résumé de l'administration d'aérosols de 3,9 µm de diamètre moyen chez le macaque cynomolgus, au CEPR et au CEA- IDMIT à l'aide de nébuliseurs à tamis ou pneumatiques.

Macaque femelle cynomolgus	Poids (kg)	Volume nébulisé et débit d'administration du nébuliseur	Dose (MBq)
Expérimentations des prototypes au CEPR (DTPA-^{99m}Tc)			
N	3,5	1 ml (nébuliseur à tamis) à un débit de 0,5L / minutes (20%)	150
1KW15	4,99		150
1MM15	5,04		150
Expérimentations des prototypes au CEA-IDMIT (¹⁸F-FDG)			
CDI030*	5,83	1 ml (nébuliseur à tamis) à un débit de 0,5L / minutes (20%)	40
1KW15	4,99		40
1MM15	5,04		40

* Le macaque CDI030 est utilisé au CEA en remplacement du macaque N.

- **Prototypes testés et formulation**

Les réservoirs des nébuliseurs des prototypes sont chargés d'une solution de [¹⁸F] - FDG avec une activité d'environ 40 MBq. Les 40MBq sont dilués dans 1mL de NaCl stérile à 0,9 %. 1mL de cette solution est introduite dans le réservoir du nébuliseur à tamis d'Aeroneb solo®. Les expériences sont réalisées dans une zone de confinement de type A3 (BSL-III).

- **Acquisition des images**

La méthode TEP-CT a été utilisée pour imager le dépôt d'aérosols sur chaque macaque anesthésié en utilisant le [¹⁸F] -FDG. La captation du [¹⁸F] -FDG nous informe sur la cartographie des dépôts dans les différentes parties des voies respiratoires. Un système d'acquisition TEP-CT (Vereos-Ingenuity, Philips, Amsterdam, Pays-Bas) a été utilisé avec une collimation de 64 x 0,6 mm pour le détecteur CT, une tension de tube de 120 kV et une intensité d'environ 120-130 mm. Une durée de 3 minutes par étape

a été fixée pour l'acquisition TEP-CT. La nébulisation dure 8 à 10 minutes. Les macaques continuent à respirer pendant environ une minute de plus avec le masque après la fin de la nébulisation : purge complète de la chambre d'inhalation. Le masque facial est déconnecté sous l'enceinte BSL III et placé dans un sac pour la mesure de la radioactivité. Le dispositif de nébulisation est décroché de la face de l'animal et posé au pied du tunnel pour l'acquisition de l'image.

A l'issue de la nébulisation (10 minutes maximum de nébulisation avec les prototypes à tamis), l'animal est rapidement transféré avec le dispositif de nébulisation dans le tunnel du CT-scan. Un scanner est ensuite réalisé avant l'acquisition TEP. Le dépôt de la radioactivité est évalué sur les images tomodynamométriques (CT) qui ont été reconstruites avec une épaisseur de coupe de 1,25 mm et un intervalle de 0,25 mm. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel LIFEx (LIFEx v 7.2.0, CEA).

- **Traitements des images**

Les pourcentages de dépôts des aérosols sont calculés en tenant compte de l'activité initiale mesurée dans la seringue radioactive, de l'activité chargée dans le nébuliseur et de la différence entre le nébuliseur avant et après nébulisation. L'estimation des pourcentages de dépôts tient compte de la décroissance radioactive du ^{18}F , et des temps d'acquisition et de nébulisation.

Contrairement à la scintigraphie, les images générées par TEP-CT sont en 3D et permettent une visualisation précise de la structure anatomique de chaque organe. Les résultats de dépôts dans les voies aériennes sont par conséquent plus précis.

III.4.4.2 Résultats

- **Résultats qualitatifs**

Les images de dépôts d'aérosols par TEP-CT démontrent une pénétration de l'aérosol dans l'ensemble des poumons de l'animal avec les prototypes à tamis Y (Figure 77) et T (Figure 78).

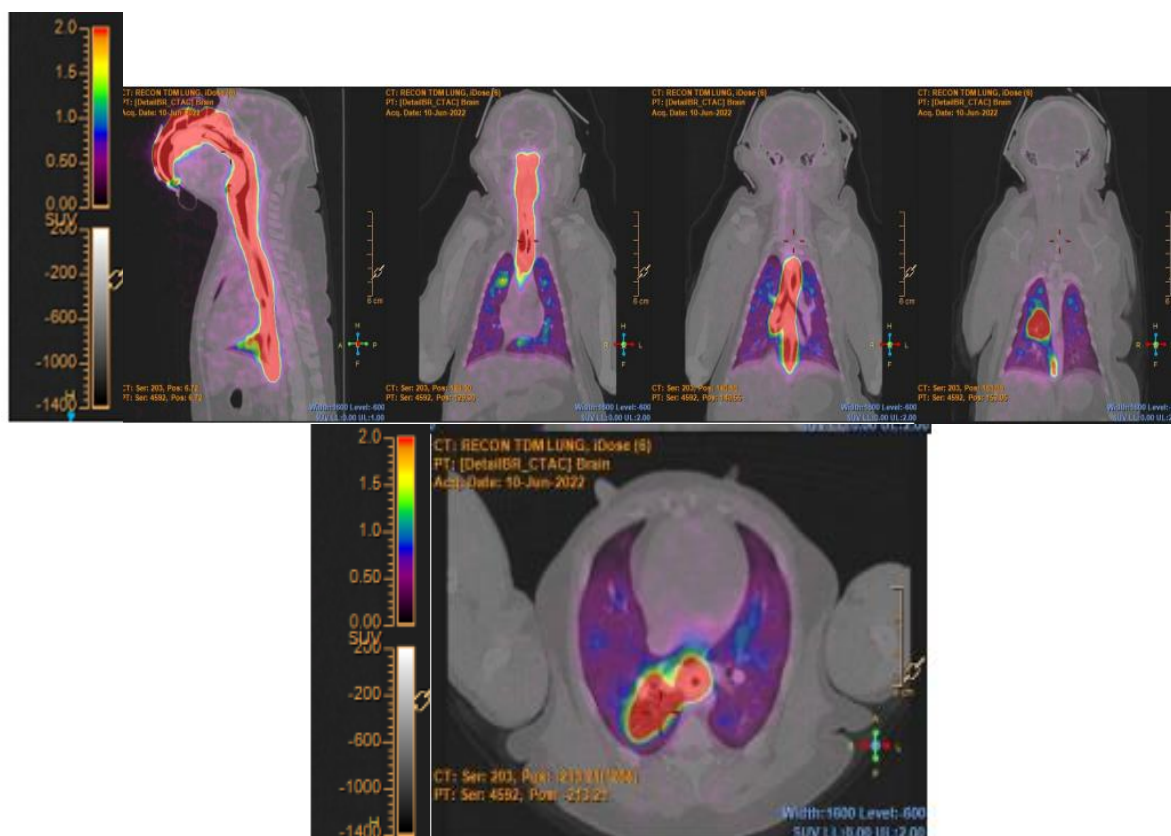


Figure 77 : Exemple d'images (TEP/TDM) de dépôt des aérosols dans les voies respiratoires, exprimées en SUV (Standard Uptake Value) après nébulisation d'environ 40 MBq de [18 F]-FDG avec le prototype de nébulisation à tamis vibrant de type Y chez un macaque cynomolgus.

Les macaques cynomolgus sont anesthésiés en respiration spontanée et ont été exposés par inhalation pour valider la procédure et le ciblage des voies respiratoires totales.

Un exemple d'images de dépôt des aérosols chez le macaque avec le prototype T est représenté dans l'image ci-après.

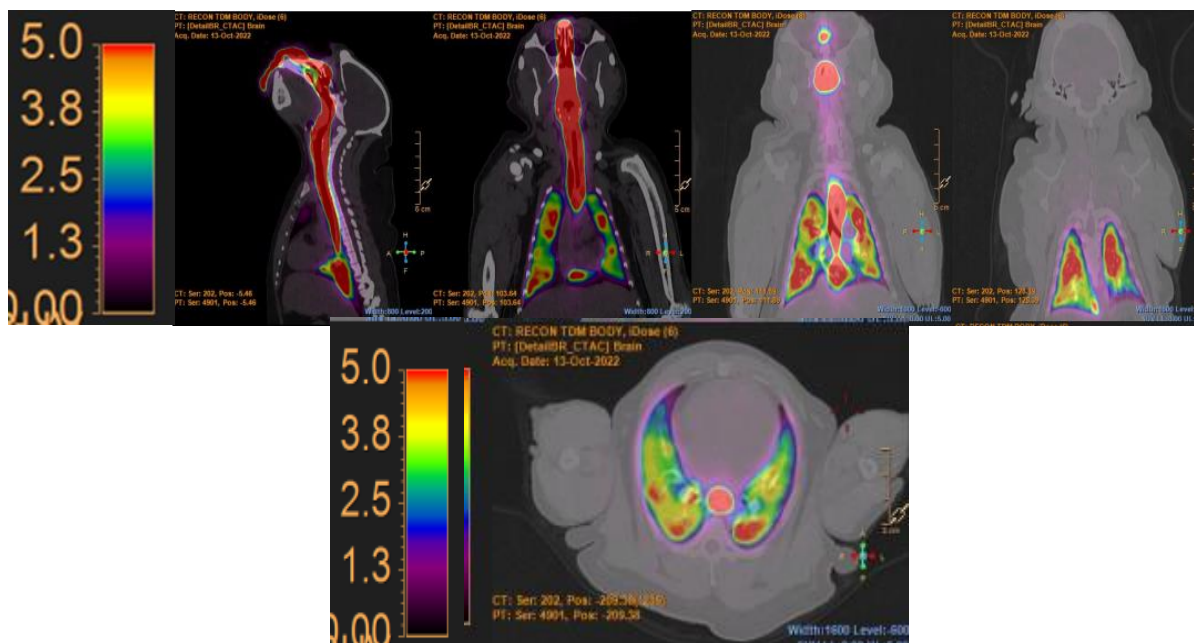


Figure 78 : Exemple d'images (TEP/TDM) de dépôts d'aérosols (environ 40 MBq de $[^{18}\text{F}]$ -FDG), dans les voies respiratoires, nébulisés à l'aide du prototype de nébulisation à tamis vibrant de type T chez le macaque cynomolgus. Les résultats de TEP/TDM sont exprimés en SUV.

Les macaques cynomolgus anesthésiés en respiration spontanée ont été exposés par inhalation pour valider la procédure et le ciblage des voies respiratoires totales. Qualitativement, les images du prototype T démontrent un meilleur dépôt des aérosols dans les VAI en comparaison du prototype Y. Elles semblent confirmer les conclusions précédentes observées avec la technique de scintigraphie.

- **Résultats quantitatifs**

Le pourcentage des dépôts des aérosols dans les voies respiratoires est estimé à partir des images de dépôts de TEP/TDM. A l'aide de différents calculs tenant compte de la différence entre la dose chargée dans le nébuliseur, et la dose réellement administrée (estimée en pourcentage) dans les voies respiratoires, du temps d'administration de l'aérosol et de la décroissance radioactive du ^{18}F . Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Résultats de la quantification des dépôts des aérosols dans les voies aériennes du macaque à partir des prototypes Y (prototype 2) et des prototypes T (prototype 3).

Animal	% radioactivité déposée	% total VAS	% total poumons	% de dépôt sur la face (lèvres)
Prototype à tamis en Y (2)				
CDI030	31,1 %	76,6 %	23,4 %	4,8 %
1MM15	35,1 %	62,6 %	36,0 %	2,2 %
KW	36,2 %	76,5 %	23,5 %	2,9 %
Prototype à tamis en T (3)				
CDI030	50,8 %	72,0 %	28,0 %	0,6 %
1MM15	47,1 %	59,5 %	40,5 %	0,3 %
KW	41,4%	64,9%	35,1%	0,2%

Les résultats du tableau démontrent clairement une diminution de dépôt de l'aérosol sur la face de l'animal avec le prototype T, en comparaison au prototype Y, facilitant ainsi sa manipulation lors de tests d'aérosolisation. De plus, les résultats confirment que le pourcentage total d'aérosols déposé dans les poumons d'un même macaque est plus élevé avec le prototype T qu'avec le Y (Figure 79).

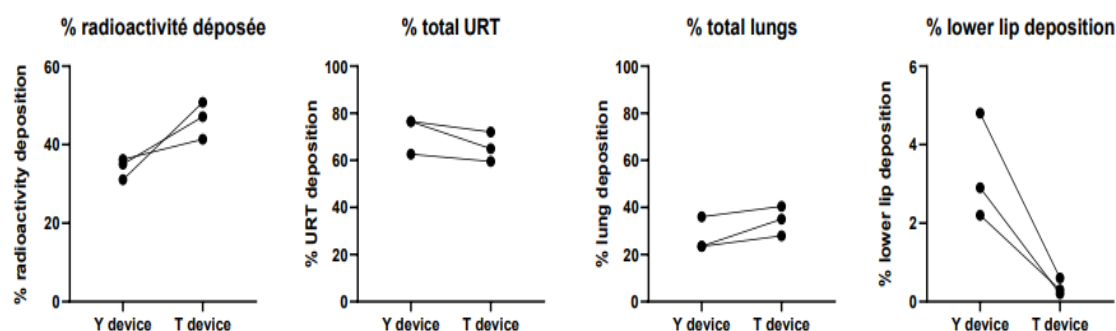


Figure 79 : Courbes comparatives de la quantification des dépôts d'aérosols entre les prototypes T et Y.

III.4.4.3 Conclusions sur les résultats de suivi par imagerie et de dépôts d'aérosols chez le macaque à partir des trois prototypes développés :

- Les résultats en TEP-TDM confirment les résultats obtenus en gamma caméra
- L'aérosol est déposé dans l'ensemble des voies respiratoires en moins de 10min,
- Il existe toujours une quantité plus importante d'aérosol déposée dans les VAS en comparaison des VAI,

- Le rendement de nébulisation est amélioré en comparaison des nébuliseurs pneumatiques,
- Il y a eu une plus grande quantité de radioactivité nébulisée en utilisant le prototype T pour tous les animaux,
- La distribution entre les voies respiratoires supérieures et inférieures est similaire, mais le dépôt dans les voies respiratoires inférieures est légèrement plus élevé avec le T,
- Il y a également moins de perte de particules sur le pelage de la face avec le T, mais cela doit être reconfirmé car le masque était toujours sur le visage de l'animal avec le Y lors des acquisitions.

Chapitre IV: Administration par inhalation de spores de *Bacillus atrophaeus* radiotracées et d'anticorps thérapeutiques chez le macaque cynomolgus

IV.1 Contexte et objectifs

Dans le chapitre précédent, deux prototypes d'inhalation d'aérosols toxiques ou thérapeutiques, l'un fonctionnant avec un nébuliseur à jet d'air et l'autre fonctionnant avec un nébuliseur à tamis, ont été développés et évalués en termes de performance de dépôt dans les voies respiratoires avec des particules non biologiques.

Cependant, dans le contexte d'une menace bioterroriste avec des bioaérosols d'agents infectieux, il est essentiel de prendre en compte la partie "vivante » dans la gouttelette d'aérosol, car les pathogènes peuvent perdre leur viabilité lorsqu'ils sont soumis à des conditions environnementales défavorables [171]. Dans la présente étude, les prototypes à nébuliseur à tamis (Y et T) présentant les meilleurs résultats en termes de dépôts dans les voies aériennes chez le macaque, ont été utilisés pour la première fois avec un aérosol biologique. L'agent pathogène ciblé initialement est constitué de spores de *Bacillus anthracis*, agent de la maladie du charbon ou anthrax (anglicisme). Plusieurs modèles animaux, tels que les rongeurs, les lapins, les porcs et surtout le macaque, ont été utilisés pour étudier, par inhalation, la pathogénèse et la toxicité de *Bacillus anthracis* [10].

Toutefois, pour répondre entre autres aux exigences du FDA Rule, le modèle macaque, Primate Non Humain (PNH), reste l'un des plus pertinents car il permet une transposition aisée des résultats obtenus chez le macaque vers l'Homme compte tenu des fortes analogies entre les deux espèces.

Dans ce chapitre, l'objectif est d'évaluer l'application opérationnelle des prototypes d'aérosols développés avec des spores non pathogènes, *Bacillus atrophaeus*, et une thérapeutique inhalée : un anticorps.

Il est important de développer un modèle d'administration de spores ou de thérapeutique chez les singes. En effet, en recherche biomédicale sur les maladies infectieuses transmises par voie inhalée (exemple tuberculose, COVID etc), les spores sont une forme dormante de résistances à certains agents pathogènes tels que les bactéries (*Bacillus anthracis*) ou les spores aéroportées de champignons (exemple : *Aspergillus fumigatus*, ou *Candida albicans*), elles ont un rôle clé dans la transmission et le développement de pathologies.

En développant un modèle d'administration de spores inhalée chez le macaque on peut étudier le dépôt et la biodistribution des spores chez le singe pour comprendre la façon dont ces spores infecteraient l'Homme afin de mieux les combattre.

La compréhension du dépôt des spores dans l'organisme d'un hôte permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de certaines maladies infectieuses, d'étudier les interactions entre une spore inhalée ou tout autre agent biologique inhalée et les tissus de l'organisme, la colonisation et la dissémination, les éventuelles réponses immunitaires spécifiques induites par l'infection et le suivi et la quantification des dépôts par imagerie comme l'imagerie par TEP/TDM.

L'ensemble de ces informations peuvent contribuer à développer des stratégies innovantes de prévention, de développement de contre-mesures médicales ou de traitements des pathologies.

Une première partie détaille le bacille du charbon et le risque bioterroriste par voie aéroportée.

Les résultats obtenus jouiront d'un haut niveau de confiance pour développer un modèle préclinique PNH, prérequis à l'évaluation de l'efficacité de contre-mesures médicales administrées ou pas par voie inhalée.

IV.2 Introduction

IV.2.1 Bacille du charbon et risque bioterroriste

Comme détaillé dans la revue de la littérature (Cf. Chapitre 1, revue de la littérature), *Bacillus anthracis* ou bacille du charbon, est un pathogène létal pour les humains et les animaux, avec une DL₅₀ variant en fonction de la taille de l'animal. Ainsi, la DL₅₀ exprimée en colonie forming unit, CFU [308], de spores de 1 à 3 µm de *Bacillus anthracis* administrées par inhalation chez le cochon d'inde et les rongeurs, est respectivement de 0,23 - 3,4x 10⁵ et 2,43x10³. Pour des spores de taille 4,0 à 6,5µm la DL₅₀ est de 2,21 x10⁵ pour le cochon d'inde et non déterminé chez les rongeurs [10].

Chez le macaque rhésus la DL₅₀ (voie inhalée) de spores de *Bacillus anthracis* (souche Ames) est d'environ 6,18 x10⁴ CFU [308].

Le bacille du charbon fait partie des agents à fort potentiel d'utilisation comme arme biologique : elle est en effet classée comme agent biologique de « classe A » dans la classification du CDC (Center for Disease Control and Prevention), comportant les agents biologiques les plus dangereux. Cette classification est basée sur le pouvoir pathogène, la virulence et le niveau de menace que représente l'agent biologique. *B. anthracis* est en effet une bactérie dont la production est simple et peu coûteuse ; sa dissémination est aisée (*Bacillus anthracis* a été utilisée en 2001 dans des enveloppes contaminées par des spores, envoyées aux sénateurs américains) et elle peut subsister plusieurs dizaines d'années dans l'environnement sous forme de spores. Enfin, leur inactivation est très difficile. Son aérosolisation est possible, son transport et son stockage sont aisés. Le taux de mortalité en cas d'infection par inhalation est élevé. Ainsi, l'OMS estime que 50 kg de spores du charbon épandues par avion sur une zone urbaine de 5 millions d'habitants pourraient contaminer 250 000 personnes et entraîner la mort de 100 000 personnes.

IV.2.2 *Bacillus anthracis* et la maladie du charbon

Bacillus anthracis est l'agent étiologique de la maladie du charbon chez l'Homme (anthrax en anglais). Il s'agit d'une anthroponose, qui peut se contracter suite à des contacts avec des animaux infectés par la bactérie ou *via* le contact avec des produits contaminés d'origine animale. Initialement, il s'agit principalement d'une pathologie qui affecte les herbivores (les moutons en particulier), même si d'autres mammifères et certains oiseaux peuvent la contracter.

IV.2.2.1 Voies de transmission et -formes cliniques de la maladie du charbon chez l'Homme

L'anthrax peut provoquer une pathologie humaine par quatre voies : cutanée la plus fréquente (90-95 % des cas), voie injectable, voie gastro-intestinale, ou par inhalation (voie pulmonaire).

Du point de vue symptomatique les caractéristiques de chaque forme sont résumées ci-après :

- **Forme cutanée** : elle se manifeste après une incubation de 3 à 5 jours. Elle commence par des lésions cutanées, qui évoluent vers un œdème envahissant les tissus voisins et laisse une escarre noirâtre progressant de manière centrifuge. Dans 90 % des cas, la guérison est spontanée. Toutefois, dans les formes sévères, une septicémie peut survenir, entraînant la mort dans 20 % des cas en l'absence de traitement. Avec un traitement précoce par antibiothérapie la létalité est inférieure à 1 %.
- **Par injection** : Cette forme est rare. Elle a été identifiée chez les consommateurs d'héroïne. Les symptômes sont différents de l'anthrax cutanée. Notamment dans l'anthrax administré par injection on observe des œdèmes massifs sous cutanés.
- **La forme intestinale ou charbon d'ingestion** : il s'agit d'une forme rare qui résulte de la consommation de viande contaminée. Elle commence par une gastro-entérite aiguë qui peut rapidement évoluer vers une bactériémie avec diarrhée sanglante. Le décès peut survenir en quelques heures, avec une létalité estimée entre 25 et 60 %.
- **La forme pulmonaire** (aussi appelée maladie des cardes de laine) est la plus fréquente et fait suite à l'inhalation de spores présentes dans l'air ambiant.

Les spores de *Bacillus anthracis* passent dans les alvéoles où elles sont phagocytées par les macrophages et les cellules dendritiques, puis germent et se multiplient dans les ganglions. La bactériémie résultante entraîne la production de toxines dans le sang, responsables de la létalité de la maladie. Cette forme d'infection commence par un syndrome pseudo-grippal qui peut durer plusieurs jours. Elle se poursuit par une très forte et rapide défaillance respiratoire associée à une bactériémie. En l'absence d'un traitement antibiotique très précoce, la létalité varie entre 80 et 100 %, avec un délai moyen de 3 jours entre l'apparition des symptômes et le décès. L'administration d'anthrax par voie inhalée est associée à un taux élevé de mortalité, (plus de 86%), en l'absence de traitement [351]. L'inhalation de spores d'anthrax est décrite chez le PNH et par extrapolation chez l'Homme est décrite dans la revue de littérature.

IV.2.2.2 Morphologie et facteurs de virulence de *Bacillus anthracis*

IV.2.2.2.1 Morphologie

Bacillus anthracis est une bactérie immobile Gram positif, en forme de bâtonnet, aero-anaérobie facultative et formant des spores ou *exosporium* (Cf. Figure 80). *Bacillus anthracis* appartient au groupe *Bacillus cereus*, et se présente soit sous la forme de spores résistantes et infectieuses, soit sous la forme d'un bacille (forme végétative) qui permet la multiplication de la bactérie. Une nouvelle phase dans le cycle de la bactérie a été décrit, la phase necrotrophique, juste avant la phase de sporulation, qui permet à la bactérie de se nourrir du cadavre [352].

Bacillus anthracis, avec *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus*, sont les seules souches bactériennes de spores à posséder comme couche externe un *exosporium*, qui a un rôle très important dans l'interaction du pathogène avec son environnement et l'hôte [353].

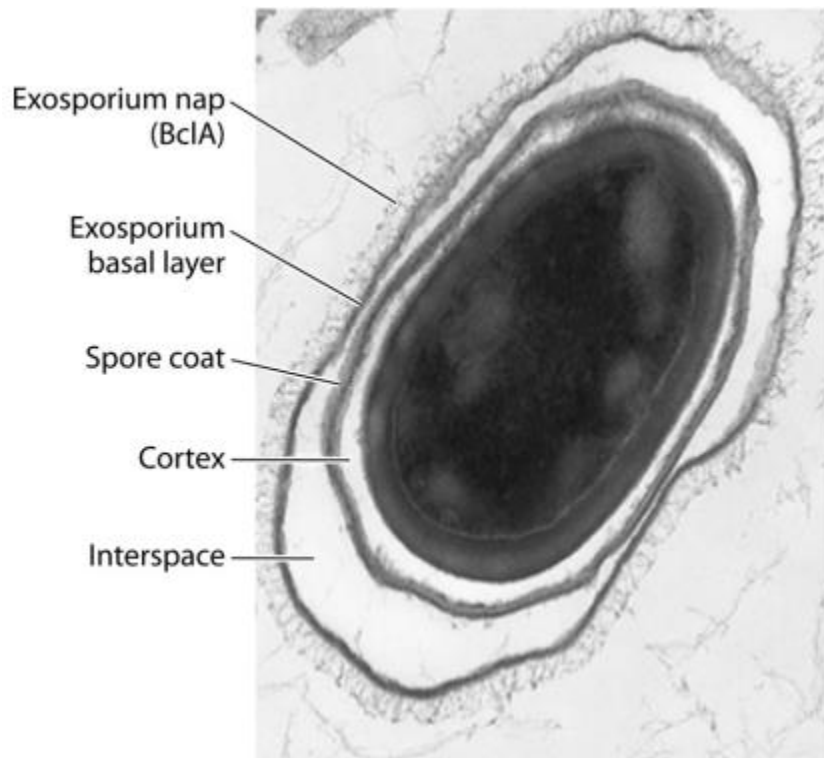


Figure 80 : Structure en multicouche de la spore de *B. anthracis* (*B.a*) en Microscopie Electronique à Transmission d'après Stewart et al., 2015 [353].

Les spores sont hautement résistantes à diverses conditions naturelles : sécheresse, rayonnements, températures extrêmes [354]. Elles sont des formes quiescentes de résistance dans l'environnement qui sont capables de survivre plusieurs dizaines d'années dans le sol, cette forme permet l'infection de l'hôte, dans lequel a lieu un processus de germination puis elles forment des bacilles sous forme végétative présente chez l'hôte [355].

La sporulation est engendrée par différentes conditions, comme les conditions environnementales ou les conditions de carence nutritionnelle. Le cycle de formation d'une spore de *Bacillus* est décrit dans la figure 81 qui suit.

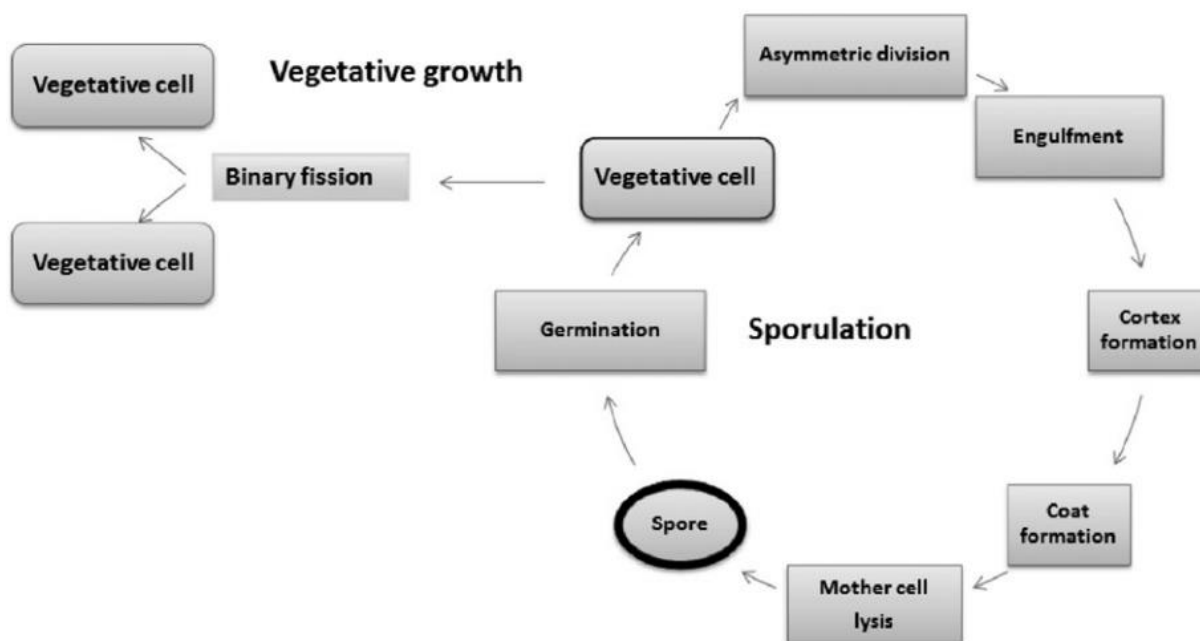


Figure 81 : Schéma des étapes du cycle cellulaire d'un bacille : sporulation, germination et croissance végétative, d'après Sella et al., 2015 [356].

IV.2.2.2.2 Facteurs de virulence

La mortalité causée par *Bacillus anthracis* est principalement due à trois facteurs de virulence bien caractérisés : le facteur létal (LF), le facteur œdémateux (EF) et l'antigène protecteur (PA) [357]. LF et EF interagissent séparément avec PA pour former deux toxines interconnectées : la toxine létale (LT) est une combinaison de PA et LF, et la toxine œdémateuse (ET) est une combinaison de PA et EF [358].

IV.2.2.3 Prévention et Traitement

En dépit de l'immunité non-durable et de la protection non-immédiate qu'elle confère, la vaccination est utilisée comme thérapie prophylactique efficace contre l'anthrax inhalé, à la fois chez les humains et les animaux [359]. Elle est recommandée pour une catégorie de la population exposée au risque d'anthrax (les militaires, certains personnels de laboratoire, certains vétérinaires), dans certains pays comme les Etats-Unis ou l'Angleterre. Il s'agit par exemple du vaccin humain formulé dans les années 50 par l'Angleterre (UK Anthrax vaccine) [360] et formulé dans les années 70 par les américains AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed), [359]. La formulation est axée sur la production d'antigène protecteur (PA) à partir de la souche Sterne de *Bacillus anthracis*. L'anthrax peut aussi être traité par antibiothérapie par les fluoroquinolones ou des cyclines. Le vaccin n'est pas recommandé en France, le seul traitement est l'antibiotique cependant la France dispose d'un vaccin [361].

L'utilisation de *Bacillus anthracis* sous forme aérosolisée chez le macaque nécessite des autorisations réglementaires longues et complexes à obtenir auprès de l'ANSM. N'ayant pas obtenus ces autorisations dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé une sous-espèce non pathogène de *Bacillus anthracis* : la bactérie sporulante *Bacillus atrophaeus*, qui est un pathogène de niveau 1 ne présentant aucun danger ni pour l'Homme, ni pour l'environnement.

IV.2.3 *Bacillus atrophaeus*

En microscopie électronique, *Bacillus atrophaeus* a une morphologie longitudinale en plusieurs couches avec une membrane externe (outer membrane) et interne (core) décrite dans la figure 82.

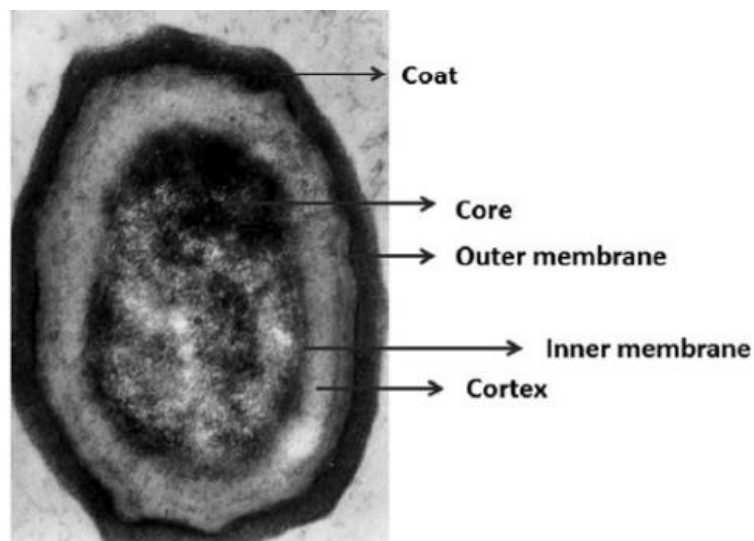


Figure 82 : Photo en microscopie électronique à transmission d'une spore de *Bacillus atrophaeus* d'après Sella et al., 2014 [356].

Bacillus atrophaeus a le même cycle de vie qu'une spore de *Bacillus anthracis* comme illustrée dans la figure 83.

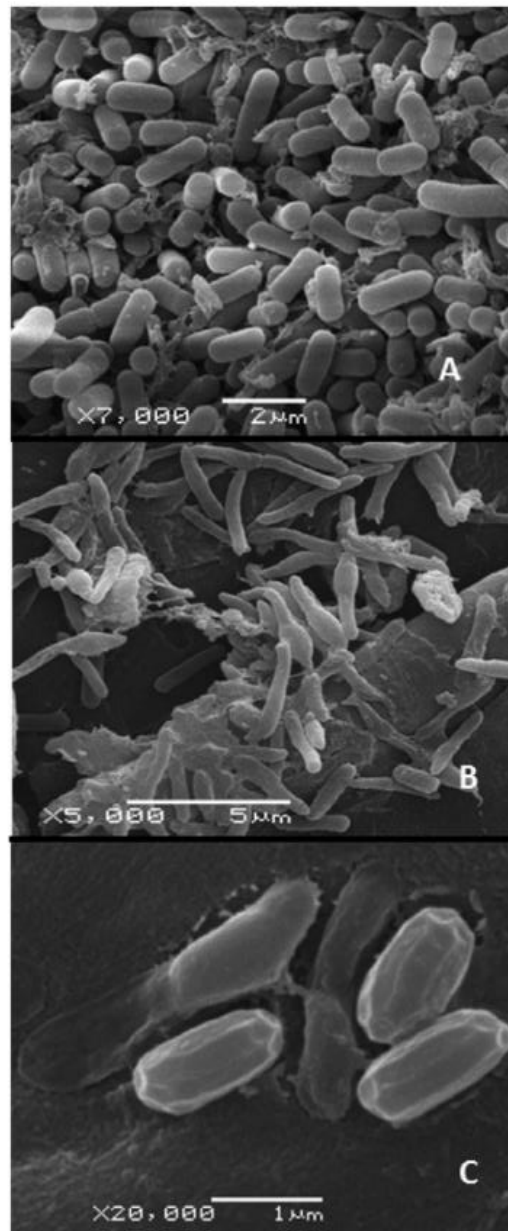


Figure 83 : Microscopie électronique à balayage d'une spore de *B. atrophaeus*. (A)= Cellules végétatives, (B) =cellules végétatives et sporulation et (C) = spores et libération de la spore mature de son compartiment intracellulaire, d'après Strom et al., 2002 [359].

Les spores de *Bacillus atrophaeus* sont classées par Légifrance comme des agents biologiques pathogènes de classe 1 [362] ne produisant pas de toxines contrairement à *Bacillus anthracis* (classe 3). Elles ne sont donc pas pathogènes, et ont donc été utilisées afin de valider la preuve de concept du suivi radiologique (« radiotracking ») dans le but de calculer la dose inhalée.

IV.3 Caractérisation du dispositif d'administration d'aérosols pour des spores liquides de *Bacillus atrophaeus*

L'objectif est ici de vérifier que la biocollection et les systèmes d'aérosolisation n'altèrent pas les spores. La viabilité des spores est comparée avant et après aérosolisation par les deux prototypes précédemment décrits : un nébuliseur à tamis vibrant Aérolog solo® et un nébuliseur pneumatique NL 9m® fonctionnant avec de l'air humide. Les spores sont par la suite biocollectées, par un Impenger, le Biosampler SKC® (*BioSampler de 5 mL, SKC Inc., Eighty Four, PA, USA*) (Cf. généralités de la thèse) contenant un liquide de biocollection adapté, et ce pour en étudier la survie. Les expériences ont été réalisées au sein de l'équipe de bactériologie de l'IRBA à Brétigny-sur-Orge. Chaque nébuliseur utilisé était à usage unique. Le BioSampler en verre est quant à lui autoclavé pendant un cycle de 15 à 20 minutes à 121°C avant chaque expérimentation. Préalablement à l'autoclavage, après chaque essai, le BioSampler est trempé dans un bain d'eau chaude avec du détergent.

IV.3.1 Sporulation de *Bacillus atrophaeus*

Une suspension de spores liquides a été préparée pour cette étude. Elle provient de la collection de souches de l'équipe de bactériologie de l'IRBA de Brétigny-sur-Orge. A partir d'une culture bactérienne de *Bacillus atrophaeus* ensemencée sur gélose coulée d'un milieu enrichi Brain Heart Infusion (BHI) Agar, une suspension en milieu liquide BHI est préparée. Les cellules végétatives issues de la colonie de cette souche sont mises en sporulation dans un milieu de sporulation 2 x SG (Schaeffer's-Glucose) [363] pour environ une semaine. La sporulation est arrêtée quand plus de 90% des cellules ont sporulé (cellules réfringentes au microscope). A la fin de la sporulation, la suspension est centrifugée en tube Falcon® de 50 ml et les spores sont lavées dans 40 mL d'eau. Cette étape de lavage est répétée deux fois de plus dans les 7 jours post-arrêt de la sporulation afin d'éliminer les cellules végétatives restantes. Les spores sont stockées à +4°C pendant un mois avant utilisation. La suspension finale de spores, (20 mL) à une concentration de 10^{10} , (Figure 84) a été diluée au centième (0,5 mL dans 50 mL) pour la suite des expériences, soit une concentration finale de 10^8 CFU.



Figure 84 : Aspect visuel d'une suspension de spores liquides de *Bacillus atrophaeus*.

IV.3.2 Mesure de la viabilité des spores nébulisées : choix du liquide de biocollection des aérosols de spores pour étudier leur agrégation et leur viabilité par le test de survie en Tween20 (0,01%)

L'objectif ici est de réaliser un test de survie des spores dans un liquide de biocollection qui est inséré dans la cuve du Biosampler SKC® avant la Biocollection. Le choix s'est porté sur du Tween 20 [364] et du NaCl 0,9%. Dans ce but, nous avons vérifié que l'ajout de Tween 20 à une concentration de 0,01% (w/v) et d'eau physiologique (NaCl 0,9%), ne modifiait pas l'intégrité de la spore.

Pour ce faire, nous avons mis des spores de *Bacillus atrophaeus* à une concentration de 10^8 CFU/ml en contact avec du polysorbate 20, concentré à 0,01% (w/v) pendant 7 jours, avec un dénombrement et une prise de photo à J0 (après mise en contact), J1, J2, J3 et J7. A J7, un test de résistance à la chaleur a été réalisé en les incubant 30 min à 65°C. Ce test permet de vérifier que la mise en contact avec la molécule n'a pas déclenchée de germination au sein de la population de spores, menant à des cellules végétatives sensibles à la chaleur. L'expérimentation a été réalisée en 4 répliquas. L'objectif est de savoir si indirectement le tween déclenche une germination, menant une cellule végétative.

IV.3.3 Résultats

IV.3.3.1 Microscopie optique

Les images obtenues en microscopie optique ont montrés que de J1 à J4 les spores ne présentent pas de changement visible de l'intégrité de leur structure.

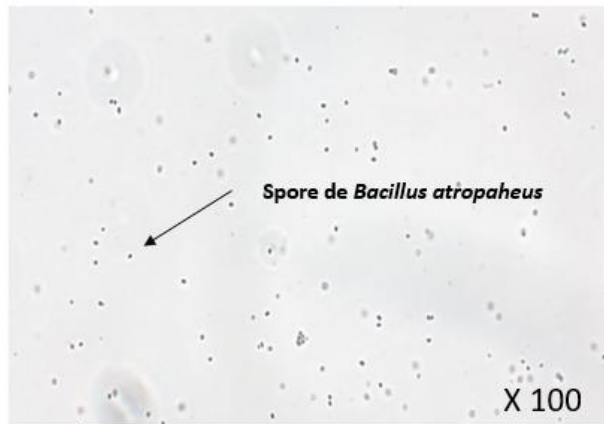


Figure 85 : Photo de microscopie optique de la souche bactérienne.

IV.3.3.2 Dénombrement des spores

Ci-dessous, le graphique (Figure 86) représentant les résultats obtenus.

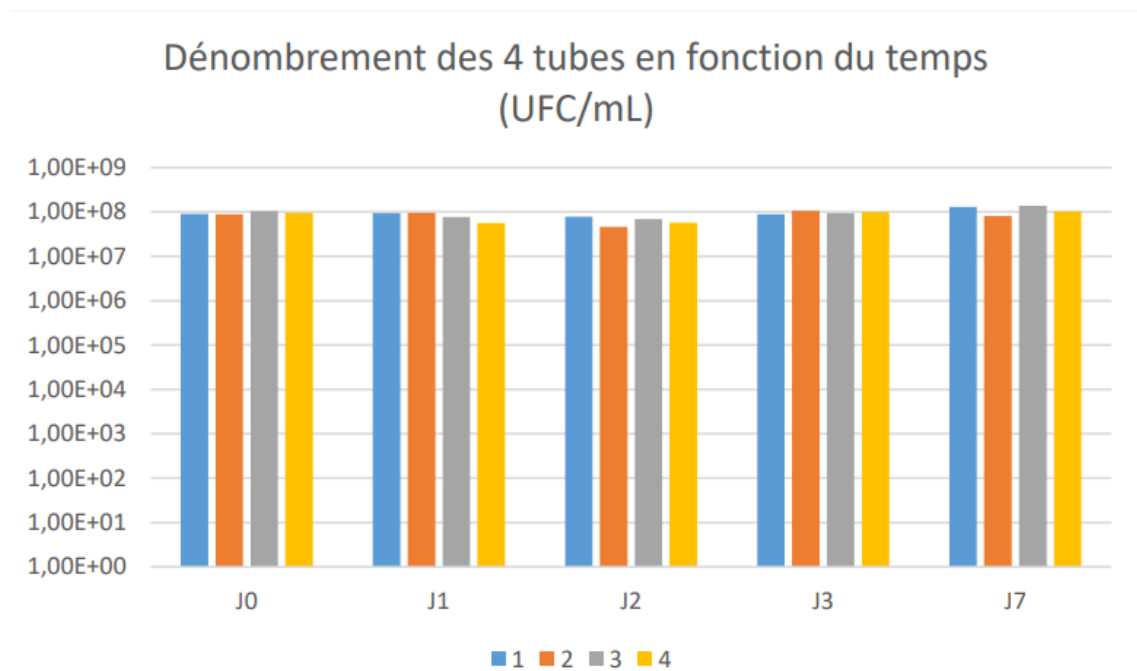


Figure 86 : Graphique du dénombrement des spores exprimées en CFU/ml dans les 4 tubes d'essais en fonction du temps d'analyse.

IV.3.3.3 Conclusion

La présence de polysorbate (Tween 20) n'altère pas les spores et n'influence pas leur survie, et ce jusqu'à J7. Le polysorbate sera donc utilisé comme liquide de biocollection des spores associé avec du NaCl 0,9% et de l'eau milliQ.

IV.4 Protocole d'aérosolisation et de biocollection des spores de *Bacillus atrophaeus* et étude de la viabilité des spores après nébulisation

IV.4.1 Essais à blanc (sans spores)

Des essais à blanc, sans spores de *Bacillus atrophaeus*, sont effectués pour valider d'une part l'évaporation liée au BioSampler et d'autre part la stérilité du liquide de biocollection et du nébuliseur après son autoclavage.

IV.4.1.1 Méthode pour la validation de l'évaporation liée au BioSampler SKC® et l'évaluation de la stérilité du liquide de Biocollection et du Nébuliseur

5 ml de liquide de biocollection sont introduits dans la cuve du Biosampler (Tween20-0,01% (w/v) + NaCl 0,9% + eau milliQ). Le nébuliseur à tamis et le pneumatique sont connectés l'un après l'autre sur le BioSampler. Ils sont rendus étanches par du Parafilm et maintenu au niveau de la partie supérieure du Biosampler à l'aide d'un pied de chimie.

Chaque nébuliseur est chargé dans son réservoir avec 1ml (nébuliseur à tamis) ou 8ml (nébuliseur à jet d'air) de liquide de biocollection. Chaque essai est réalisé 3 fois pour chaque type de nébuliseur.

Le Biosampler est connecté à une pompe d'aspiration générant un débit de 12,5 L/min mesuré par un débitmètre massique 4100 series (TSI INSTRUMENTS® LTD, Buckinghamshire, Royaume Uni). La nébulisation est lancée pour une durée de 10 minutes pour le nébuliseur Aerogen® fonctionnant à 20% de son débit maximal, et une durée de 15 minutes pour le nébuliseur à jet d'air fonctionnant à un débit de 6,5 L/min généré par un compresseur mobile (Figure 88). La biocollection est initiée en simultanée.

Après chaque essai, le liquide de biocollection est étalé à l'aide d'une oese en plastique stérile sur une gélose BHI. Les boîtes de Pétri pour chaque expérimentation avec chacun des nébuliseurs sont analysées à J+ 24H, J+48 H et J+ 72 H post-expérimentation (Figure 87).

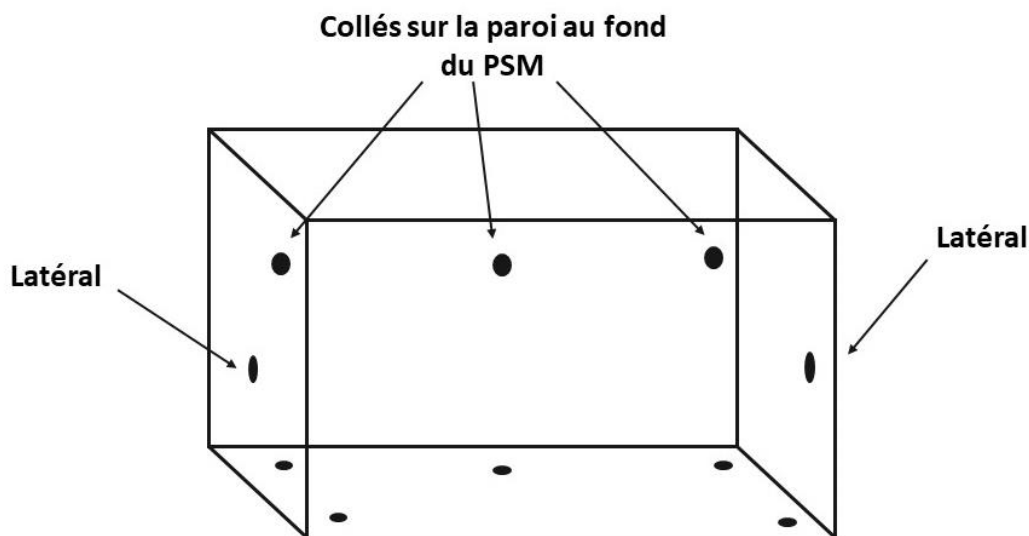


Figure 87 : Schéma de la position des boîtes de Pétri sous la hotte pour la mesure de la contamination environnementale.

Pour la mesure de l'évaporation du liquide du Biosampler SKC[®], des mesures de masses du nébuliseur et du biocollecteur avant et après nébulisation ont été réalisées pour le dispositif avec le nébuliseur à tamis et le nébuliseur à jet d'air. Nous avons réalisé pour chaque expérience (n=3) la pesée de la cuve du Biosampler avant aspiration et après aspiration. De plus, des boîtes de Pétri BHI ont été positionnées dans cette étape « à blanc » à différents endroits définis sous le PSM durant la nébulisation et la biocollection, comme témoin négatif. En effet, elles ont été positionnées pour montrer que le PSM n'était pas contaminé et que si, pour les autres expérimentations, des spores de *bacillus* poussaient, cela venait bien de la nébulisation et non du PSM.

IV.4.1.2 Résultats des essais à blanc de biocollection

La quantité de suspension de spores évaporée est similaire entre le nébuliseur à tamis (3,3mL) et le nébuliseur pneumatique (2,7 mL). Pour les boîtes de Pétri sous la hotte, aucune spore n'est observable dans les boîtes de Pétri après 24, 48 et 72 heures. Il en est de même pour le liquide de biocollection et pour les boîtes placées dans l'enceinte du PSM.

IV.4.1.3 Conclusion sur les essais à blanc de biocollection

Le liquide de biocollection s'évapore durant le processus de nébulisation et de biocollection. Le liquide de biocollection et le nébuliseur après le cycle d'autoclavage sont bien stériles.

IV.4.2 Nébulisation et biocollection avec les spores de *Bacillus atropheus* : matériels et méthodes

Au démarrage des pompes d'aspiration, le débit d'aspiration du Biosampler est mesuré au niveau de la partie incurvée d'entrée des aérosols. Il est fixé à 12,5ml/minute (la mesure est réalisée à l'aide du débitmètre TSI). 5 ml liquide de biocollection précédemment décrit (NaCl 0,9% plus Tween 20) sont introduits dans la cuve d'un BioSampler. Le Biosampler est pesé à vide avant la nébulisation, avant d'introduire le liquide de biocollection, après l'introduction du liquide de biocollection et après la biocollection afin d'estimer *in fine* le volume d'aérosol biocollecté.

Les nébuliseurs sont également pesés avant et après la biocollection et la nébulisation pour estimer ce qui est réellement nébulisé et le comparer avec le volume biocollecté.

En sortie de nébuliseur, un filtre PALL® est ajouté (Figures 88-A et 88-B) afin d'empêcher la sortie d'un quelconque pathogène. Des prélèvements d'ambiance sous la hotte (boîte de Pétri ouverte contenant du milieu BHI) ont lieu le long de l'expérimentation.

Le montage est adapté de telle sorte que l'air filtré qui sort reparte vers la hotte en cas de contamination résiduelles. Des tests de contamination sont réalisés sous la hotte *via* des boîtes de Pétri contenant du milieu BHI ouvertes tout au long de l'expérimentation.

Chaque nébuliseur est connecté étanchement au BioSampler comme décrit précédemment. Les nébuliseurs à tamis (10 minutes de nébulisation et à jet d'air (15 minutes de nébulisation à un débit de 6,5 L/ minutes) sont respectivement chargés dans leur cuve par 1ml et 8ml de suspension de spores de *Bacillus atropheus* à 10^8 CFU/mL. Chaque essai est réalisé 3 fois pour chaque type de nébuliseur.

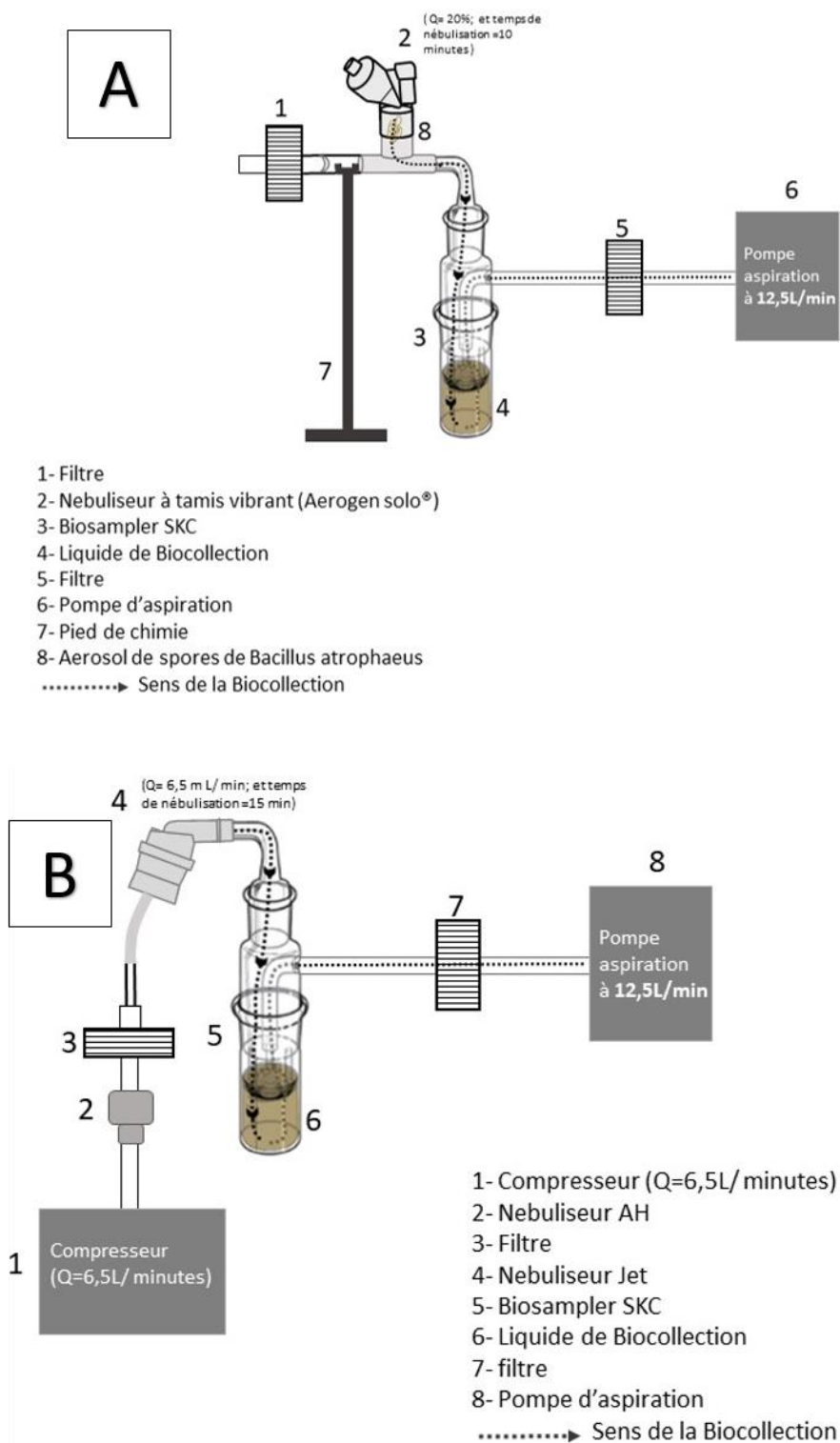


Figure 88 : Comparaison du montage expérimental *in vitro* pour la biocollection de spores de *Bacillus atrophaeus* à l'aide d'un nébuliseur à tamis (A) et un nébuliseur pneumatique fonctionnant avec un jet d'air humide (B).

Le dispositif expérimental est mis en place pour étudier le processus de nébulisation et permettre l'évaluation de la nébulisation. L'aérosol est collecté par un BioSampler®, qui est connecté à une pompe d'aspiration à vide (points 4 et 6 sur la figure 88-A et 88-B). Le BioSampler® collecte délicatement les bioéchantillons de spores liquides de *Bacillus atrophaeus* dans le flux d'air du vortex liquide de 5 ml de solution de bicollection, en suivant le flux d'air de la dépression à - 0,5 Bar. Le débit d'aspiration a été réglé à 12,5 L/min pour obtenir une dépression de -0,5 Bar, comme recommandé par le fabricant. Un filtre de protection (point 7, figure 88-B) est interposé entre le BioSampler® et la pompe d'aspiration. Après la collecte d'aérosols, les échantillons ont été analysés pour dénombrer la viabilité des spores en utilisant une méthode de superposition de gélose souple par du milieu BHI.

A l'arrêt de la nébulisation le contenu du BioSampler est pesé puis vortexé pour éviter l'agrégation des bactéries. Une dilution en cascade de la suspension initiale introduite est par la suite réalisée respectivement de 10^{-4} jusqu'à 10^{-6} . Puis 100µL sont prélevés du volume de chaque dilution pour êtreensemencés sur des boites de Pétri (2 boites par dilution) contenant 12 ml de milieu enrichi BHI en surfusion. Les boites sont placées dans une étuve à 30°C et le dénombrement à l'oeil nu est réalisé à 24h, 48h puis à 72h après l'expérimentation.

Au-delà, les bactéries se superposent et le dénombrement devient difficile voire impossible. Le calcul des spores dénombrées sur chacune des boites de Pétri à 72 h, prend en compte la quantité réellement nébulisée et réellement biocollectée à partir des poids respectifs précédemment décrits.

IV.4.2.1 Résultats des prélèvements d'ambiance sous la hotte

La figure 89 qui suit, démontre qu'il n'y a pas de pousse de colonies bactériennes. On a donc une absence de contamination du PSM.

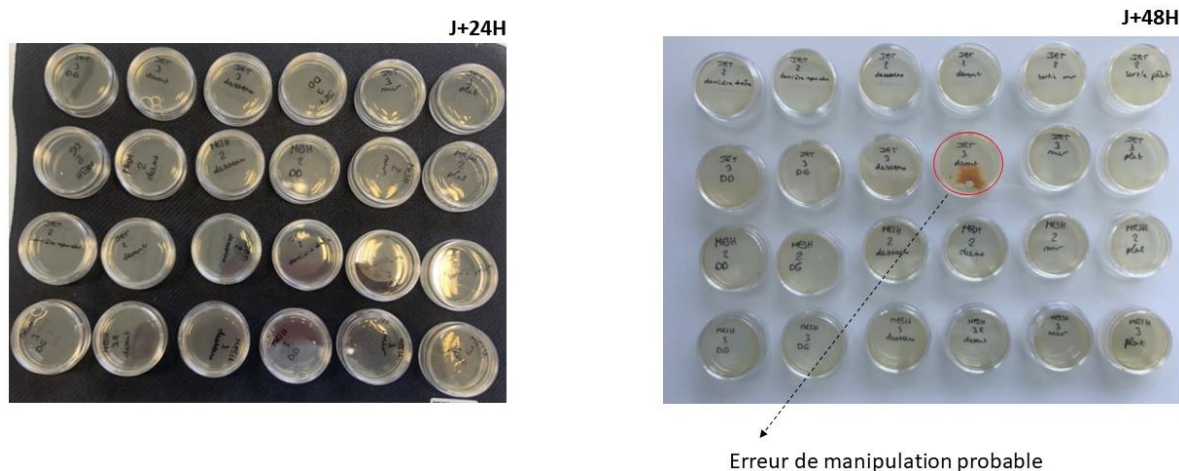


Figure 89 : Observation des boites de Pétri après les mesures d'ambiance sous la hotte à J+24h et J+48h. La Boite encerclée en rouge témoigne d'une erreur de manipulation.

IV.4.2.2 Résultats du dénombrement de la suspension de *Bacillus* prélevée du Biosampler

On observe à l'œil nu des colonies bactériennes oranges et rondes aux bords réguliers sur des pousses de 24h puis des bords irréguliers après 24h (Figure 90), un peu en forme de nuage. La forme irrégulière et large des colonies est typique du genre *Bacillus*, et la pigmentation orange est typique de *Bacillus atrophaeus*.

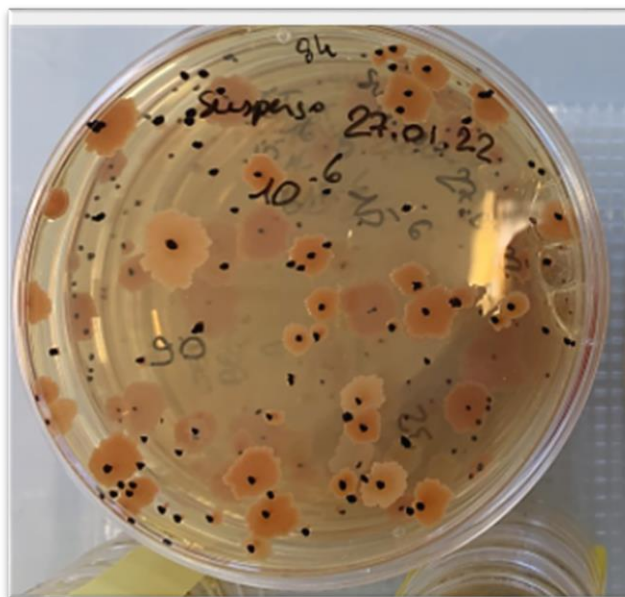


Figure 90 : Exemple de dénombrement (pointillés noirs) de spores de *Bacillus atrophaeus* après nébulisation et biocollection au BioSampler, J+72 h.

Les calculs de concentrations après nébulisation prennent en compte les volumes d'aérosol biocollectés pour corriger la concentration mesurée. Les résultats des calculs (figure 91, n=3) montrent la concentration avant (barres en noires) et après (barres hachurées en gris) la nébulisation et la biocollection. Avec le nébuliseur à jet d'air, on observe une légère diminution de la viabilité non statiquement significative par rapport au nébuliser à tamis. On peut voir qu'il n'y a pas de différence avant et après nébulisation en terme de viabilité des spores nébulisées ni avec le nébuliseur à tamis, ni avec le nébuliseur à jet d'air.

Les résultats obtenus, de viabilité des agents biologiques sont meilleurs avec un nébuliseur à tamis en comparaison au nébuliseur pneumatique, corroborant les résultats de viabilité de bactériophages obtenus dans l'étude de Le Guellec *et al.*, 2023 [365].

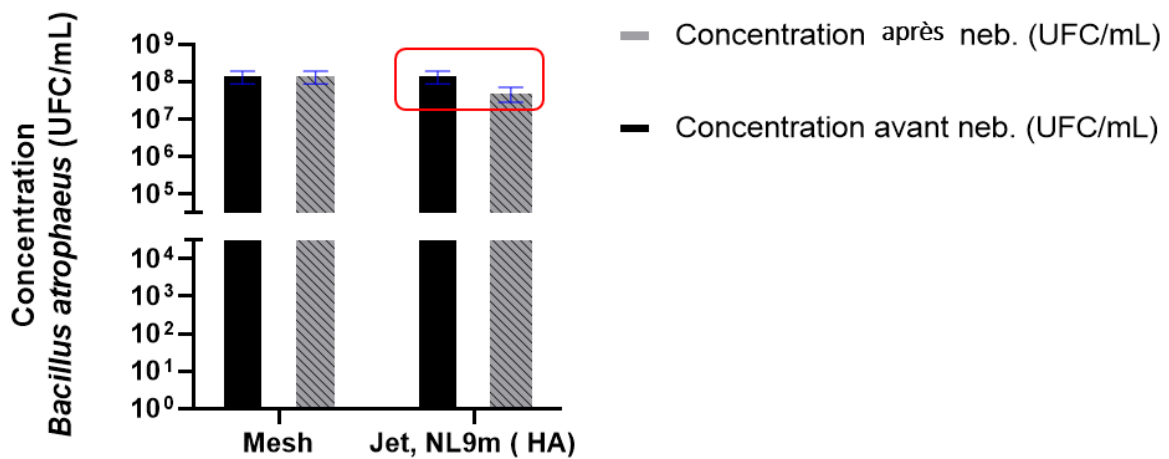


Figure 91 : Concentration de *Bacillus atrophaeus* avant et après aérosolisation (n= 3) pour chaque nébuliseur.

IV.4.3 Conclusion du protocole d'aérosolisation et de biocollection de spores de *Bacillus atrophaeus*

Le nébuliseur jet (nébuliseur pneumatique) couplé à l'air humide (HA) entraîne une très légère baisse de la viabilité des spores bactériennes (< 1log) (Figure 91). La viabilité n'ayant pas diminué d'un log, on considère que l'effet de la nébulisation sur les spores bactériennes est négligeable. Cependant nous avons retenu le nébuliseur à tamis (nébuliseur mesh) car il n'y a aucune modification de la concentration des spores avant et après la nébulisation et il est plus pratique et plus facile d'utilisation.

Les résultats observés de nébulisation des agents infectieux avec le nébuliseur à tamis en comparaison au nébuliseur pneumatique sont en accord avec la littérature qui décrit les nébuliseurs à tamis vibrant comme performants pour maintenir la viabilité infectieuse post-nébulisation (Cf. revue de la littérature).

IV.5 Mesure *in vitro* de la taille des aérosols de spores de *Bacillus atrophaeus* par traçage radioactif

L'objectif ici est de réaliser la métrologie des gouttelettes contenant les spores de *B. atrophaeus* mélangées à du ¹⁸F-FDG, afin de suivre, *in vivo*, chez le macaque, les dépôts de spores et également d'établir si le ¹⁸F-FDG associé aux spores est un traçeur radioactif pertinent utilisable dans ce type d'étude. Au vu des résultats précédents, les essais sont réalisés uniquement à l'aide du nébuliseur à tamis. La mesure de la taille des gouttelettes de ¹⁸F-FDG/spores a été réalisée à IDMIT, alors que le dénombrement des spores a été effectuée à l'IRBA. Dans ces cas, la radioactivité a

deux fonctions : quantifier et visualiser les dépôts et compter, à partir de la TEP-TDM, le nombre de spores de *B. atrophaeus* qui se sont déposées.

IV.5.1 Matériels et Méthodes

La métrologie est réalisée en utilisant un impacteur en cascade de type DLPI. Le nébuliseur à tamis vibrant est connecté aux différents étages du DLPI durant les 10 minutes de nébulisation. Le nébuliseur est chargé avec 1 ml de suspension bactérienne couplée à la radioactivité. Le DLPI est par la suite imagé par TEP/CT et la radioactivité déposée dans chacun des étages du DLPI est quantifiée. Pour les dénombrements effectués à l'IRBA, les différents étages de cet impacteur ont été rincés avec 10 mL de liquide de biocollection (solvant des spores) (NaCl 0,9% + Tween 20 (Polysorbate) à 0,01 % (w/v) + eau milliQ, QSP 1L) à IDMIT préalablement à leur envoi, le jour même, à l'IRBA, pour le dénombrement des spores bactériennes.

IV.5.2 Résultats

La comparaison du pourcentage d'aérosols de ^{18}F -FDG (histogrammes oranges) et d'aérosols de spores (histogrammes bleus) en fonction du diamètre aérodynamique (μm) des différents étages du DLPI (abscisse) est présentée sur la figure 92.

Les premiers étages du DLPI représentent l'impaction dans les voies aériennes supérieures (URT), les étages qui suivent à partir de $3,68 \mu\text{m}$ représentant les dépôts dans les voies aériennes inférieures (LRT). Les derniers étages représentent les particules exhalées ou diffusées.

Le MMAD des gouttelettes de ^{18}F -FDG est de $3,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$, une valeur similaire à celui des spores de *Bacillus atrophaeus* qui de $3,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$. On observe en abscisse que pour les tailles de $0,385$, $0,258$ et $0,607 \mu\text{m}$ il y a de la radioactivité présente mais pas de spores. Ceci s'explique par le fait qu'il n'y a pas de spores qui ont une taille inférieure au micromètre.

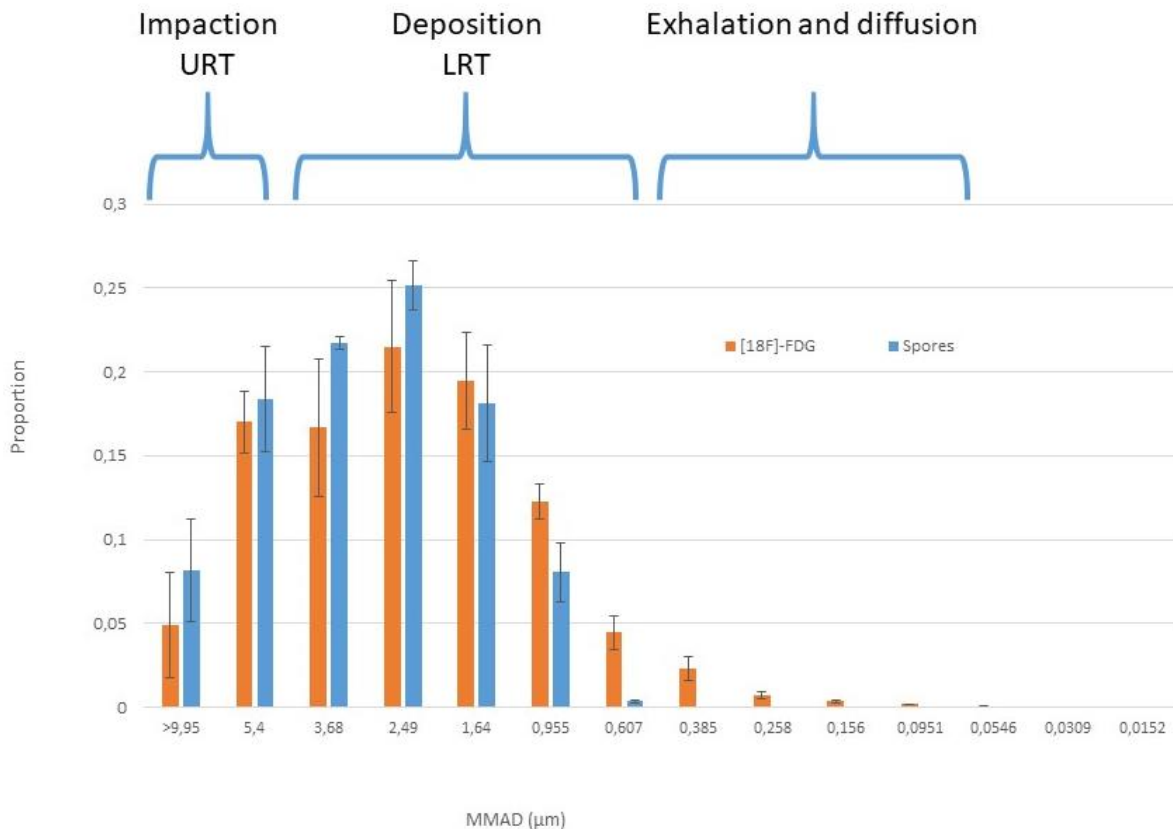


Figure 92 : Analyse de la corrélation du MMAD des gouttelettes d'aérosols de spores (histogrammes bleus) et du ^{18}F -FDG (histogrammes oranges).

IV.5.3 Conclusion sur la métrologie *in vitro* d'un aérosol de spore radiotracée au ^{18}F -FDG

En utilisant un impacteur en cascade Dekati[®] DLPI, nous avons confirmé que la distribution des particules (taille et concentration), après nébulisation par nébuliseur à tamis Aeroneb solo[®] (n = 3 mesures), de ces spores, est similaire à celle d'une solution de ^{18}F -FDG. Ce test de confirmation *in vitro*, avant les essais *in vivo*, justifie la possibilité d'utiliser ce traceur radioactif pour mesurer les doses d'agents biologiques déposées dans les différents compartiments respiratoires du macaque.

IV.6 Inhalation des spores de *Bacillus atrophaeus* radiomarquées chez le macaque

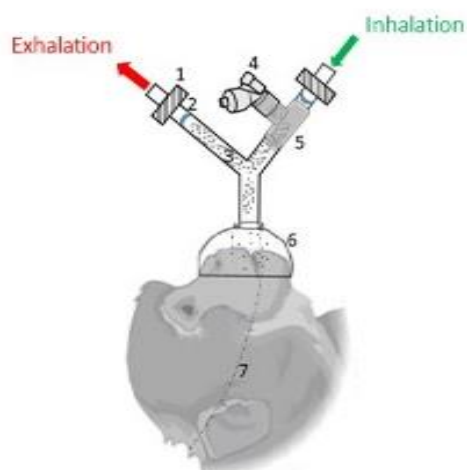
IV.6.1 Matériels et méthodes

Les spores utilisées pour les expériences de nébulisation ont été fournies par l'IRBA. Pour chaque macaque, 40 (MBq) de ^{18}F -FDG dilués dans 1mL de NaCl 0,9% stérile contenant 1×10^8 spores/mL de *Bacillus atrophaeus* seront introduits dans les

réservoirs des trois nébuliseurs à tamis Aerogen® utilisés dans cette étude (un nébuliseur par animal). Ces mêmes nébuliseurs ont été utilisés pour la caractérisation de l'impacteur en cascade.

IV.6.1.1 Nébuliseurs

La mesure du dépôts des aérosols de spores de *Bacillus atrophaeus* à l'aide du prototype Y connecté au nébuliseur à tamis sélectionné (n°4 sur la figure 93), a été réalisée chaque fois avec un nébuliseur de même type.



- 1- Filtre
- 2- Valve unidirectionnelle
- 3- Aérosols de spores de *Bacillus atrophaeus* couplés à ^{18}F FDG
- 4- Nébuliseur Aerogen Solo®
- 5- Embout de connexion du nébuliseur en forme de T
- 6- Masque étanche
- 7- Elastique de maintien du masque

Figure 93 : Dispositif expérimental administration d'aérosols de spores chez le macaque.

IV.6.1.2 Formulation de spores radioactives radiotraccées au 18 F-FDG à 40 MBq

Les spores de *Bacillus atrophaeus* ont été formulées à 10^8 spores/mL comme décrit plus haut. Par la suite, une quantité d'un mL de spore a été associée à 0,1 mL de ^{18}F -FDG pour obtenir une solution finale de 40 MBq. Cette solution est injectée dans le réservoir de chaque nébuliseur.

Tableau 14 : Résumé du protocole d'aérolisation de spores de ¹⁸F-FDG chez le macaque.

Nébuliseurs à tamis	VMD (µm)		%<5µm		%<2µm	
	NaCl 0,9%	Glucose 5%	NaCl 0,9%	Glucose 5%	NaCl 0,9%	Glucose 5%
Aeroneb 1	4,4	4,3	60	61	7	8
Aeroneb 2	4	4,1	66	64	9	9
Aeroneb 3	4,3	4,3	63	62	6	5
Moyenne	4,2	4,2	63,0	62,3	7,3	7,3

La taille des aérosols est exprimée ici en VMD (Volume Median Diameter). Les trois nébuliseurs à tamis utilisés dans cette expérience (Aeroneb® 1, 2, et 3) donnent une taille moyenne d'aérosols identique pour le solvant des spores (NaCl 0,9%) et pour le Glucose 5% du FDG. Le pourcentage de la taille des aérosols < 5 µm est en moyenne de 62,3% et celui des aérosols de taille < 2 µm est de 7,3 % en moyenne. La distribution est identique pour les trois nébuliseurs quelles que soient les conditions.

IV.6.1.3 Conception *in vivo* de l'étude :

- **Déclaration éthique**

Les études sur les animaux ont été menées dans l'installation d'IDMIT de niveau de biosécurité 3 à IDMIT, CEA, Fontenay-aux Roses, France. Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par la plateforme Hygiène et Sécurité du CEA.

Les procédures expérimentales sont conduites conformément aux directives européennes pour le soin et l'utilisation des animaux à des fins scientifiques (Directive 63-2010, "Journal Officiel des Communautés Européennes", L276, 22 septembre 2010). L'étude a été approuvée par le comité d'éthique local sous le numéro A20-066 et par l'administration française (APAFIS#29191-2021011811505374).

- **Macaques**

Quatre macaques adultes femelles (*Macacca fascicularis*) provenant d'élevages Mauriciens, pesant entre 5 et 5,8 kg ont été utilisés dans cette étude. Chacun des 4 macaques, reçoit la même dose de spores.

Une pesée et une mesure de la température sont effectuées après l'anesthésie. Les macaques sont hébergés en groupes dans les animaleries de l'IDMIT au CEA de Fontenay-aux-Roses, conformément à la législation européenne en vigueur (Directive 2010/63/UE). L'eau et la nourriture sont fournies aux animaux *ad libitum*. Les macaques respirent en ventilation spontanée durant les expérimentations.

IV.6.2 Mesures du dépôt pulmonaire *in vivo* chez le macaque

IV.6.2.1 Exposition par inhalation aux spores de *Bacillus anthrophaeus*

Toutes les expositions par aérosol ont été effectuées avec une souche bien caractérisée de spores de *Bacillus anthrophaeus*. Le nébuliseur à tamis vibrant (Aerogen Solo[®], Ireland) connecté au prototype en forme d'Y (prototype 2) a été utilisé pour générer une distribution contrôlée des spores de *Bacillus anthrophaeus* couplée à du ¹⁸F-FDG sous forme d'aérosol à partir d'une suspension liquide. La taille des particules délivrées avec ce nébuliseur a été préalablement caractérisée.

Afin de calculer la dose après l'exposition des voies respiratoires au nébuliseur, nous utilisons une activité de 40 MBq de ¹⁸F-FDG mélangée à une suspension finale de 1 mL. Le réservoir du nébuliseur à mailles est chargé avec 1 mL de mélange de spores à 10⁸ spores /mL auquel on a ajouté 0,1 mL de ¹⁸F-FDG. La charge de radioactivité du nébuliseur est mesurée dans le réservoir du nébuliseur en utilisant l'imagerie par TEP-TDM. Le générateur Aeroneb est réglé à 20 % de sa fréquence maximale, ce qui correspond à une durée d'exposition d'environ 8 à 10 minutes (durée pour laquelle l'ensemble du volume chargé dans le nébuliseur est nébulisé). La nébulisation est effectuée à l'intérieur d'une enceinte de type BSL-III.

Les opérateurs suivent la nébulisation derrière un écran de protection spécifique. L'animal respire par lui-même. Toutes les particules exhalées sont filtrées comme décrit ci-dessous. Le dépôt de radioactivité pendant l'expiration est évalué en mesurant l'activité sur ce filtre. Les macaques continuent à respirer pendant environ une minute supplémentaire avec le masque après la fin de la nébulisation.

Ce délai permet la purge complète de la chambre d'inhalation. Le masque facial est déconnecté sous enceinte BSL-III et placé dans un sac pour la mesure de la radioactivité. Des mesures de la radioactivité ambiante sont réalisées pour contrôler l'étanchéité du système.

IV.6.2.2 Configuration expérimentale pour la distribution d'aérosols en ventilation spontanée et imagerie par TEP-TDM

Les animaux sont anesthésiés avec 10 mg/kg de kétamine (Imalgene 1000[®], Merial, France) et 0, 1mg de médétomidine (Domitor[®] 1mg / mL, Vétoquinol, France) par injection intramusculaire. Après l'anesthésie, les macaques sont placés dans l'enceinte de sécurité biologique de classe II de la salle TEP en position de décubitus dorsal avec une inclinaison à 30° à l'aide d'un coussin adapté sur lequel repose une alèse. Un gel échographique aqueux (Polaris[®] EDM, France) est appliqué sur le masque afin d'éviter toute fuite entre la peau et le joint du masque et maintenir le maximum

d'étanchéité. Le masque est maintenu sur la tête du macaque à l'aide d'un élastique spécifique. Sa face est rasée au niveau du museau (Cf. paragraphe description des prototypes). Ainsi, aucune intervention humaine n'est nécessaire pendant la nébulisation. Une fois le macaque correctement installé (Figure 94), le prototype Y est installé sur sa face avec le nébuliseur à mailles connecté par un embout en forme de T (embout Aerogen solo[®], Irlande) sur la branche inspiratoire du prototype. Une surveillance (ECG, oxymétrie) est effectuée avant et après l'exposition.



Figure 94 : Aérosolisation de spores bactériennes chez le macaque à l'aide du prototype Y. Figure masquée pour des raisons d'éthique et de sensibilité.

- **Imagerie**

Immédiatement après la nébulisation, les macaques sont placés dans le tunnel de tomodensitométrie. La tomodensitométrie et deux TEP du corps entier seront réalisées, la première TEP durant 1 minute par étape et la seconde durant 5 minutes par étape. Un scanner est réalisé avant et après l'acquisition TEP. La face de l'animal a été nettoyée après l'acquisition de l'imagerie avant les prélèvements (écouvillons nasaux, trachéaux) et la réalisation du LBA.

La radioactivité des différents échantillons est mesurée. Les échantillons sont stockés dans l'installation de la TEP pendant 24 heures avant d'être transportés à l'IRBA pour l'estimation des CFU des échantillons.

- **Quantification des images de dépôts :**

La distribution régionale dans les différentes régions d'intérêt des voies aériennes (nez, trachée, poumons) a été déterminée. La quantité d'aérosol déposée est donnée pour chaque animal et exprimée en pourcentage sur la base de la quantité totale chargée dans le réservoir du nébuliseur et réellement nébulisée. Toutes les mesures de la radioactivité pour estimer le pourcentage de dépôt ont été corrigées pour l'atténuation tissulaire, l'activité de fond et la désintégration radioactive du ^{18}F . Le scan-CT nous fournit une estimation du volume pulmonaire (CT sans respiration). L'absorption du ^{18}F -FDG nous informe du schéma de dépôt dans les différents compartiments de l'appareil respiratoire.

La quantification du signal TEP ^{18}F -FDG dans les différentes régions d'intérêt (nez, trachée, poumons) est ensuite réalisée à l'aide du logiciel 3D Slicer (v4.11).

Un résumé du protocole expérimental est présenté dans la figure 95.

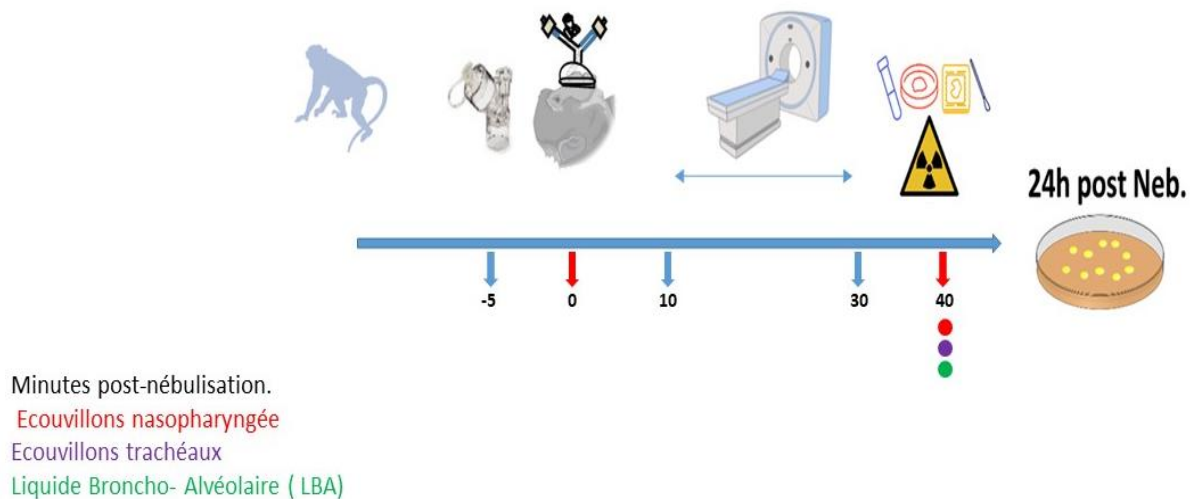


Figure 95 : Schéma expérimental récapitulatif de l'aérosolisation de spores non pathogènes chez le macaque à l'aide d'un prototype d'administration développé.

IV.6.2.3 Prélèvements biologiques pour la quantification des aérosols déposés dans les voies respiratoires

- **Écouvillons nasaux**

Sous anesthésie, deux écouvillons ont été introduits dans les narines droites et gauche pour collecter des échantillons des cavités nasales. Ils ont ensuite été immergés dans 1 ml de tampon phosphate salin ou PBS (Phosphate-Buffered Saline).

- **Écouvillons trachéaux**

Ces écouvillons sont traités de la même façon que les écouvillons des cavités nasales.

- **Prélèvement du Liquide Broncho- Alvéolaire (LBA)**

Pour quantifier les spores de *Bacillus atrophaeus* dans les voies respiratoires inférieures, nous avons réalisé un LBA chez chacun des macaques. Le prélèvement du LBA a été réalisé par une méthode non bronchoscopique visant à collecter des cellules de la trachée jusqu'aux alvéoles.

Une solution saline (NaCl 0,9%) est administrée à raison de 10 ml/kg de masse corporelle pour effectuer le lavage broncho-alvéolaire. La saturation en oxygène des macaques toujours sous anesthésie générale est surveillée. Pendant la procédure, de l'oxygène et une surveillance continue sont fournis.

IV.6.2.4 Dosage des spores issues des prélèvements biologiques chez le macaque et comptage de la radioactivité

L'estimation des CFU post aérosolisation dans les différents écouvillons (trachéaux, nasaux et dans le LBA) a été réalisée à l'IRBA par dilution en cascade comme décrit précédemment. Ces mêmes échantillons étaient placés préalablement dans un compteur radioactif pour mesurer la radioactivité des échantillons.

IV.6.2.4.1 Résultats de l'imagerie de dépôt des aérosols de spores radiotraccées au ¹⁸F-FDG chez le macaque

Les résultats démontrent que des spores bactériennes sont observées et dénombrées dans les écouvillons trachéaux et les échantillons de lavage bronchique chez les macaques. Ces résultats indiquent que l'emplacement principal de la colonisation bactérienne sont les voies respiratoires supérieures et inférieures.

Les résultats de la quantification du dépôt des aérosols dans les voies aériennes sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Résultats de la quantification TEP-TDM, des aérosols dans les fluides biologiques (* Upper Respiratory Tract (VAS) et LRT**(Lower Respiratory Tract= VAI). Le macaque CIA 101 a été exclu de l'analyse des résultats à cause de son réveil durant la nébulisation.

Animal	CIA078	CIB010	CIA045
Activité nébuliseur plein (Bq)	2,67E+07	2,31E+07	2,55E+07
% radioactivité déposée	42,05%	38,96%	37,02%
% URT*	40,91%	49,94%	54,34%
% Œsophage	32,88%	30,15%	14,68%
% Total URT (incluant Œsophage)	73,79%	80,10%	69,02%
% Poumons	26,21%	19,90%	30,98%
% URT on total initial dose	31%	31%	26%
% LRT** on total initial dose	11%	8%	11%

Les résultats du dépôt d'aérosols de spores obtenus par imagerie à l'aide du prototype montrent qu'environ 40% de la dose initiale était déposée dans les voies aériennes respiratoires ce qui correspond à une quantité de spores de l'ordre de 10^7 spores. Soit 100 à 1000 fois la DL_{50} de *Bacillus anthracis* chez le macaque (la DL_{50} par voie inhalée qui est de 10^4 à 10^5 spores).

Un exemple des images de dépôts des aérosols de spores est présenté dans la figure suivante.

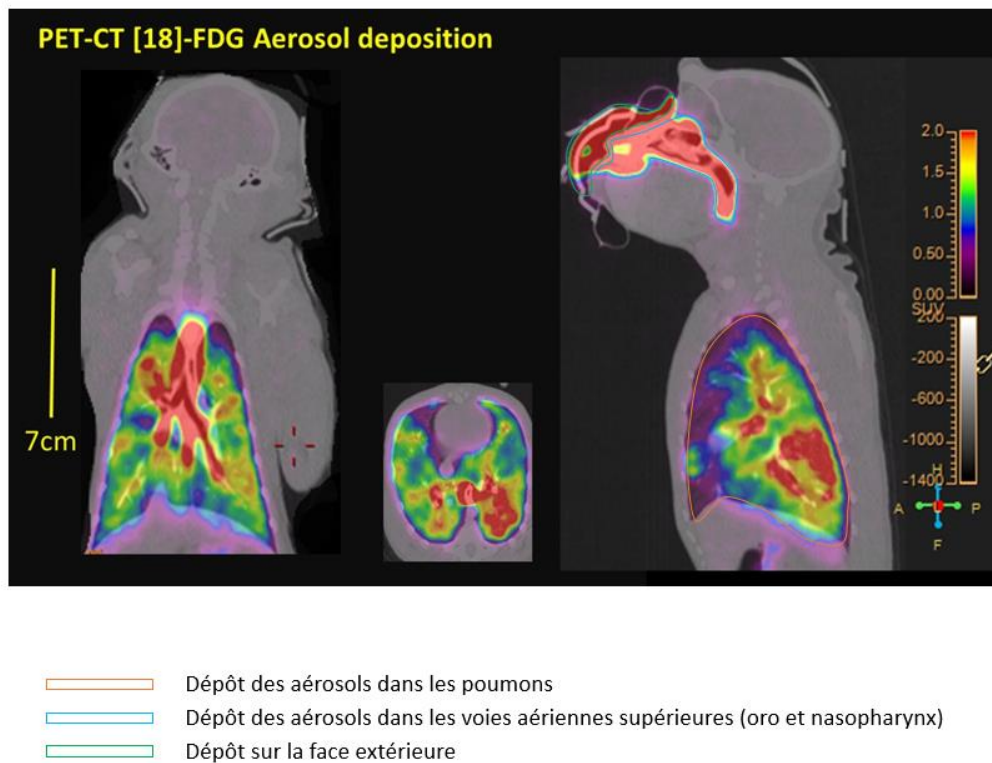


Figure 96 : Images TEP-TDM de dépôts des aérosols de spores chez un macaque.

Les résultats des fluides biologiques montrent qu'il y a une relation linéaire entre la concentration mesurée en spores dans les fluides biologiques et la concentration en spores calculée à partir de la radioactivité mesurée dans les mêmes fluides biologiques. De plus, il existe une corrélation entre la radioactivité avec un coefficient de corrélation linéaire de 0,0915 (r^2) (Figure 97).

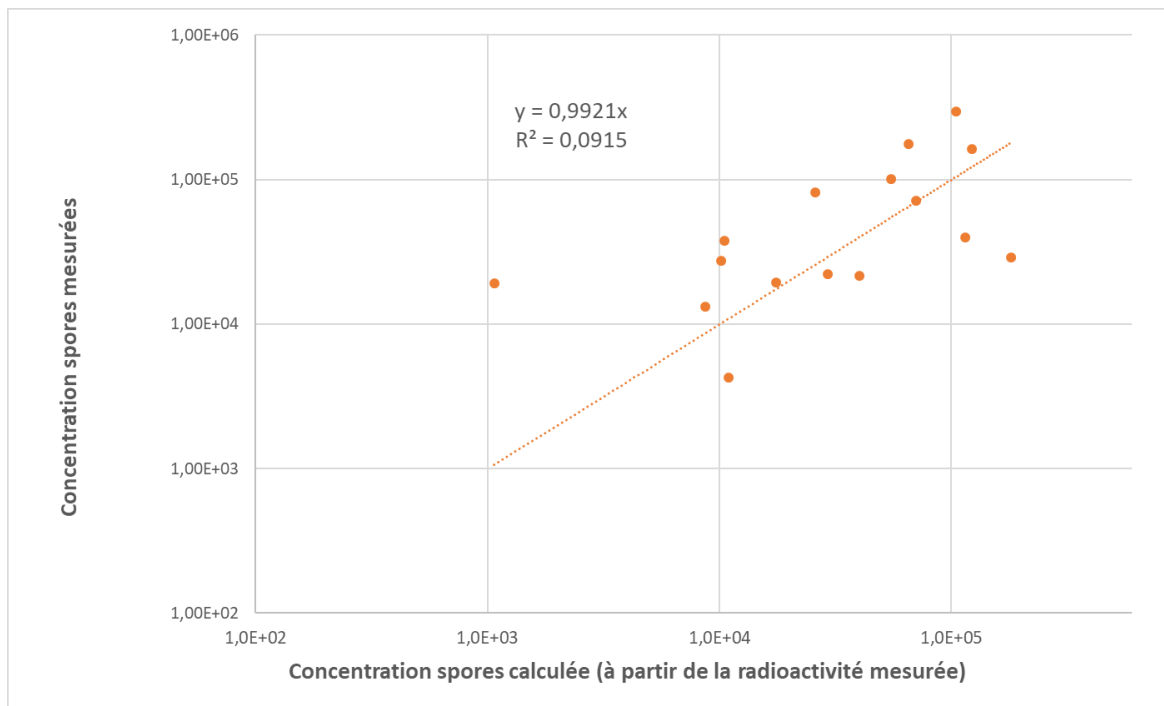


Figure 97 : Relation entre les spores mesurées dans les fluides biologiques et les spores calculées à partir de la radioactivité mesurée dans les mêmes fluides biologiques.

IV.6.2.4.2 Résultats du dénombrement de spores après nébulisation dans les fluides biologiques

La nébulisation a été réalisée chez 4 macaques numérotés CIB010, CIA101, CIA78 et CIA045. Parmi les 4 macaques, un a eu un incident d'anesthésie : le macaque CIA101 s'est réveillé durant la nébulisation et il a été nécessaire de lui administrer une nouvelle dose d'anesthésie. Ce macaque a un nombre de spores dans le LBA inférieur aux autres de $4,28 \times 10^3$ spores/mL (Cf. Tableau 16). Ce macaque n'a pas bénéficié d'analyse par imagerie.

Les 3 autres macaques ont montré des résultats relativement reproductibles en termes de concentration en spores dans les fluides biologiques pour chacune des zones respiratoires (LBA, trachée, écouvillons nasaux).

Le tableau 16 ci-dessous présente les résultats du dénombrement des spores après nébulisation dans le LBA, la trachée et les écouvillons nasaux.

Tableau 16 : Résultats du dénombrement de spores après nébulisation dans les fluides biologiques.

Macaque	LBA (spores/mL)	Trachée (spores/mL)	Ecouvillons nasaux (spores/mL)
CBI010	$2,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$
CIA078	$3,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$
CIA045	$2,7 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$4,7 \times 10^5$
CIA101	$4,28 \times 10^3$	$1,92 \times 10^4$	$1,03 \times 10^5$

L'analyse des résultats des quantités de spores déposées dans les voies aériennes (écouvillons nasaux, trachéaux et pulmonaires), (Figure 98) a été réalisée par un test statistique non paramétrique d'ANNOVA de Friedman pour les données des échantillons pour les différents macaques. Les résultats n'ont pas démontrés de différences significatives entre les échantillons (P value = $0,069 \geq 5\%$). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.

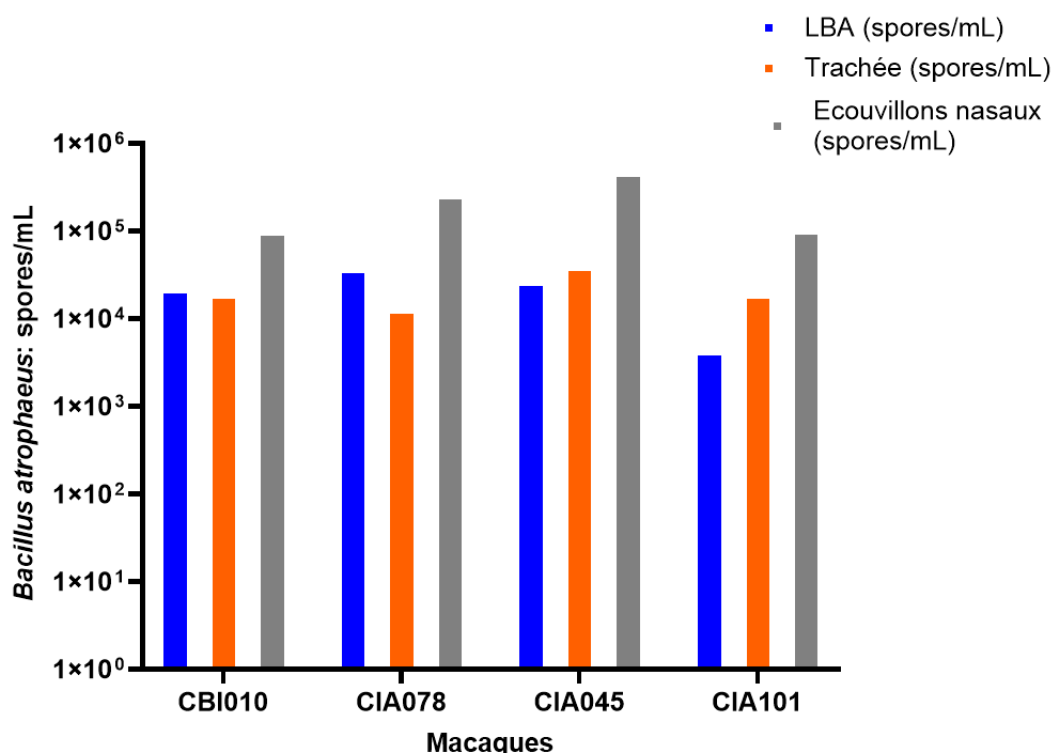


Figure 98 : Concentration en spores mesurées dans les fluides biologiques chez les 4 macaques.

IV.6.3 Conclusion sur l'aérosolisation de spores bactériennes atténuées chez le macaque à l'aide du prototype Y développé

La concentration en radioactivité de ¹⁸F-FDG est corrélée à la concentration en spores dans les fluides biologiques démontrant le traçage efficace des aérosols. Une quantité de 1x10⁸ spores/ml a été nébulisée avec le prototype développé, pendant 10 min de nébulisation. Les résultats montrent que les aérosols de spores de *Bacillus atrophaeus* ont été efficacement administrés dans les voies respiratoires des macaques à l'aide du prototype à tamis de type Y. Une quantité de 10⁷ spores est biodistribuée dans les voies respiratoires de l'animal. Soit 100 à 1000 fois la DL₅₀ de *Bacillus anthracis* chez le macaque (la DL₅₀ par voie inhalée qui est de 10⁴ à 10⁵ spores).

Les concentrations en spores dans les fluides biologiques sont reproductibles d'un macaque à un autre, en particulier pour les Lavages Broncho alvéolaires (LBA). L'imagerie du dépôt pulmonaire constitue un outil fiable pour évaluer la distribution des spores dans les voies respiratoires des macaques.

Ce résultat démontre l'efficacité du dispositif d'administration des aérosols qui a été mis au point.

IV.7 Aérosolisation chez le macaque d'un anticorps anti SARS-CoV-2 à l'aide du prototype 2 (Y)

IV.7.1 Contexte et objectifs de l'étude

L'objectif est ici de démontrer que la nébulisation d'un candidat médicament est d'une part fonctionnelle à l'aide d'un des prototypes à tamis développé, et d'autre part permet d'atteindre les voies respiratoires ciblées. Le médicament est un anticorps anti SARS-CoV-2. En effet, les anticorps ont montré leur efficacité contre les virus [366] dont le SARS-CoV-2 lorsqu'ils sont administrés en tant que traitement prophylactique par voie inhalée [367].

L'étude est réalisée par l'équipe « Aerosol Team » du CEA-IDMIT à la demande de l'industrie Icosagen®.

L'anticorps formulé a été administré chez le macaque anesthésié, en ventilation spontanée, à l'aide du prototype Y connecté à un nébuliseur à tamis de type Aerogen® (prototype Y ou prototype 2 préalablement décrit) et par voie intraveineuse pour comparer leur efficacité. En effet, les nébuliseurs pneumatiques sont reconnus pour réduire l'efficacité d'absorption d'un anticorps en raison de la modification de sa structure due aux impacts répétés observés pendant la nébulisation [368,369].

Nous présentons ici les résultats de l'efficacité comparée de l'anticorps d'Icosagen® administré par aérosol à l'aide du prototype Y développé et par voie intraveineuse. La répartition des animaux (Cf. Figure 99) est la suivante : 20 macaques parmi lesquels 12 macaques contrôles dont 2 placebo et 10 non traités, 5 macaques traités avec l'anticorps par nébulisation et 3 macaques traités avec le même anticorps par injection intraveineuse. Le prototype 1 (fonctionnant avec un nébuliseur pneumatique) a été d'emblée exclu car la technologie du nébuliseur augmente le risque de perte de molécules pendant la procédure.

IV.7.2 Matériels et Méthodes de l'étude

IV.7.2.1 Solution d'anticorps thérapeutique nébulisée chez le macaque

Le médicament utilisé est une immunoglobuline G (IgG) développée par le laboratoire Icosagen® présentant une efficacité neutralisante contre la protéine qui permet l'entrée du SARS-CoV-2 au sein d'une cellule. Il s'agit de la protéine Spike ou protéine S de la plupart des souches du SARS-CoV-2, y compris les souches Delta et Omicron.

IV.7.2.2 Description du plan de l'étude

À l'aide du prototype 2 (Y) développé, huit macaques cynomolgus ont été traités par l'anticorps, 24 heures après une exposition virale au SARS-CoV-2 (10^5 TCID₅₀ de la souche Delta du SARS-CoV-2), par voies intranasale et intratrachéale combinées. Post-infection, l'efficacité de l'anticorps administré par voie intraveineuse chez 9 macaques, 24 heures après une exposition à une forte dose de SARS-CoV-2 est comparée à une administration par la voie inhalée à l'aide du prototype Y.

L'efficacité thérapeutique de l'anticorps nébulisé a été évalué chez des macaques cynomolgus 24 heures après exposition à une forte dose (10^5 TCID₅₀/animal par voies intranasale et trachéale) de SARS-CoV-2. Nous avons comparé la voie de nébulisation à l'administration par bolus intraveineux (IV). Une comparaison entre l'efficacité de l'administration par nébulisation et par la voie intraveineuse a par la suite été réalisée par la mesure des concentrations d'anticorps dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA), et ces 48 heures après le traitement. L'efficacité du traitement (diminution de la charge virale) a également été mesurée dans des écouvillons nasopharyngées et les BAL des macaques. L'anticorps a été formulé pour être administré à raison de 25 mg/kg par les deux voies d'administration. Les macaques sont infectés par voies intratrachéales et intranasales combinées par la souche delta du virus du SARS-CoV-2. Les macaques cynomolgus ont été traités une fois 24 heures après la stimulation

virale. Un suivi longitudinal a été réalisé afin de mesurer les concentrations d'IgG monoclonale et la charge virale après prélèvements de différents échantillons biologiques : écouvillons nasopharyngés, et le Lavage broncho-alvéolaire (LBA). L'efficacité du candidat anticorps a été évaluée par un test de neutralisation des anticorps.

IV.7.2.3 Imagerie TEP-TDM pour la quantification des dépôts d'aérosols chez le macaque

Nous avons évalué le dépôt de particules chez des macaques sous anesthésie, en ventilation spontanée en utilisant l'imagerie TEP-TDM. La capacité du dispositif de nébulisation à déposer les aérosols a été précédemment décrite et évaluée.

Le dépôt des aérosols générés par les prototypes dans l'ensemble des voies respiratoires des macaques *cynomolgus*, à la fois dans les voies respiratoires supérieures et inférieures est validé.

Le plan expérimental de cette étude est décrit dans la figure 99.

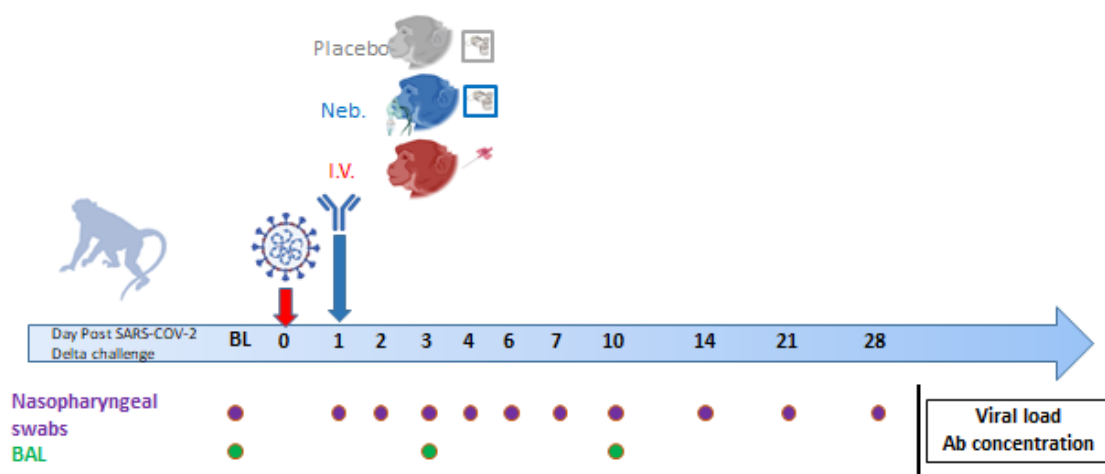


Figure 99 : Plan expérimental pour l'administration d'anticorps thérapeutique anti-SARS-CoV-2 chez le macaque par nébulisation à l'aide d'un prototype développé et par voie intraveineuse. Couleur grise : 12 macaques contrôles dont 2 placebo et 10 non traités ; couleur bleue : 5 macaques traités par nébulisation ; couleur rouge : 3 macaques traités par voie intraveineuse.

Dix macaques ont été exposés à 10^5 TCID₅₀ de SARS-CoV-2 par voie intranasale et intratrachéale. 24 heures après l'exposition, les animaux ont été répartis en trois groupes (12 macaques traités avec un placebo par nébulisation représentés en gris, 5 macaques traités avec l'anticorps par nébulisation représentés en bleu et 3 macaques traités par voie IV représentés en rouge). Un suivi longitudinal a été effectué jusqu'au jour 28 en utilisant des ponctions sanguines, des lavages broncho-alvéolaires (LBA) et des écouvillons.

IV.7.3 Résultats de l'étude

Une partie des résultats se trouve dans l'abstract présenté au congrès DDL (Drug Delivery to the Lungs) 2023 à Edimbourg par Benoit Delache *et al* [370] et une autre partie se trouve dans l'article intitulé « **Broadly neutralizing humanized SARS-CoV-2 antibody binds to a conserved epitope on Spike and provides antiviral protection through inhalation-based delivery in non-human primates** » soumis en juin 2023 dans le journal PloSone Pathogens.

Les résultats de nébulisation de l'anticorps à l'aide des prototypes (Cf. Figures 100 et 101) démontrent en moyenne, une concentration de $33\% \pm \text{SD}$ (16,2 %) du total des IgG dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA), c'est-à-dire les VAI, au jour 3 après l'exposition, tandis que la voie IV ne donne que $2,6\% \pm \text{SD}$ (1,4 %) du total des IgG. À l'inverse, la voie IV donne une concentration systémique 100 fois plus élevée pendant 28 jours de suivi, avec un pic juste après l'administration et une concentration systémique élevée 48 heures après l'administration ($430 \mu\text{g}/\text{mL}$).

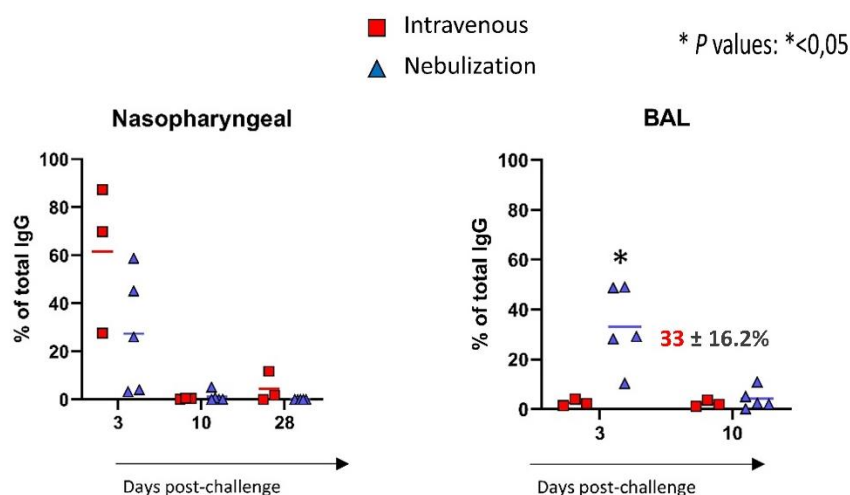


Figure 100 : Pourcentage du total des IgG dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) et les écouvillons nasopharyngés. Le groupe traité par voie iv est en rouge et le groupe traité par nébulisation est en bleu. Test t de Mann-Whitney, valeurs de p: * < 0,05.

Ici, nous avons validé les deux voies d'administration d'IgG et caractérisé la concentration d'IgG dans les différents compartiments du modèle NHP.

En revanche, et comme attendu, la voie IV conduit à une concentration systémique 100 fois supérieure, avec un pic juste après l'administration et une concentration systémique élevée 48 heures après l'administration ($430 \mu\text{g}/\text{ml}$). Nous avons prouvé l'efficacité thérapeutique d'une immunoglobuline G neutralisante (IgG) dans un modèle macaque de la COVID-19. Ces résultats suggèrent que la nébulisation peut être bénéfique pour les patients hospitalisés en soins intensifs, y compris ceux sous ventilation mécanique, en raison de son action antivirale immédiate et puissante dans

les poumons. La nébulisation par des nébuliseurs à tamis vibrant [372] connecté au prototype d'administration d'aérosols développe, est particulièrement adaptée pour les molécules thérapeutiques fragiles. Nous avons démontré que l'administration d'anticorps monoclonaux par inhalation est faisable. Cette voie d'administration par nébulisation pourrait également être utile contre d'autres agents pathogènes respiratoires, en particulier lorsque l'administration rapide et concentrée d'un bolus thérapeutique dans les poumons est cruciale.

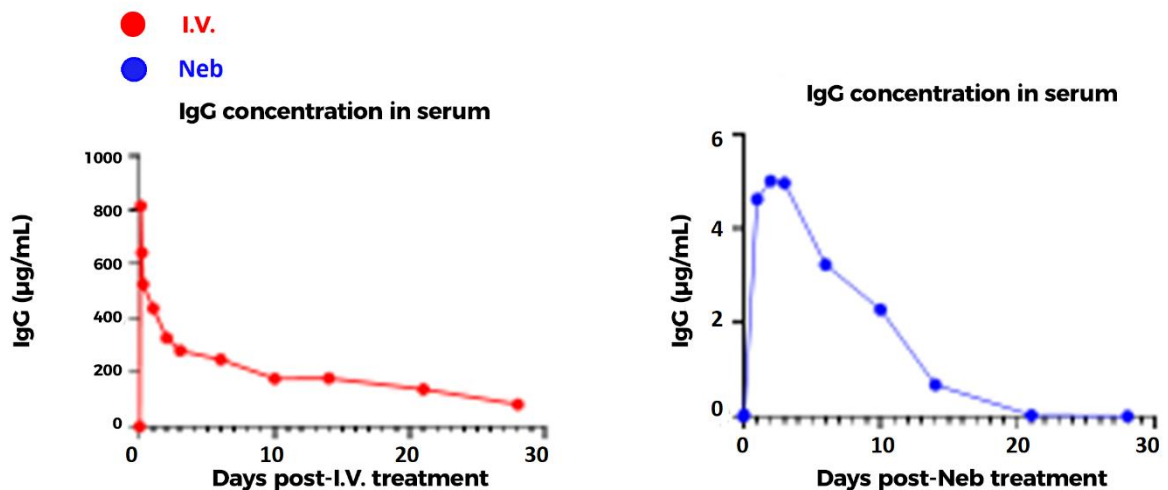


Figure 101 : Comparaison de la concentration systémique d'anticorps anti SARS-CoV-2 par voie intraveineuse et par nébulisation.

IV.7.4 Conclusion sur l'aérosolisation d'anticorps chez le macaque à l'aide du prototype Y développé

L'administration par nébulisation a entraîné des concentrations d'anticorps dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) plus de 10 fois supérieures à la voie IV, 48 heures après le traitement, ainsi qu'un passage systémique entraînant des concentrations sériques 100 fois plus faibles que la voie IV.

Il a été démontré dans un modèle préclinique de COVID-19 chez le macaque *cynomolgus* qu'un anticorps monoclonal neutralisant de type IgG (développé par la firme Icosagen) peut être administré efficacement à l'aide du nébuliseur à tamis prototype. Ce traitement nébulisé est efficace contre l'infection par le virus du SARS-COV-2 et réduit la charge virale lorsqu'il est administré par inhalation en comparaison à la voie intraveineuse, 24 heures après l'exposition au virus à l'aide du prototype 2 développé. De plus, l'IgG est fonctionnel après des tests de neutralisation.

L'outil prototype développé est opérationnel et permet l'administration de matériel biologique viable et de d'agent thérapeutique de manière contrôlée et reproductible . Ce matériel biologique peut être tracé en radioactivité.

DISCUSSION GÉNÉRALE DE LA THÈSE

Toute personne humaine est exposée en permanence aux aérosols. Ils peuvent être anodins et sans conséquence pour la santé, mais ils peuvent aussi perturber le système respiratoire ou même être toxiques, voire létaux.

On sait que les attaques bioterroristes peuvent utiliser des aérosols contenant des substances viables actives et/ou toxiques. Roy *et al.*, 2005 [12] affirment que la voie aérienne, est une voie de destruction massive et létale.

Il est donc crucial de posséder des modèles précliniques fiables, pour évaluer la distribution des aérosols au sein des voies aériennes, de visualiser la cinétique et les voies de colonisation des pathogènes étudiés, de concevoir et analyser les contre-mesures médicales dans un domaine où les études cliniques chez l'Homme ne sont pas envisageables ou difficiles à mettre en œuvre.

Une des difficultés à surmonter est le contrôle de la dose d'aérosol inhalée et réellement déposée dans un territoire respiratoire ciblé, du fait de l'imprécision et du caractère empirique de certaines techniques d'administration utilisées et décrites dans la littérature, telles que les cages d'inhalation. Ces limites présentes dans la littérature (limites méthodologiques, lacunes dans les données etc), mentionnées et discutées dans notre étude, démontrent les contraintes qui existent dans les travaux de recherche antérieurs sur l'inhalation des aérosols chez les PNH.

Il est clair que dans les études d'inhalation d'aérosols, le choix du PNH se justifie totalement comme modèle animal, pour étudier et mimer le dépôt des aérosols en raison des nombreuses similitudes de l'appareil respiratoire, de sa structure anatomique et de ses fonctions respiratoires proches de celles de l'Homme.

La comparaison des structures anatomiques et des fonctions du système respiratoire de l'Homme et du PNH a mis en évidence quelques différences qui peuvent constituer des limites de notre modèle animal. On observe notamment que :

- Le macaque respire majoritairement par le nez et la bouche spontanément. alors que l'Homme adulte respire spontanément en majorité par le nez,
- La position du larynx est différente entre le macaque (larynx plus bas que celui de l'Homme) et l'Homme, ce qui peut influencer le passage des aérosols,
- La trachée du macaque se compose de plus d'anneaux cartilagineux et est par conséquent plus longue que celle de l'Homme,
- Le PNH possède un lobe pulmonaire en plus : le lobe accessoire. Ce lobe est absent chez l'Homme.

Ces limites peuvent influencer le transport et le dépôt des aérosols chez le macaque et rendre complexe l'interprétation des résultats de dépôts d'aérosols.

Pour tenter de résoudre et de comprendre ses limites, il est indispensable de mettre en place des études du comportement des aérosols chez le PNH.

Mais le PNH de laboratoire est une espèce animale difficile d'accès, dont la manipulation est délicate et onéreuse et pour laquelle les autorisations réglementaires pour l'expérimentation peuvent être longues et complexes.

C'est pourquoi, le premier objectif de notre travail a été de développer à partir de scanners prédéfinis d'un macaque mâle de 6 kg, un modèle anatomique *in vitro* 3D Cast des voies respiratoires hautes et basses pour prédire le dépôt des aérosols *in vivo* chez le PNH, le macaque *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*).

Le modèle a été développé à l'aide de la technologie d'impression 3D par stéréolithographie. Ce modèle alternatif à l'expérimentation animale, est un moulage en plastique dont l'intérieur est imprimé avec une précision anatomique de toutes les structures anatomiques des voies aériennes supérieures (sinus et ostias) jusqu'aux troisièmes divisions bronchiques de l'animal.

Ce modèle est connecté à une pompe respiratoire pour simuler les mouvements respiratoires de l'animal et permettre ainsi d'étudier le dépôt des aérosols *in vitro*.

La pompe est réglée sur un seul type de paramètres respiratoires (Volume courant = 26 mL et fréquence respiratoire = 33 battements par minute).

La pertinence de ce modèle *in vitro* a été évaluée dans les mêmes conditions expérimentales en comparant les dépôts d'aérosols de DTPA-^{99m}Technetium qui ont été produits à l'aide de trois nébuliseurs pneumatiques commerciaux, générant trois tailles de particules différentes : 13,1 ; 3,2 et 0,93 µm en termes de MMAD.

Les résultats obtenus ont montré qu'il n'y avait pas de différences statistiques entre les modèles *in vivo* des animaux et anatomiques *in vitro* en termes de dépôt total d'aérosol dans les voies respiratoires. Cependant, la distribution du dépôt dans les voies respiratoires a montré une surestimation du dépôt des aérosols dans les voies aériennes inférieures avec le modèle *in vitro* dans les conditions testées.

Les résultats de notre étude sur les modèles *in vitro* partagent plusieurs similarités avec deux études sur le dépôt d'aérosols utilisant des modèles en 3D Cast de PNH. En effet, d'autres recherches ont étudié le dépôt des aérosols dans des modèles alternatifs de PNH : soit des modèles 3D Cast imprimés à partir de scanner de macaques vivants [373] ou dans des moulages en acrylique de cadavre de ce singe [374].

Comme notre étude, les autres recherches démontrent dans l'ensemble que les modèles alternatifs sont des bons modèles de dépôts d'aérosols. Les résultats dépendent des conditions de nébulisation de chaque modèle alternatif. Et les différences *in vitro* versus *in vivo* sont liées aux limites des modèles *in vitro*. Dans notre cas, une première limite est propre à la finesse de la technique d'impressions 3D. En effet, le modèle 3D Cast s'arrête à la troisième division bronchique et ne reproduit donc pas le poumon entier et notamment le poumon central et périphérique (alvéoles pulmonaires) où peuvent se déposer les aérosols.

De plus, dans l'expérimentation animale *in vivo*, nous avons utilisé 3 macaques femelles de 5 kg, en moyenne alors que les deux modèles *in vitro* 3D Cast sont les moules d'impression d'un macaque mâle de 6 kg.

Une autre limite est que la pompe connectée au modèle 3D fixe un seul type de paramètre respiratoire prédéfini par l'expérimentateur, donc un seul type de respiration. Or, *in vivo*, chez les 3 macaques, la respiration est différente. De plus, le modèle 3D imprimé a la bouche ouverte. On ne peut pas garantir totalement qu'*in vivo* le macaque respire principalement par la bouche et le nez durant la nébulisation, bien qu'il semble respirer par le nez en majorité.

Une quatrième limite dans l'applicabilité de ce modèle est l'absence dans notre modèle 3D Cast, du mouvement du mucus, des cils et des poils. Le modèle 3D est donc statique et ne reproduit pas la partie réactive de l'organisme face à la pénétration d'une particule inhalée.

Le 3D Cast a certes des limites importantes à connaître et notifier, mais il permet de réaliser une étude complète avec des mises au point et des essais de dépôts réalisées *in vitro* puis des expérimentations mieux maîtrisées sur un nombre réduit de PNH, en ligne avec la règle des 3Rs.

Il permet donc de réaliser des études sur le comportement des particules d'aérosols dans les voies aériennes, offrant des perspectives intéressantes pour de nombreuses infections respiratoires, en évitant dans un premier temps l'utilisation d'animaux vivants. Ce modèle peut permettre d'optimiser les systèmes d'administration d'aérosols et d'en prédire le dépôt. Cependant, bien qu'il s'agisse d'un bon modèle, il ne permet pas encore de se passer d'expériences supplémentaires sur des modèles animaux.

Ce modèle *in vitro* 3D Cast a été la base du développement des systèmes d'aérosolisation. Nous avons développé des outils simples d'utilisation pour aérosoliser des solutions thérapeutiques (anticorps thérapeutique) et /ou des pathogènes (spores non pathogènes de *Bacillus anthracis*, *Bacillus atrophaeus*) à l'aide du même dispositif. Ceci dans le but de mimer une voie thérapeutique, de mimer une voie d'exposition naturelle aux pathogènes, et d'avoir un système de mise en œuvre simplifié.

Le modèle de référence, pionnier dans la plupart des études d'aérosols d'agents infectieux administrés pour l'aérosolisation d'agents pathogènes chez le macaque, la Chad Box® (« head only exposure »), est complexe d'utilisation, coûteux, consommateur d'agents à nébuliser. De surcroît, elle contamine le pelage de l'animal. De plus ce système ne permet pas d'administrer des aérosols de solution thérapeutiques. Le CEA ayant acquis au cours du projet de thèse la Chad Box® (CH-Technologies), nous avons pu l'utiliser sur le système *in vitro* 3D cast pour valider et mettre au point la Chad Box®.

L'utilisation d'un seul et même système composé d'outils utilisés en clinique pour l'administration de médicament dans le modèle *in vitro* si possible, chez l'animal et l'humain pourrait permettre d'accélérer le développement vers la clinique en

s'affranchissement du coût et du temps de développement galénique nécessaire avec le dispositif d'inhalation humain.

De plus, ce système capable d'administrer un toxique aérosol et sa thérapeutique inhalée associée, est scientifiquement pertinent afin d'étudier l'effet de la thérapeutique au même site de dépôt respiratoire que le toxique.

Dans ce contexte, en tenant compte des limites du système Chad Box[®], nous avons développés 3 prototypes fonctionnels d'administration d'aérosols en confinement A3 : deux systèmes prototypes fonctionnant avec des nébuliseurs à tamis (prototype T et Y) et un prototype pneumatique. Les prototypes développés peuvent être considérés à usage unique compte tenu de leur coût. Ils sont rapides d'utilisation et facilement transportables.

Chaque prototype est connecté à un masque facial. Ce type d'administration par masque facial possède l'avantage de mimer une exposition à un aérosol toxique ou thérapeutique se déposant dans l'ensemble des voies respiratoires.

Nous avons évalué par imagerie les dépôts d'aérosols des prototypes dans les voies aériennes supérieures et les voies aériennes inférieures. Les modalités de l'imagerie par TEP/TDM et gamma caméra mises en œuvre dans ce projet nous ont permis de quantifier *in vitro* et *in vivo* la bio distribution des aérosols dans les voies aériennes.

Les outils d'imagerie 2D et 3D utilisés ont permis de visualiser et quantifier le dépôt des aérosols radiotracés administrés.

La distribution de l'aérosol par le nébuliseur prototype optimal (nébuliseur à tamis pièce en T) chez les macaques, a été mesurée par imagerie scintigraphique et TEP-TDM. Elle démontre qu'en moyenne 56% de la quantité administrée atteint le tractus respiratoire, avec environ 20 % distribués dans les poumons et la trachée. Nos résultats sont dans l'alignement des résultats d'administration de l'étude de Reynard *et al.*, 2022 et confirment que la nébulisation à l'aide d'un nébuliseur à mailles qui est connecté à un masque facial permet une bio distribution efficace dans les poumons. Cette bio distribution est fortement dépendante du prototype utilisé. Le dépôt moyen des aérosols dans les voies aériennes inférieures est de 14 % dans leur étude tandis que dans la nôtre, ce dépôt est environ 1,5 fois supérieur au dépôt obtenu à l'aide des prototypes à tamis développés.

La gamma caméra n'associe pas un scanner pour visualiser l'anatomie des voies respiratoires et quantifier les dépôts réellement biodistribués à l'intérieur du tractus respiratoire. On peut cependant retenir que le système de nébulisation (interface, appareil de nébulisation, connectiques) influence considérablement le pourcentage de particules d'aérosols bio distribués dans les voies respiratoires.

Les prototypes développés ont été évalués à l'aide d'une solution de spores de *Bacillus atrophaeus* radiotracée au ¹⁸F-FDG, d'une taille de 3 µm en moyenne. La solution est administrée à une concentration > à la DL₅₀ de *Bacillus anthracis* pour se

projeter dans les conditions de nébulisation d'une spore hautement pathogène. Il s'agit d'une solution de 10^8 spores/ mL de *Bacillus atrophaeus* utilisée comme forme non pathogène de spores pathogènes chez l'animal.

La solution a été nébulisée pendant 10 minutes environ à l'aide du prototype Y développé. Seulement 40 % de la quantité nébulisée est biodistribuée dans le système respiratoire du macaque. Cela constitue la dose reçue par le macaque : la mesure de la radioactivité par TEP-TDM montre donc qu'il y a 10^7 spores déposées dans le système respiratoire du macaque. Ce qui veut dire qu'il y a un abattement d'un facteur 10. Dans la littérature, la DL_{50} de *Bacillus anthracis* par voie inhalée, est comprise entre 10^4 et 10^5 . Ce qui montre qu'avec le prototype développé, nous avons fait inhaler réellement au macaque environ 100 à 1000 fois la DL_{50} . Cela signifie qu'en utilisant ce prototype, l'administration des spores serait totalement létale pour tous les animaux exposés.

Le dénombrement des spores dans les liquides de lavage des écouvillons et dans le LBA montre une répartition analogue chez les macaques et des quantités homogènes. Soit 10^4 - 10^5 spores par ml dans les voies aériennes supérieures et 10^3 - 10^4 dans les voies aériennes inférieures.

Bartrand *et al.*, 2008 [350] affirment que la DL_{50} de *Bacillus anthracis* est fonction du dispositif d'administration des aérosols donc de la taille de l'aérosol. Pour exemple, pour une spore d'anthrax administrée par voie inhalée de 1 μm de taille, la DL_{50} est de 10^5 spores chez le macaque rhésus et 8×10^4 spores chez le cochon d'inde. Pour ces deux espèces, il y a une augmentation d'environ 15 fois la dose létale (DL_{50}) lorsque la taille des aérosols est augmentée de 1 μm à 12 μm . Cela veut dire que la toxicité est abaissée d'autant.

La DL_{50} est donc corrélée à la taille de l'aérosol comme affirmé dans la conclusion de la revue de la littérature. De plus cette DL_{50} dépend de la souche bactérienne et de son origine. Les valeurs de DL_{50} du macaque sont disparates dans une fourchette large qui va de 4×10^3 à 1×10^5 environ.

Par ailleurs, peu de données sont disponibles sur la DL_{50} chez l'Homme et pratiquement rien n'est publié. Certains auteurs comme Peters et Hartley [375] estiment qu'on peut extrapoler les valeurs du macaque à l'Homme, ce qui insinuerait qu'on peut donner entre 4000 et 8000 spores pour tuer la moitié des gens exposés par inhalation.

Nos résultats présentent cependant quelques limites. Nos travaux ont été réalisés sur un petit nombre de macaques. Cependant, les résultats démontrent que nous sommes en mesure avec les outils développés d'administrer à la fois un pathogène et son antidote thérapeutique dans le même dispositif.

Il aurait été approprié par conséquent d'étudier les aérosols d'un pathogène infectieux pour développer un modèle de pathologie par voie inhalée chez le macaque, et de développer une thérapie par aérosols contre cet agent infectieux dans le même prototype pour donner encore plus d'intérêt à ce développement.

De plus, il pourrait être intéressant, comme dans l'étude de Gauthier *et al.*, 2008 [376] de réaliser des courbes de suivi de la mortalité cumulée en fonction du temps écoulé depuis l'administration des spores de *Bacillus anthracis* par voies inhalée.

Le travail qui a été réalisé avec *atrophaeus* peut donc être extrapolé au cas de *Bacillus anthracis*.

L'utilisation de l'imagerie pour quantifier le dépôt des aérosols, par imagerie, en particulier imagerie TEP/TDM chez le macaque [18,27,138,165,257,377] constitue un véritable avantage pour visualiser les différentes régions de dépôts dans le tractus respiratoire. Cette imagerie TEP/TDM appliquée à l'aérosolisation d'agents pathogènes pourrait permettre d'explorer les mécanismes potentiels responsables de la colonisation d'une infection respiratoire et des différences de virulence des bioaérosols infectieux en fonction de la taille des particules et du prototype utilisé. En effet, les auteurs font plutôt une comparaison *post mortem* des animaux traités. La comparaison avec nos résultats et ceux existants dans la littérature, est difficile voire impossible.

CONCLUSION GÉNÉRALE DE LA THÈSE

La science des aérosols et de leurs dépôts *in vivo* chez l'animal et chez l'Homme, est complexe. Il reste encore de nombreuses incertitudes à lever.

L'une d'entre elles est de comprendre et de maîtriser les divers facteurs qui influencent le dépôt des aérosols dans l'organisme humain en fonction de sa physiologie au moment du dépôt. Cette étude a tenté de répondre à certaines questions, mais il est nécessaire de la compléter par d'autres recherches.

Enfin, en travaillant dans un contexte NRBC réglementé où les données publiées sont difficiles à obtenir ou alors masquées pour des raisons bio-sécuritaires, cela rajoute une difficulté supplémentaire.

Malgré cela, les travaux de cette thèse réalisés sur deux sites de recherches (CEPR à Tours et CEA-IDMIT à Fontenay-aux-Roses) en collaboration avec différents chercheurs du CEPR, du CEA, de l'IRBA, et de la DGA, ont permis de développer dans le cadre de la règle des 3Rs, un modèle d'impression 3D de macaque et de réaliser *in vitro* et *in vivo*, chez le macaque des essais d'aérosolisation, de visualisation, de quantification de la viabilité des dépôts d'aérosols.

Nous avons réussi à surmonter la majorité de ces obstacles en développant trois prototypes de type T, Y et pneumatique qui ont été testés pour les aérosols thérapeutiques et toxiques. Ces prototypes permettent de simplifier et d'innover l'aérosolisation de tout agent pathogène ou thérapeutique. Il reste à peaufiner les conditions de leur utilisation *in vivo*. Concernant le prototype T, un brevet est rédigé.

En définitive, un modèle *in vitro* et *in vivo* macaque prédictif du dépôt d'aérosols thérapeutiques ou pathogènes, a été développé à l'aide de prototype d'inhalation innovant et opérationnel dans un contexte de confinement de niveau A3.

Le modèle *in vivo* ouvre la voie à l'élaboration de différents modèles précliniques robustes pour étudier les pathologies respiratoires et tester leur antidote par voie inhalée. Les prototypes à tamis constituent selon nous un outil intéressant, opérationnel et fiable pour administrer des aérosols dont le dépôt sera quantifiable par imagerie.

Cela permettra dans le cadre d'une transposition clinique d'optimiser un traitement habituel par voie inhalée chez le patient en maximisant les dépôts pulmonaires dans le cas des pathologies bronchoalvéolaires.

PERSPECTIVES

Le modèle *in vitro* 3D Cast a été développé avec succès, produisant un dépôt total d'aérosols similaire à celui observé *in vivo* chez les macaques dans les conditions expérimentales choisies pour les trois gammes d'aérosols testés. Cependant, il est possible de perfectionner ce modèle alternatif *in vitro* afin de le rapprocher davantage du *in vivo*. Il est vrai que les perspectives d'amélioration du modèle 3D Cast développé sont nombreuses et pourraient permettre une extrapolation plus précise au macaque. L'utilisation de l'impression 3D pour créer un modèle pulmonaire plus complexe imprimé au-delà des troisièmes divisions bronchiques, l'ajout d'un simulateur de mucus comme le Mazola corn oil® utilisé dans l'étude de Kessavan *et al.*, 2010 [113], implantation de poils pour plus se rapprocher du *in vivo*, ainsi que la modélisation mathématique pour prédire le comportement des aérosols, sont autant de perspectives d'améliorations possibles.

Il serait intéressant de réaliser un modèle 3D Cast humain [378] [378] et de s'en servir pour une comparaison du dépôt des aérosols *in vivo* chez l'Homme et *in vivo* chez le macaque.

Les prototypes sont mis au point chez le macaque et développés à partir d'outils et de matériels utilisés en clinique. Il serait intéressant d'une part de réaliser d'autres essais sur un plus grand nombre de macaques. D'autre part, il serait intéressant de réaliser des essais d'aérosols infectieux suivi immédiatement de leurs antidotes afin de vérifier l'efficacité de l'antidote et la fonctionnalité des prototypes pour d'autres agents infectieux.

Il serait intéressant de tester le système de nébulisation développé chez l'enfant ou l'adulte avec un médicament qui à l'AMM qui serait couplé à un radio traceur à vie courte afin d'évaluer l'efficacité du système de nébulisation.

Le transfert de la préclinique vers la clinique pourra être envisagé après avoir réalisé d'autres essais complémentaires. Ce transfert passera par différentes étapes une fois que le produit à nébuliser (protéine, anticorps, ou autre) est identifié. Il faut compléter les études déjà réalisées par des études *in vitro* et des études de cultures cellulaires pour évaluer la cytotoxicité et la sécurité du produit à nébuliser. Il faudrait également réaliser des études chez des espèces rongeurs et non rongeurs afin d'obtenir des données de pharmacologie et toxicocinétique. L'ensemble des données précliniques pourrait être inclus dans un dossier destiné aux autorités réglementaires compétentes qui l'évalueront selon les recommandations de l'OCDE pour les produits inhalés et donneront leur avis pour des essais cliniques de phase I.

Il est important de peser les avantages potentiels de ces améliorations par rapport aux coûts associés avant de poursuivre leur développement vers une demande d'évaluation pour un essai clinique chez l'Homme.

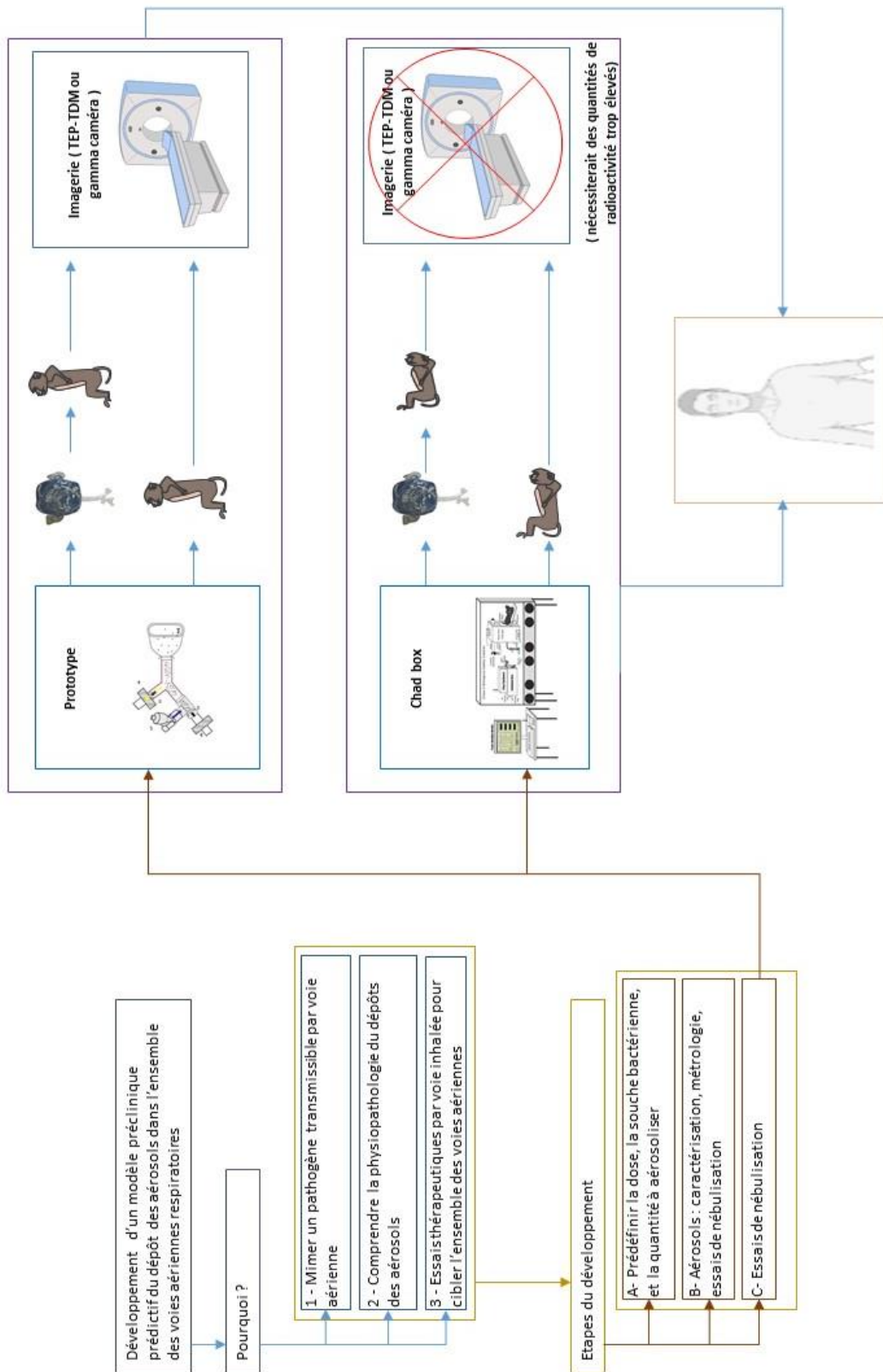


Figure 102 : Proposition de schéma récapitulatif de la thèse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Vecellio, L.; Majoral, C.; Bonnemaïson, E.; Gagnadoux, F.; Mercier, E.; Chinet, T.; Salmeron, S.; Diot, P. Aérosols de médicaments. *EMC. Pneumologie* **2008**, *5*, 1-19.
2. Majoral, C. Métrologie des aérosols dans des conditions physiologiques pour la prédiction de leur dépôt dans les voies respiratoires. Université de Tours, 2007.
3. Montigaud, Y. Modèles précliniques ex vivo pour l'étude de la délivrance pulmonaire d'aérosols dans le traitement de pathologies pulmonaires. Université de Lyon, 2020.
4. Sarracanie, M. Imagerie quantitative du dépôt d'aérosols dans les voies aériennes par résonance magnétique de l'hélium-3 hyperpolarisé. Université Paris Sud-Paris XI, 2011.
5. Alsved, M.; Bourouiba, L.; Duchaine, C.; Löndahl, J.; Marr, L.C.; Parker, S.T.; Prussin, A.J.; Thomas, R.J. Natural sources and experimental generation of bioaerosols: challenges and perspectives. *Aerosol Science and Technology* **2020**, *54*, 547-571.
6. Després, V.; Huffman, J.A.; Burrows, S.M.; Hoose, C.; Safatov, A.; Buryak, G.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Elbert, W.; Andreae, M.; Pöschl, U. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology* **2012**, *64*, 15598.
7. Fennelly, K.P. Particle sizes of infectious aerosols: implications for infection control. *The Lancet Respiratory Medicine* **2020**.
8. Gralton, J.; Tovey, E.; McLaws, M.-L.; Rawlinson, W.D. The role of particle size in aerosolised pathogen transmission: a review. *Journal of Infection* **2011**, *62*, 1-13.
9. Asadi, S.; Wexler, A.S.; Cappa, C.D.; Barreda, S.; Bouvier, N.M.; Ristenpart, W.D. Aerosol emission and superemission during human speech increase with voice loudness. *Scientific reports* **2019**, *9*, 1-10.
10. Thomas, R.J. Particle size and pathogenicity in the respiratory tract. *Virulence* **2013**, *4*, 847-858.
11. Labiris, N.R.; Dolovich, M.B. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *British journal of clinical pharmacology* **2003**, *56*, 588-599.
12. Roy, C.J.; Pitt, L.M.; Swearingen, J. Infectious disease aerobiology: aerosol challenge methods. *Biodefense: research methodology and animal models* **2005**, 61-76.
13. Costantino, V.; Bahl, P.; Doolan, C.; de Silva, C.; Heslop, D.; Chen, X.; Lim, S.; MacIntyre, C.R. Modeling on the Effects of Deliberate Release of Aerosolized Inhalational Bacillus anthracis (Anthrax) on an Australian Population. *Health security* **2023**, *21*, 61-69.
14. Heyder, J. Particle transport onto human airway surfaces. *European journal of respiratory diseases. Supplement* **1982**, *119*, 29-50.
15. Heyder, J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. *Proceedings of the American Thoracic Society* **2004**, *1*, 315-320.
16. Heyder, J.; Gebhart, J.; Rudolf, G.; Schiller, C.F.; Stahlhofen, W. Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005–15 µm. *Journal of aerosol science* **1986**, *17*, 811-825.
17. Heyder, J.; Svartengren, M.U. Basic principles of particle behavior in the human respiratory tract. *Lung biology in Health and Disease* **2001**, *162*, 21-46.
18. Lemaitre, J.; Naninck, T.; Delache, B.; Creppy, J.; Huber, P.; Holzapfel, M.; Bouillier, C.; Contreras, V.; Martinon, F.; Kahlaoui, N. Non-human primate models of human respiratory infections. *Molecular Immunology* **2021**, *135*, 147-164.
19. Miller, L.A.; Royer, C.M.; Pinkerton, K.E.; Schelegle, E.S. Nonhuman primate models of respiratory disease: past, present, and future. *ILAR journal* **2017**, *58*, 269-280.
20. Parent, R.A. *Comparative biology of the normal lung*; Academic Press: 2015.

21. Patra, A.L. Comparative anatomy of mammalian respiratory tracts: the nasopharyngeal region and the tracheobronchial region. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* **1986**, *17*, 163-174.
22. Hofmann, W. Modelling inhaled particle deposition in the human lung—A review. *Journal of Aerosol Science* **2011**, *42*, 693-724.
23. Harkema, J.R. Comparative aspects of nasal airway anatomy: relevance to inhalation toxicology. *Toxicol Pathol* **1991**, *19*, 321-336.
24. Harkema, J.R.; Carey, S.A.; Wagner, J.G.; Dintzis, S.M.; Liggitt, D. Nose, sinus, pharynx, and larynx. In *Comparative anatomy and histology*; Elsevier: 2012; pp. 71-94.
25. Sécher, T.; Bodier-Montagutelli, E.; Guillon, A.; Heuzé-Vourc'h, N. Correlation and clinical relevance of animal models for inhaled pharmaceuticals and biopharmaceuticals. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2020**.
26. Tepper, J.S.; Kuehl, P.J.; Cracknell, S.; Nikula, K.J.; Pei, L.; Blanchard, J.D. Symposium Summary: "Breathe In, Breathe Out, Its Easy: What You Need to Know About Developing Inhaled Drugs". *International journal of toxicology* **2016**, *35*, 376-392.
27. Dabisch, P.; Xu, Z.; Boydston, J.; Solomon, J.; Bohannon, J.; Yeager, J.; Taylor, J.; Reeder, R.; Sayre, P.; Seidel, J. Quantification of regional aerosol deposition patterns as a function of aerodynamic particle size in rhesus macaques using PET/CT imaging. *Inhalation toxicology* **2017**, *29*, 506-515.
28. Emami, A.; Tepper, J.; Short, B.; Yaksh, T.L.; Bendele, A.M.; Ramani, T.; Cisternas, A.F.; Chang, J.H.; Mellon, R.D. Toxicology evaluation of drugs administered via uncommon routes: intranasal, intraocular, intrathecal/intraspinal, and intra-articular. *International journal of toxicology* **2018**, *37*, 4-27.
29. Widdicombe, J. Nasal pathophysiology. *Respiratory medicine* **1990**, *84*, 3-10.
30. Hillmann, D.J. *Macroscopic anatomy of the nasal cavity and paranasal sinuses of the domestic pig (Sus scrofa domestica)*; Iowa State University: 1971.
31. Chevalyre, C.; Riou, M.; Bréa, D.; Vandebrouck, C.; Barc, C.; Pezant, J.; Melo, S.; Olivier, M.; Delaunay, R.; Boulesteix, O. The pig: a relevant model for evaluating the neutrophil serine protease activities during acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *PLoS one* **2016**, *11*, e0168577.
32. Reczyńska, K.; Tharkar, P.; Kim, S.Y.; Wang, Y.; Pamuła, E.; Chan, H.-K.; Chrzanowski, W. Animal models of smoke inhalation injury and related acute and chronic lung diseases. *Advanced drug delivery reviews* **2018**, *123*, 107-134.
33. Chamanza, R.; Wright, J. A review of the comparative anatomy, histology, physiology and pathology of the nasal cavity of rats, mice, dogs and non-human primates. Relevance to inhalation toxicology and human health risk assessment. *Journal of comparative pathology* **2015**, *153*, 287-314.
34. Plopper, C.; Harkema, J.R. The respiratory system and its use in research. In *The laboratory primate*; Elsevier Ltd.: 2005; pp. 503-526.
35. Teske, S.S.; Weir, M.H.; Bartrand, T.A.; Huang, Y.; Tamrakar, S.B.; Haas, C.N. Dose-response models incorporating aerosol size dependency for *Francisella tularensis*. *Risk analysis* **2014**, *34*, 911-928.
36. Available online: (accessed on
37. Guilmette, R.A.; Wicks, J.D.; Wolff, R.K. Morphometry of human nasal airways in vivo using magnetic resonance imaging. *Journal of Aerosol Medicine* **1989**, *2*, 365-377.
38. Dubus, J.C.; Vecellio, L.; De Monte, M.; Fink, J.B.; Grimbert, D.; Montharu, J.; Valat, C.; Behan, N.; Diot, P. Aerosol deposition in neonatal ventilation. *Pediatric research* **2005**, *58*, 10-14.
39. Martonen, T.; Katz, I.; Musante, C. A nonhuman primate aerosol deposition model for toxicological and pharmaceutical studies. *Inhalation Toxicology* **2001**, *13*, 307-356.
40. Réminiac, F.; Vecellio, L.; Loughlin, R.M.; Le Pennec, D.; Cabrera, M.; Vourc'h, N.H.; Fink, J.B.; Ehrmann, S. Nasal high flow nebulization in infants and toddlers: an in vitro and in vivo scintigraphic study. *Pediatric pulmonology* **2017**, *52*, 337-344.

41. Netter, F.H. *Atlas of human anatomy, Professional Edition E-Book: including NetterReference.com Access with full downloadable image Bank*; Elsevier health sciences: 2014.
42. Lindemann, J.; Leisacker, R.; Rettinger, G.; Keck, T. Nasal mucosal temperature during respiration. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* **2002**, *27*, 135-139.
43. Harkema, J.R.; Carey, S.A.; Wagner, J.G. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicologic pathology* **2006**, *34*, 252-269.
44. Sahin-Yilmaz, A.; Naclerio, R.M. Anatomy and physiology of the upper airway. *Proceedings of the American Thoracic Society* **2011**, *8*, 31-39.
45. Masuda, N.; Mantani, Y.; Yoshitomi, C.; Yuasa, H.; Nishida, M.; Arai, M.; Kawano, J.; Yokoyama, T.; Hoshi, N.; Kitagawa, H. Immunohistochemical study on the secretory host defense system with lysozyme and secretory phospholipase A2 throughout rat respiratory tract. *Journal of Veterinary Medical Science* **2018**, *80*, 323-332.
46. Richardson, P.; Peatfield, A. Protection of the respiratory tract—mucus production: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* **1980**, *73*, 123-126.
47. Leopold, D.A. Pollution: the nose and sinuses. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery* **1992**, *106*, 713-719.
48. Kapoor, M.; Cloyd, J.C.; Siegel, R.A. A review of intranasal formulations for the treatment of seizure emergencies. *Journal of Controlled Release* **2016**, *237*, 147-159.
49. Shantha, T.R.; Nakajima, Y. Histological and histochemical studies on the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) olfactory mucosa. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **1970**, *103*, 291-319.
50. HISLOP, J.S.a.A.A.

Structure and Function of the Respiratory System

Developmental Aspects and Their Relevance to Aerosol Therapy. In *Drug delivery to the lung* Hans Bisgaard, C.O.C., Gerald Smaldone, Ed.; 2001; pp. 53-95.

51. Svartengren, K.; Lindestad, P.-Å.; Svartengren, M.; Bylin, G.; Philipson, K.; Camner, P. Deposition of inhaled particles in the mouth and throat of asthmatic subjects. *European Respiratory Journal* **1994**, *7*, 1467-1473.
52. Maaz, A.; Blagbrough, I.S.; De Bank, P.A. In Vitro Evaluation of Nasal Aerosol Depositions: An Insight for Direct Nose to Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1079.
53. Kuper, C.; Hameleers, D.; Bruijntjes, J.; Van der Ven, I.; Biewenga, J.; Sminia, T. Lymphoid and non-lymphoid cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) in the rat: an immuno- and enzyme-histochemical study. *Cell and tissue research* **1990**, *259*, 371-377.
54. Sliwa, J. Représentation des individus par le macaque Rhésus : approche neurophysiologique et comportementale. Université Claude Bernard- Lyon 2012.
55. Heidsiek, J.G.; Hyde, D.M.; Plopper, C.G.; St George, J.A. Quantitative histochemistry of mucosubstance in tracheal epithelium of the macaque monkey. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1987**, *35*, 435-442.
56. Nassra, D. Anatomie de l'appareil respiratoire Available online: <https://www.ch-carcassonne.fr/imgfr/files/Anatomie%20cours%20Dr%20Nassra%282%29.pdf> (accessed on 22/02/2023).
57. Connefroy, S. Atlas radiographique du macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*). 2010.
58. Nathalie, P. Anatomie systématique et topographique de la cavité thoracique du macaque cynomolgus. Université Claude Bernard-Lyon 1, 1994.
59. Leith, D.E. Mammalian tracheal dimensions: scaling and physiology. *Journal of Applied Physiology* **1983**, *55*, 196-200.
60. Pinkerton, K.E.; Van Winkle, L.S.; Plopper, C.G.; Smiley-Jewell, S.; Covarrubias, E.C.; McBride, J.T. Architecture of the tracheobronchial tree. In *Comparative Biology of the Normal Lung*; Elsevier: 2015; pp. 33-51.

61. Chang, A.B. Cough, cough receptors, and asthma in children. *Pediatric pulmonology* **1999**, *28*, 59-70.
62. Weibel, E.R. Morphometry of the human lungs. *New York, NY: Academic* **1963**.
63. Tyler, N.K.; Plopper, C.G. Morphology of the distal conducting airways in rhesus monkey lungs. *The Anatomical Record* **1985**, *211*, 295-303.
64. Weibel, E. Morphometry of human lung Academic Press. *New York* **1963**.
65. Martonen, T. Mathematical model for the selective deposition of inhaled pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences* **1993**, *82*, 1191-1199.
66. Plopper, C.G.; Mariassy, A.T.; Wilson, D.W.; Alley, J.L.; Nishio, S.J.; Nettesheim, P. Comparison of nonciliated tracheal epithelial cells in six mammalian species: ultrastructure and population densities. *Experimental lung research* **1983**, *5*, 281-294.
67. Ellefsen, P.; Tos, M. Goblet cells in the human trachea: quantitative studies of a pathological biopsy material. *Archives of Otolaryngology* **1972**, *95*, 547-555.
68. Grapo, J. Cell characteristics of the normal lung. *Am Rev Respir Dis* **1982**, *125*, 740-745.
69. Alcorn, J.L. Pulmonary surfactant trafficking and homeostasis. In *Lung epithelial biology in the pathogenesis of pulmonary disease*; Elsevier: 2017; pp. 59-75.
70. Mason, R.J.; Dobbs, L.G. Alveolar epithelium and pulmonary surfactant. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine* **2016**, 134.
71. Eedara, B.B.; Bastola, R.; Das, S.C. Dissolution and Absorption of Inhaled Drug Particles in the Lungs. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2667.
72. Blumenthal, R.L.; Campbell, D.E.; Hwang, P.; DeKruyff, R.H.; Frankel, L.R.; Umetsu, D.T. Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2001**, *107*, 258-264.
73. Gordon, S.; Read, R. Macrophage defences against respiratory tract infections: The immunology of childhood respiratory infections. *British medical bulletin* **2002**, *61*, 45-61.
74. Gordon, S.B.; Irving, G.R.; Lawson, R.A.; Lee, M.E.; Read, R.C. Intracellular trafficking and killing of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. *Infection and immunity* **2000**, *68*, 2286-2293.
75. Gordon, S.B.; Molyneux, M.E.; Boeree, M.J.; Kanyanda, S.; Chaponda, M.; Squire, S.B.; Read, R.C. Opsonic phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* by alveolar macrophages is not impaired in human immunodeficiency virus-infected malawian adults. *The Journal of infectious diseases* **2001**, *184*, 1345-1349.
76. Toews, G.B. Pulmonary clearance of infectious agents. *Respiratory Infections: Diagnosis and management, edited by Pennington, JE Raven Press, New York* **1983**, 31.
77. Twigg, H. Lung macrophages in human immunodeficiency viral infection. *LUNG BIOLOGY IN HEALTH AND DISEASE* **1997**, *102*, 571-610.
78. Hiura, T.S.; Kaszubowski, M.P.; Li, N.; Nel, A.E. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *The Journal of Immunology* **1999**, *163*, 5582-5591.
79. Nuorti, J.P.; Butler, J.C.; Farley, M.M.; Harrison, L.H.; McGeer, A.; Kolczak, M.S.; Breiman, R.F.; Team, A.B.C.S. Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. *New England Journal of Medicine* **2000**, *342*, 681-689.
80. Schneeberger, E.; Suda, T. Ontogeny and heterogeneity of lung dendritic cells. *LUNG BIOLOGY IN HEALTH AND DISEASE* **1997**, *102*, 239-265.
81. HISLOP, J.S.a.A.A. II Diaphragm and Rib Cage. In *Drug Delivery to the lung*; 2011; pp. 55-56.
82. Sauleda, J.; Gea, J.; Orozco-Levi, M.; Corominas, J.; Minguella, J.; Aguar, C.; Broquetas, J.; Agusti, A. Structure and function relationships of the respiratory muscles. *European Respiratory Journal* **1998**, *11*, 906-911.
83. Frank L.Powell, P.D.W., John B.West,. Ventilation, Blood Flow, and Gas Exchange. In *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine* 6ed.; ELSEVIER, Ed.; TELEVISE: 2016; Volume 1, pp. 44-75.

84. Guillon, A.; Secher, T.; Dailey, L.; Vecellio, L.; De Monte, M.; Si-Tahar, M.; Diot, P.; Page, C.; Heuzé-Vourc'h, N. Insights on animal models to investigate inhalation therapy: relevance for biotherapeutics. *International journal of pharmaceutics* **2018**, *536*, 116-126.
85. Guillon, A.; Sécher, T.; Dailey, L.; Vecellio, L.; De Monte, M.; Si-Tahar, M.; Diot, P.; Page, C.; Heuzé-Vourc'h, N. Insights on animal models to investigate inhalation therapy: relevance for biotherapeutics. *International journal of pharmaceutics* **2018**, *536*, 116-126.
86. Raux, M.; Fiamma, M.; Similowski, T.; Straus, C. Contrôle de la ventilation: physiologie et exploration en réanimation. *Réanimation* **2007**, *16*, 511-520.
87. Bensouag, D. REGULATION DE LA RESPIRARTION. Available online: <https://fmedecine.univ-setif.dz/Cours/5-%20LA%20REGULATION%20DE%20LA%20RESPIRATION%202020.pdf> (accessed on
88. Haji, A.; Takeda, R.; Okazaki, M. Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacology & therapeutics* **2000**, *86*, 277-304.
89. Sekimoto, K.; Nishikawa, K.; Ishizeki, J.; Kubo, K.; Saito, S.; Goto, F. The effects of volatile anesthetics on intraoperative monitoring of myogenic motor-evoked potentials to transcranial electrical stimulation and on partial neuromuscular blockade during propofol/fentanyl/nitrous oxide anesthesia in humans. *Journal of neurosurgical anesthesiology* **2006**, *18*, 106-111.
90. Thille, A.W.; Rodriguez, P.; Cabello, B.; Lellouche, F.; Brochard, L. Patient-ventilator asynchrony during assisted mechanical ventilation. *Intensive care medicine* **2006**, *32*, 1515-1522.
91. Martin, T.R.; Feldman, H.A.; Fredberg, J.J.; Castile, R.G.; Mead, J.; Wohl, M. Relationship between maximal expiratory flows and lung volumes in growing humans. *Journal of Applied Physiology* **1988**, *65*, 822-828.
92. Greenberg, D.N.; Yoder, B.A.; Clark, R.H.; Butzin, C.A.; Null Jr, D.M. Effect of maternal race on outcome of preterm infants in the military. *Pediatrics* **1993**, *91*, 572-577.
93. North Jr, A.F.; MacDonald, H.M. Why are neonatal mortality rates lower in small black infants than in white infants in similar birth weight? *The Journal of pediatrics* **1977**, *90*, 809-810.
94. Agertoft, L.; Pedersen, S. Importance of the inhalation device on the effect of budesonide. *Archives of Disease in Childhood* **1993**, *69*, 130-133.
95. Ilowite, J.S.; Gorvoy, J.D.; Smaldone, G.C. Quantitative deposition of aerosolized gentamicin in cystic fibrosis1-3. *Am Rev Respir Dis* **1987**, *136*, 1445-1449.
96. Stein, S.W.; Thiel, C.G. The history of therapeutic aerosols: a chronological review. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* **2017**, *30*, 20-41.
97. Gandevia, B. Historical review of the use of parasympatholytic agents in the treatment of respiratory disorders. *Postgraduate Medical Journal* **1975**, *51*, 13-20.
98. Muthu, D.C. *Pulmonary tuberculosis and its etiology and treatment: A record of twenty-two years' observation and work in open-air sanatoria*; Baillière, Tindall & Cox: 1922.
99. Moeller, A.A.M. *Thérapeutique locale des maladies de l'appareil respiratoire par les inhalations médicamenteuses et les pratiques aérothérapiques*; Baillière: 1882.
100. CHRIS O'CALLAGHAN, M.T.V., OLA NERBRINK.

The History of Inhaled Drug Therapy. In *Drug Delivery to the Lung* 2001; pp. 9-11.

101. Bisgaard, H.; O'Callaghan, C.; Smaldone, G.C. *Drug delivery to the lung*; CRC Press: 2001.
102. O'Riordan TG, S.G. Aerosol Deposition and Clearance. Textbook of Respiratory Medicine (Sixth Edition) [Internet]. ed.; Nadel's, M.a., Ed.
103. BECQUEMIN, M.H. INFLUENCE DES CARACTERISTIQUES

D'UN AEROSOL SUR SON DEPOT

DANS L'APPAREIL RESPIRATOIRE. In Proceedings of the Congrès de pneumologie de langue française (CPLF), Marseille, 05/2023, 2010; p. 34.

104. Pharmacopeia, U. Chapter USP. 601—Physical tests and determinations: aerosols. *US Pharmacopeia 30—National Formulary 25*.
105. *European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare*, 10.2 Edition. ed.; Eur Pharmacopeia (Ph Euro): 2020.
106. Products for Nebulization - Characterization Tests
- In *United States Pharmacopeia*, ed, U., Ed.; USP41 ed.
107. 27427.; I. Anaesthetic and Respiratory Equipment—Nebulizing Systems and Components. **2013**.
108. Hogan Jr, C.; Kettleson, E.; Lee, M.H.; Ramaswami, B.; Angenent, L.; Biswas, P. Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles. *Journal of Applied Microbiology* **2005**, *99*, 1422-1434.
109. Dybwad, M.; Skogan, G.; Blatny, J.M. Comparative testing and evaluation of nine different air samplers: end-to-end sampling efficiencies as specific performance measurements for bioaerosol applications. *Aerosol Science and Technology* **2014**, *48*, 282-295.
110. Pan, M.; Lednicky, J.A.; Wu, C.Y. Collection, particle sizing and detection of airborne viruses. *Journal of applied microbiology* **2019**, *127*, 1596-1611.
111. Lin, X.; Willeke, K.; Ulevicius, V.; Grinshpun, S.A. Effect of sampling time on the collection efficiency of all-glass impingers. *American Industrial Hygiene Association Journal* **1997**, *58*, 480-488.
112. Terzieva, S.; Donnelly, J.; Ulevicius, V.; Grinshpun, S.A.; Willeke, K.; Stelma, G.N.; Brenner, K.P. Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Applied and Environmental Microbiology* **1996**, *62*, 2264-2272.
113. Kesavan, J.; Schepers, D.; McFarland, A.R. Sampling and retention efficiencies of batch-type liquid-based bioaerosol samplers. *Aerosol Science and Technology* **2010**, *44*, 817-829.
114. May, K.; Harper, G. The efficiency of various liquid impinger samplers in bacterial aerosols. *British Journal of Industrial Medicine* **1957**, *14*, 287.
115. Willeke, K.; Lin, X.; Grinshpun, S.A. Improved aerosol collection by combined impaction and centrifugal motion. *Aerosol Science and technology* **1998**, *28*, 439-456.
116. Lin, X.; Reponen, T.; Willeke, K.; Wang, Z.; Grinshpun, S.A.; Trunov, M. Survival of airborne microorganisms during swirling aerosol collection. *Aerosol Science & Technology* **2000**, *32*, 184-196.
117. Verreault, D.; Moineau, S.; Duchaine, C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and molecular biology reviews* **2008**, *72*, 413-444.
118. Sawyer, M.H.; Chamberlin, C.J.; Wu, Y.N.; Aintablian, N.; Wallace, M.R. Detection of varicella-zoster virus DNA in air samples from hospital rooms. *Journal of Infectious Diseases* **1994**, *169*, 91-94.
119. Li, J.; Leavey, A.; Wang, Y.; O'Neil, C.; Wallace, M.A.; Burnham, C.-A.D.; Boon, A.C.; Babcock, H.; Biswas, P. Comparing the performance of 3 bioaerosol samplers for influenza virus. *Journal of aerosol science* **2018**, *115*, 133-145.
120. Fabian, P.; McDevitt, J.; Houseman, E.; Milton, D. Airborne influenza virus detection with four aerosol samplers using molecular and infectivity assays: considerations for a new infectious virus aerosol sampler. *Indoor air* **2009**, *19*, 433.
121. Tseng, C.-C.; Li, C.-S. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *Journal of Aerosol Science* **2005**, *36*, 593-607.
122. Saaski, E.W.; Jung, C.C.; McCrae, D.A. High efficiency wetted surface cyclonic air sampler. **2003**.
123. Haig, C.; Mackay, W.; Walker, J.; Williams, C. Bioaerosol sampling: sampling mechanisms, bioefficiency and field studies. *Journal of Hospital Infection* **2016**, *93*, 242-255.

124. Sharma Ghimire, P.; Tripathee, L.; Chen, P.; Kang, S. Linking the conventional and emerging detection techniques for ambient bioaerosols: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **2019**, *18*, 495-523.
125. Kettleston, E.M.; Ramaswami, B.; Hogan Jr, C.J.; Lee, M.-H.; Statyukha, G.A.; Biswas, P.; Angenent, L.T. Airborne virus capture and inactivation by an electrostatic particle collector. *Environmental science & technology* **2009**, *43*, 5940-5946.
126. Thorpe, A.; Walsh, P.T. Comparison of portable, real-time dust monitors sampling actively, with size-selective adaptors, and passively. *Annals of occupational hygiene* **2007**, *51*, 679-691.
127. FranceEnvironnement. FranceEnvironnement. Available online: (accessed on 10/05/2023).
128. Giechaskiel, B.; Carriero, M.; Martini, G.; Krasenbrink, A.; Scheder, D. Calibration and validation of various commercial particle number measurement systems. *SAE International Journal of Fuels and Lubricants* **2009**, *2*, 512-530.
129. Fischer, K.B.; Petrucci, G.A. Utilizing an electrical low-pressure impactor to indirectly probe water uptake via particle bounce measurements. *Atmospheric Measurement Techniques* **2021**, *14*, 7565-7577.
130. Petrovic, V.S.; Janković, S.P.; Tomić, M.V.; Jovanović, Z.S.; Knežević, D.M. The possibilities for measurement and characterization of diesel engine fine particles-A review. *Thermal Science* **2011**, *15*, 915-938.
131. Moiso, M. Real time size distribution measurement of combustion aerosols. **1999**.
132. Dubus JC, B.M., Chaumuzeau JP, Reyckler G, Trosini-desert V, Vecellio L. *Thérapie par voie inhalée par le groupe aérosolthérapie (GAT) Margaux orange*: 2020.
133. Albuquerque-Silva, I.; Vecellio, L.; Durand, M.; Avet, J.; Le Pennec, D.; De Monte, M.; Montharu, J.; Diot, P.; Cottier, M.; Dubois, F. Particle deposition in a child respiratory tract model: in vivo regional deposition of fine and ultrafine aerosols in baboons. *PLoS one* **2014**, *9*, e95456.
134. BORGSTRÖM, A.C.a.L. In Vitro Testing of Pharmaceutical Aerosols and Predicting Lung Deposition from In Vitro Measurements

In *Drug Delivery to the Lung*; 2001; pp. 122-126.

135. Scheuch, G.; Bennett, W.; Borgström, L.; Clark, A.; Dalby, R.; Dolovich, M.; Fleming, J.; Gehr, P.; Gonda, I.; O'Callaghan, C. Deposition, imaging, and clearance: what remains to be done? *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* **2010**, *23*, S-39-S-57.
136. Grupen, C.; Buvat, I. *Handbook of particle detection and imaging*; Springer Science & Business Media: 2011.
137. Naninck, T. Etude de l'infection par Bordetella pertussis dans un modèle de coqueluche chez le primate non-humain : Apports de l'imagerie in vivo. Université Paris-Saclay, 2018.
138. Cheng, Y.; Irshad, H.; Kuehl, P.; Holmes, T.; Sherwood, R.; Hobbs, C. Lung deposition of droplet aerosols in monkeys. *Inhalation toxicology* **2008**, *20*, 1029-1036.
139. Newman, S.; Bennett, W.D.; Biddiscombe, M.; Devadason, S.G.; Dolovich, M.B.; Fleming, J.; Haeussermann, S.; Kietzig, C.; Kuehl, P.J.; Laube, B.L. Standardization of techniques for using planar (2D) imaging for aerosol deposition assessment of orally inhaled products. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* **2012**, *25*, S-10-S-28.
140. Dolovich, M.; Newhouse, M. Aerosols: generation, methods of administration, and therapeutic applications in asthma. *Allergy. Principles and practice* **1993**, 712-739.
141. Fleming, J.; Bailey, D.L.; Chan, H.-K.; Conway, J.; Kuehl, P.J.; Laube, B.L.; Newman, S. Standardization of techniques for using single-photon emission computed tomography (SPECT) for aerosol deposition assessment of orally inhaled products. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* **2012**, *25*, S-29-S-51.
142. Pitcairn, G.; Newman, S. Tissue attenuation corrections in gamma scintigraphy. *Journal of aerosol medicine* **1997**, *10*, 187-198.

143. Majoral, C.; Coates, A.L.; Le Pape, A.; Vecellio, L. Humidified and heated cascade impactor for aerosol sizing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2020**, *8*, 589782.
144. Hartman, A.L.; Nambulli, S.; McMillen, C.M.; White, A.G.; Tilston-Lunel, N.L.; Albe, J.R.; Cottle, E.; Dunn, M.D.; Frye, L.J.; Gilliland, T.H. SARS-CoV-2 infection of African green monkeys results in mild respiratory disease discernible by PET/CT imaging and shedding of infectious virus from both respiratory and gastrointestinal tracts. *PLoS pathogens* **2020**, *16*, e1008903.
145. Stammes, M.A.; Lee, J.H.; Meijer, L.; Naninck, T.; Doyle-Meyers, L.A.; White, A.G.; Borish, H.J.; Hartman, A.L.; Alvarez, X.; Ganatra, S. Medical imaging of pulmonary disease in SARS-CoV-2-exposed non-human primates. *Trends in Molecular Medicine* **2022**, *28*, 123-142.
146. Leclerc, L.; Pourchez, J.; Prevot, N.; Vecellio, L.; Le Guellec, S.; Cottier, M.; Durand, M. Assessing sinus aerosol deposition: Benefits of SPECT–CT imaging. *International Journal of Pharmaceutics* **2014**, *462*, 135-141.
147. Le Guellec, S.; Le Pennec, D.; Gatier, S.; Leclerc, L.; Cabrera, M.; Pourchez, J.; Diot, P.; Reyhler, G.; Pitance, L.; Durand, M. Validation of anatomical models to study aerosol deposition in human nasal cavities. *Pharmaceutical research* **2014**, *31*, 228-237.
148. Reynard, O.; Gonzalez, C.; Dumont, C.; Iampietro, M.; Ferren, M.; Le Guellec, S.; Lajoie, L.; Mathieu, C.; Carpentier, G.; Roseau, G. Nebulized fusion inhibitory peptide protects cynomolgus macaques from measles virus infection. **2022**.
149. Via, L.E.; Weiner, D.M.; Schimel, D.; Lin, P.L.; Dayao, E.; Tankersley, S.L.; Cai, Y.; Coleman, M.T.; Tomko, J.; Paripati, P. Differential virulence and disease progression following Mycobacterium tuberculosis complex infection of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Infection and immunity* **2013**, *81*, 2909-2919.
150. Maisonnasse, P.; Guedj, J.; Contreras, V.; Behillil, S.; Solas, C.; Marlin, R.; Naninck, T.; Pizzorno, A.; Lemaitre, J.; Gonçalves, A. Hydroxychloroquine use against SARS-CoV-2 infection in non-human primates. *Nature* **2020**, *585*, 584-587.
151. Dolovich, M.B. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomographic imaging of pulmonary functions, pathology, and drug delivery. *Proceedings of the American Thoracic Society* **2009**, *6*, 477-485.
152. CHAN, H.-K. Use of single photon emission computed tomography in aerosol studies. *Journal of aerosol medicine* **1993**, *6*, 23-36.
153. Coste, G. Aérosolthérapie par nébulisation: formes, indications et trajet du médicament. *Actualités Pharmaceutiques* **2018**, *57*, 47-52.
154. Reyhler, G.; Dessanges, J.; Vecellio, L. Aérosols: présent et futur. *Revue des maladies respiratoires* **2007**, *24*, 1013-1023.
155. Lentz, Y.K.; Anchordoquy, T.J.; Lengsfeld, C.S. Rationale for the selection of an aerosol delivery system for gene delivery. *Journal of aerosol medicine* **2006**, *19*, 372-384.
156. Maillet, A.; Congy-Jolivet, N.; Le Guellec, S.; Vecellio, L.; Hamard, S.; Courty, Y.; Courtois, A.; Gauthier, F.; Diot, P.; Thibault, G. Aerodynamical, immunological and pharmacological properties of the anticancer antibody cetuximab following nebulization. *Pharmaceutical research* **2008**, *25*, 1318-1326.
157. COATES, A.L.; MACNEISH, C.F.; LANDS, L.C.; SMOUNTAS, A.; MEISNER, D.; KELEMEN, S.; VADAS, E.B. Factors influencing the rate of drug output during the course of wet nebulization. *Journal of aerosol medicine* **1998**, *11*, 101-111.
158. DTF-Médical. Coupe technique du nébuliseur Atomisor®. Available online: (accessed on
159. Steckel, H.; Eskandar, F. Factors affecting aerosol performance during nebulization with jet and ultrasonic nebulizers. *European journal of pharmaceutical sciences* **2003**, *19*, 443-455.
160. Nikander, K.; Turpeinen, M.; Wollmer, P. The conventional ultrasonic nebulizer proved inefficient in nebulizing a suspension. *Journal of aerosol medicine* **1999**, *12*, 47-53.
161. VECELLIO, L. Influence des paramètres physiques de la nébulisation sur la métrologie et la dynamique des aérosols. PhD, Université de Tours 2002.

162. Vecellio, L.; Abdelrahim, M.E.; Montharu, J.; Galle, J.; Diot, P.; Dubus, J.-C. Disposable versus reusable jet nebulizers for cystic fibrosis treatment with tobramycin. *Journal of Cystic Fibrosis* **2011**, *10*, 86-92.
163. Coste, G. Les techniques d'aérosolthérapie par nébulisation. *Actualités Pharmaceutiques* **2019**, *58*, 49-53.
164. Vecellio, L. The mesh nebuliser: a recent technical innovation for aerosol delivery. *Breathe* **2006**, *2*, 252-260.
165. Creppy, J.; Cabrera, M.; Kahlaoui, N.; Pardessus, J.; Lemaitre, J.; Naninck, T.; Delache, B.; Roseau, G.; Ducancel, F.; Vecellio, L. Comparison of Aerosol Deposition Between a Cynomolgus Macaque and a 3D Printed Cast Model of the Animal. *Pharmaceutical Research* **2023**, 1-11.
166. MacLoughlin, R.J.; van Amerongen, G.; Fink, J.B.; Janssens, H.M.; Duprex, W.P.; de Swart, R.L. Optimization and dose estimation of aerosol delivery to non-human primates. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* **2016**, *29*, 281-287.
167. Leach, C.L.; Davidson, P.J.; Hasselquist, B.E.; Boudreau, R.J. Lung deposition of hydrofluoroalkane-134a beclomethasone is greater than that of chlorofluorocarbon fluticasone and chlorofluorocarbon beclomethasone: a cross-over study in healthy volunteers. *Chest* **2002**, *122*, 510-516.
168. Smyth, H.D.; Evans, R.M.; Hickey, A.J. Aerosol generation from propellant-driven metered dose inhalers. In *Inhalation Aerosols*; CRC Press: 2006; pp. 427-444.
169. Dalby, R.N.; Tiano, S.L.; Hickey, A.J. Medical devices for the delivery of therapeutic aerosols to the lungs. In *Inhalation Aerosols*; CRC Press: 2006; pp. 445-472.
170. Duchaine, C.; Roy, C.J. Bioaerosols and airborne transmission: Integrating biological complexity into our perspective. *Science of the Total Environment* **2022**, *825*, 154117.
171. Gollakota, A.R.; Gautam, S.; Santosh, M.; Sudan, H.A.; Gandhi, R.; Jebadurai, V.S.; Shu, C.-M. Bioaerosols: characterization, pathways, sampling strategies, and challenges to geo-environment and health. *Gondwana Research* **2021**, *99*, 178-203.
172. GUIDEnR HQE, I.i.H.Q.E. L'exposition aux polluants physico-chimiques de l'air. Available online: <https://www.hqe.guidenr.fr/cible-13-hqe/exposition-polluants-physico-chimiques.php> (accessed on
173. Dhawan, S.; Biswas, P. Aerosol dynamics model for estimating the risk from short-range airborne transmission and inhalation of expiratory droplets of SARS-CoV-2. *Environmental Science & Technology* **2021**, *55*, 8987-8999.
174. Pellat, B.; Lorimier, S.; Derruau, S. Covid-19, gouttelettes, bio-aérosols, bouche et nez.
175. Xie, X.; Li, Y.; Sun, H.; Liu, L. Exhaled droplets due to talking and coughing. *JR Soc. Interface* **6**, S703-S714. (doi: 10.1098/rsif. 2009.0388. focus). *Link, ISI* **2009**.
176. Johnson, G.; Morawska, L.; Ristovski, Z.; Hargreaves, M.; Mengersen, K.; Chao, C.H.; Wan, M.; Li, Y.; Xie, X.; Katoshevski, D. Modality of human expired aerosol size distributions. *Journal of Aerosol Science* **2011**, *42*, 839-851.
177. Morawska, L.; Johnson, G.; Ristovski, Z.; Hargreaves, M.; Mengersen, K.; Chao, C.; Wan, M.; Li, Y.; Xie, X.; Katoshevski, D. Droplets Expelled during Human Expiratory Activities and their Origin. In *Proceedings of the Proceeding of the 11th International Conference on Indoor Air Quality and Climate Change, 2008*; pp. 1-8.
178. Jaafar-Maalej, C.; Andrieu, V.; Elaissari, A.; Fessi, H. Assessment methods of inhaled aerosols: technical aspects and applications. *Expert opinion on drug delivery* **2009**, *6*, 941-959.
179. de Normalisation, C.E. Respiratory therapy equipment—Part 1: Nebulizing systems and their components. *Document EN* **2001**, 13544.
180. Wang, C.C.; Prather, K.A.; Sznitman, J.; Jimenez, J.L.; Lakdawala, S.S.; Tufekci, Z.; Marr, L.C. Airborne transmission of respiratory viruses. *Science* **2021**, *373*, eabd9149.
181. Henning, A.; Hein, S.; Schneider, M.; Bur, M.; Lehr, C.-M. Pulmonary drug delivery: medicines for inhalation. *Drug Delivery* **2010**, 171-192.
182. ICPR. Morphologie, cytologie, histologie, fonction et structure de l'appareil respiratoire et

régions utilisées dans le modèle dosimétrique de la CIPR de 1994. Available online: (accessed on 183. SVARTENGREN, J.H.a.M.U.

Basic Principles of Particle Behavior in the Human Respiratory Tract. In *Drug delivery to the Lungs*, Marcel Dekker, Inc. ed.; Taylor & Francis e-Library,: 2001; pp. 27-30.

184. Findeisen, W. Über das Absetzen kleiner, in der Luft suspendierter Teilchen in der menschlichen Lunge bei der Atmung. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **1935**, *236*, 367-379.
185. Darquenne, C. Aerosol deposition in health and disease. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* **2012**, *25*, 140-147.
186. ZANEN, P.; LAUBE, B.L.

Targeting the Lungs with Therapeutic Aerosols

In *Drug Delivery to the Lung* Marcel Dekker, Inc. ed.; Taylor & Francis e-Library, Ed.; 2001; pp. 217-225.

187. Darquenne, C. Deposition mechanisms. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* **2020**, *33*, 181-185.
188. Darquenne, C.J.; Schmid, O.; Prisk, G.K. *Aerosols and the human lung: an introduction*; World Scientific: 2020.
189. Klaassen, C.D.; Amdur, M.O. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*; McGraw-Hill New York: 2013; Volume 1236.
190. Harvold, E.P.; Tomer, B.S.; Vargervik, K.; Chierici, G. Primate experiments on oral respiration. *American journal of orthodontics* **1981**, *79*, 359-372.
191. Williams, G.; Suman, J.D. In Vitro Anatomical Models for Nasal Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1353.
192. Majoral, C.; Pape, A.L.; Diot, P.; Vecellio, L. Comparison of various methods for processing cascade impactor data. *Aerosol science and technology* **2006**, *40*, 672-682.
193. Borghardt, J.M.; Weber, B.; Staab, A.; Kloft, C. Pharmacometric models for characterizing the pharmacokinetics of orally inhaled drugs. *The AAPS journal* **2015**, *17*, 853-870.
194. Newman, S.P. Delivering drugs to the lungs: The history of repurposing in the treatment of respiratory diseases. *Advanced drug delivery reviews* **2018**, *133*, 5-18.
195. Zhang, X.S.; Duchaine, C. SARS-CoV-2 and health care worker protection in low-risk settings: a review of modes of transmission and a novel airborne model involving inhalable particles. *Clinical Microbiology Reviews* **2020**, *34*.
196. Pauluhn, J.; Mohr, U. Inhalation studies in laboratory animals—current concepts and alternatives. *Toxicologic pathology* **2000**, *28*, 734-753.
197. Phalen, R.F.; Oldham, M.J.; Wolff, R.K. The relevance of animal models for aerosol studies. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* **2008**, *21*, 113-124.
198. Bluemel, J.; Korte, S.; Schenck, E.; Weinbauer, G. *The nonhuman primate in nonclinical drug development and safety assessment*; Academic Press: 2015.
199. Hatzioannou, T.; Evans, D.T. Animal models for HIV/AIDS research. *Nature Reviews Microbiology* **2012**, *10*, 852-867.
200. Masopust, D.; Sivula, C.P.; Jameson, S.C. Of mice, dirty mice, and men: using mice to understand human immunology. *The Journal of Immunology* **2017**, *199*, 383-388.
201. Weibel, E.R.; Gomez, D.M. A principle for counting tissue structures on random sections. *Journal of applied physiology* **1962**, *17*, 343-348.
202. Bjornson-Hooper, Z.B.; Fragiadakis, G.K.; Spitzer, M.H.; Madhiredy, D.; McIlwain, D.; Nolan, G.P. A comprehensive atlas of immunological differences between humans, mice and non-human primates. biorxiv. *Preprint posted online March* **2019**, *11*.
203. Gardner, M.B.; Luciw, P.A. Macaque models of human infectious disease. *ILAR journal* **2008**, *49*, 220-255.

204. Estes, J.D.; Wong, S.W.; Brenchley, J.M. Nonhuman primate models of human viral infections. *Nature reviews Immunology* **2018**, *18*, 390-404.
205. Messaoudi, I.; Estep, R.; Robinson, B.; Wong, S.W. Nonhuman primate models of human immunology. *Antioxidants & redox signaling* **2011**, *14*, 261-273.
206. Genicot, B.; Mouligneau, F.; Lekeux, P. L'aérosolthérapie: principes d'action et exigences techniques pour des résultats thérapeutiques optimaux. In Proceedings of the Annales de Médecine Vétérinaire, 1992; pp. 81-87.
207. Hinds, W.C.; Zhu, Y. *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles*; John Wiley & Sons: 2022.
208. Asgharian, B.; Price, O.; McClellan, G.; Corley, R.; Einstein, D.R.; Jacob, R.E.; Harkema, J.; Carey, S.A.; Schelegle, E.; Hyde, D. Development of a rhesus monkey lung geometry model and application to particle deposition in comparison to humans. *Inhalation toxicology* **2012**, *24*, 869-899.
209. Gregory, T.J.; Irshad, H.; Chand, R.; Kuehl, P.J. Deposition of aerosolized lucinactant in nonhuman primates. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* **2020**, *33*, 21-33.
210. Respaud, R.; Marchand, D.; Pelat, T.; Tchou-Wong, K.-M.; Roy, C.J.; Parent, C.; Cabrera, M.; Guillemain, J.; Mac Loughlin, R.; Levacher, E. Development of a drug delivery system for efficient alveolar delivery of a neutralizing monoclonal antibody to treat pulmonary intoxication to ricin. *Journal of Controlled Release* **2016**, *234*, 21-32.
211. Reynard, O.; Gonzalez, C.; Dumont, C.; Iampietro, M.; Ferren, M.; Le Guellec, S.; Laurie, L.; Mathieu, C.; Carpentier, G.; Roseau, G. Nebulized fusion inhibitory peptide protects cynomolgus macaques from measles virus infection. *Research Square* **2022**.
212. Gay, N.; Cabrera, M.; Diot, P.; Dubus, J.-C.; Sauvaget, E.; Montharut, J.; Rosseau, G. Méthodologies et générations d'aérosol innovants appliqués à la vectorisation pulmonaire en pédiatrie. *IRBM* **2012**, *33*, 61-66.
213. Marchand, S.; Bouchene, S.; de Monte, M.; Guilleminault, L.; Montharu, J.; Cabrera, M.; Grégoire, N.; Gobin, P.; Diot, P.; Couet, W. Pharmacokinetics of colistin methansulphonate (CMS) and colistin after CMS nebulisation in baboon monkeys. *Pharmaceutical research* **2015**, *32*, 3403-3414.
214. Reynard, O.; Gonzalez, C.; Dumont, C.; Iampietro, M.; Ferren, M.; Le Guellec, S.; Laurie, L.; Mathieu, C.; Carpentier, G.; Roseau, G. Nebulized fusion inhibitory peptide protects cynomolgus macaques from measles virus infection. *Nature Communications* **2022**, *13*, 1-16.
215. Sandrine Le Guellec, G.R., Frédéric Vullo, Stéphane Gatier, Gilles Chantrel, Laurent Vecellio., D;. Développement et évaluation d'un nouveau nébuliseur ciblant les voies aériennes supérieures. In Proceedings of the Société Française d'ORL et la Chirurgie de la Face et du Cou (SFORL) congrès, France, 2009.
216. Schlesinger, R.B. Comparative deposition of inhaled aerosols in experimental animals and humans: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* **1985**, *15*, 197-214.
217. Palm, P.E.; Mcnerney, J.M.; Hatch, T. Respiratory Dust Retention in Small Animals. A Comparison with Man. *Arch. Indust. Health* **1956**, *13*, 355-365.
218. Wolff, R. Experimental investigation of deposition and fate of particles: animal models and interspecies differences. *Aerosol Inhalation: Recent Research Frontiers* **1996**, 247-263.
219. Citron, M.P.; Patel, M.; Purcell, M.; Lin, S.-A.; Rubins, D.J.; McQuade, P.; Callahan, C.; Gleason, A.; Petrescu, I.; Knapp, W. A novel method for strict intranasal delivery of non-replicating RSV vaccines in cotton rats and non-human primates. *Vaccine* **2018**, *36*, 2876-2885.
220. Beck, S.E.; Laube, B.L.; Barberena, C.I.; Fischer, A.C.; Adams, R.J.; Chesnut, K.; Flotte, T.R.; Guggino, W.B. Deposition and expression of aerosolized rAAV vectors in the lungs of Rhesus macaques. *Molecular Therapy* **2002**, *6*, 546-554.
221. Capuano, S.V.; Croix, D.A.; Pawar, S.; Zinovik, A.; Myers, A.; Lin, P.L.; Bissel, S.; Fuhrman, C.; Klein, E.; Flynn, J.L. Experimental Mycobacterium tuberculosis infection of cynomolgus

- macaques closely resembles the various manifestations of human M. tuberculosis infection. *Infection and immunity* **2003**, *71*, 5831-5844.
222. Via, L.E.; Lin, P.L.; Ray, S.M.; Carrillo, J.; Allen, S.S.; Eum, S.Y.; Taylor, K.; Klein, E.; Manjunatha, U.; Gonzales, J. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infection and immunity* **2008**, *76*, 2333-2340.
223. Driscoll, K.E.; Costa, D.L.; Hatch, G.; Henderson, R.; Oberdorster, G.; Salem, H.; Schlesinger, R.B. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicological Sciences* **2000**, *55*, 24-35.
224. Cryan, S.-A.; Sivadas, N.; Garcia-Contreras, L. In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier. *Advanced drug delivery reviews* **2007**, *59*, 1133-1151.
225. Rosenberg, Y.J.; Laube, B.; Mao, L.; Jiang, X.; Hernandez-Abanto, S.; Lee, K.D.; Adams, R. Pulmonary delivery of an aerosolized recombinant human butyrylcholinesterase pretreatment protects against aerosolized paraoxon in macaques. *Chemico-biological interactions* **2013**, *203*, 167-171.
226. Guillon, A.; Darrouzain, F.; Heuzé-Vourc'h, N.; Petitcollin, A.; Barc, C.; Vecellio, L.; Cormier, B.; Lanotte, P.; Sarradin, P.; Dequin, P.-F. Intra-tracheal amikacin spray delivery in healthy mechanically ventilated piglets. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **2019**, *57*, 101807.
227. Alves, D.; Glynn, A.; Steele, K.; Lackemeyer, M.; Garza, N.; Buck, J.; Mech, C.; Reed, D. Aerosol exposure to the Angola strain of Marburg virus causes lethal viral hemorrhagic fever in cynomolgus macaques. *Veterinary pathology* **2010**, *47*, 831-851.
228. Ghazanfari, T.; Elhissi, A.M.; Ding, Z.; Taylor, K.M. The influence of fluid physicochemical properties on vibrating-mesh nebulization. *International journal of pharmaceutics* **2007**, *339*, 103-111.
229. Bowling, J.D.; O'Malley, K.J.; Klimstra, W.B.; Hartman, A.L.; Reed, D.S. A vibrating mesh nebulizer as an alternative to the Collison three-jet nebulizer for infectious disease aerobiology. *Applied and environmental microbiology* **2019**, *85*, e00747-00719.
230. Setti, L.; Passarini, F.; De Gennaro, G.; Barbieri, P.; Perrone, M.G.; Borelli, M.; Palmisani, J.; Di Gilio, A.; Torboli, V.; Fontana, F. SARS-Cov-2RNA found on particulate matter of Bergamo in Northern Italy: first evidence. *Environmental research* **2020**, *188*, 109754.
231. Schuit, M.; Ratnesar-Shumate, S.; Yolitz, J.; Williams, G.; Weaver, W.; Green, B.; Miller, D.; Krause, M.; Beck, K.; Wood, S. Airborne SARS-CoV-2 is rapidly inactivated by simulated sunlight. *The Journal of infectious diseases* **2020**, *222*, 564-571.
232. Fernandez-Montero, J.V.; Soriano, V.; Barreiro, P.; de Mendoza, C.; Artacho, M.Á. Coronavirus and other airborne agents with pandemic potential. *Current opinion in environmental science & health* **2020**.
233. Van Doremalen, N.; Bushmaker, T.; Morris, D.H.; Holbrook, M.G.; Gamble, A.; Williamson, B.N.; Tamin, A.; Harcourt, J.L.; Thornburg, N.J.; Gerber, S.I. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England journal of medicine* **2020**, *382*, 1564-1567.
234. Zou, L.; Ruan, F.; Huang, M.; Liang, L.; Huang, H.; Hong, Z.; Yu, J.; Kang, M.; Song, Y.; Xia, J. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *New England journal of medicine* **2020**, *382*, 1177-1179.
235. Meselson, M. Droplets and aerosols in the transmission of SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 2063-2063.
236. Néant, N.; Lingas, G.; Le Hingrat, Q.; Ghosn, J.; Engelmann, I.; Lepiller, Q.; Gaymard, A.; Ferré, V.; Hartard, C.; Plantier, J.-C. Modeling SARS-CoV-2 viral kinetics and association with mortality in hospitalized patients from the French COVID cohort. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2021**, *118*, e2017962118.
237. Kutter, J.S.; de Meulder, D.; Bestebroer, T.M.; Lexmond, P.; Mulders, A.; Richard, M.; Fouchier, R.A.; Herfst, S. SARS-CoV and SARS-CoV-2 are transmitted through the air between ferrets over more than one meter distance. *Nature communications* **2021**, *12*, 1-8.

238. Richard, M.; Kok, A.; de Meulder, D.; Bestebroer, T.M.; Lamers, M.M.; Okba, N.; Fentener van Vlissingen, M.; Rockx, B.; Haagmans, B.L.; Koopmans, M.P. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nature communications* **2020**, *11*, 1-6.
239. Young-Il, K.; Seong-Gyu, K.; Se-Mi, K.; Eun-Ha, K.; Su-Jin, P.; Kwang-Min, Y.; Young, K. Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host & Microbe* **2020**, *27*, 704-709.
240. Imai, M.; Iwatsuki-Horimoto, K.; Hatta, M.; Loeber, S.; Halfmann, P.J.; Nakajima, N.; Watanabe, T.; Ujje, M.; Takahashi, K.; Ito, M. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117*, 16587-16595.
241. Rosenke, K.; Meade-White, K.; Letko, M.; Clancy, C.; Hansen, F.; Liu, Y.; Okumura, A.; Tang-Huau, T.-L.; Li, R.; Saturday, G. Defining the Syrian hamster as a highly susceptible preclinical model for SARS-CoV-2 infection. *Emerging microbes & infections* **2020**, *9*, 2673-2684.
242. Totura, A.; Livingston, V.; Frick, O.; Dyer, D.; Nichols, D.; Nalca, A. Small particle aerosol exposure of African green monkeys to MERS-CoV as a model for highly pathogenic coronavirus infection. *Emerging infectious diseases* **2020**, *26*, 2835.
243. Deere, J.D.; Carroll, T.D.; Dutra, J.; Fritts, L.; Sammak, R.L.; Yee, J.L.; Olstad, K.J.; Reader, J.R.; Kistler, A.; Kamm, J. SARS-CoV-2 infection of rhesus macaques treated early with human COVID-19 convalescent plasma. *Microbiology spectrum* **2021**, *9*, e01397-01321.
244. Salguero, F.J.; White, A.D.; Slack, G.S.; Fotheringham, S.A.; Bewley, K.R.; Gooch, K.E.; Longet, S.; Humphries, H.E.; Watson, R.J.; Hunter, L. Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19. *Nature communications* **2021**, *12*, 1-14.
245. Bixler, S.L.; Stefan, C.P.; Jay, A.; Rossi, F.; Ricks, K.M.; Shoemaker, C.J.; Moreau, A.M.; Zeng, X.; Hooper, J.W.; Dyer, D. Aerosol exposure of cynomolgus macaques to SARS-CoV-2 results in more severe pathology than existing models. *BioRxiv* **2021**.
246. McAuliffe, J.; Vogel, L.; Roberts, A.; Fahle, G.; Fischer, S.; Shieh, W.-J.; Butler, E.; Zaki, S.; Claire, M.S.; Murphy, B. Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys. *Virology* **2004**, *330*, 8-15.
247. Smits, S.L.; van den Brand, J.M.; de Lang, A.; Leijten, L.M.; van IJcken, W.F.; van Amerongen, G.; Osterhaus, A.D.; Andeweg, A.C.; Haagmans, B.L. Distinct severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced acute lung injury pathways in two different nonhuman primate species. *Journal of virology* **2011**, *85*, 4234-4245.
248. Blair, R.V.; Vaccari, M.; Doyle-Meyers, L.A.; Roy, C.J.; Russell-Lodrigue, K.; Fahlberg, M.; Monjure, C.J.; Beddingfield, B.; Plante, K.S.; Plante, J.A. Acute respiratory distress in aged, SARS-CoV-2-infected African green monkeys but not rhesus macaques. *The American journal of pathology* **2021**, *191*, 274-282.
249. Johnston, S.C.; Ricks, K.M.; Jay, A.; Raymond, J.L.; Rossi, F.; Zeng, X.; Scruggs, J.; Dyer, D.; Frick, O.; Koehler, J.W. Development of a coronavirus disease 2019 nonhuman primate model using airborne exposure. *PloS one* **2021**, *16*, e0246366.
250. Hojyo, S.; Uchida, M.; Tanaka, K.; Hasebe, R.; Tanaka, Y.; Murakami, M.; Hirano, T. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflammation and regeneration* **2020**, *40*, 1-7.
251. Bae, S.; Lim, J.S.; Kim, J.Y.; Jung, J.; Kim, S.-H. Transmission characteristics of SARS-CoV-2 that hinder effective control. *Immune network* **2021**, *21*.
252. Edwards, D.A.; Ausiello, D.; Salzman, J.; Devlin, T.; Langer, R.; Beddingfield, B.J.; Fears, A.C.; Doyle-Meyers, L.A.; Redmann, R.K.; Killeen, S.Z. Exhaled aerosol increases with COVID-19 infection, age, and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2021**, *118*, e2021830118.
253. Rockx, B.; Kuiken, T.; Herfst, S.; Bestebroer, T.; Lamers, M.M.; Oude Munnink, B.B.; De Meulder, D.; Van Amerongen, G.; Van Den Brand, J.; Okba, N.M. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science* **2020**, *368*, 1012-1015.

254. Song, T.-Z.; Zheng, H.-Y.; Han, J.-B.; Jin, L.; Yang, X.; Liu, F.-L.; Luo, R.-H.; Tian, R.-R.; Cai, H.-R.; Feng, X.-L. Delayed severe cytokine storm and immune cell infiltration in SARS-CoV-2-infected aged Chinese rhesus macaques. *Zoological research* **2020**, *41*, 503.
255. Yu, P.; Qi, F.; Xu, Y.; Li, F.; Liu, P.; Liu, J.; Bao, L.; Deng, W.; Gao, H.; Xiang, Z. Age-related rhesus macaque models of COVID-19. *Animal models and experimental medicine* **2020**, *3*, 93-97.
256. Deng, W.; Bao, L.; Gao, H.; Xiang, Z.; Qu, Y.; Song, Z.; Gong, S.; Liu, J.; Liu, J.; Yu, P. Ocular conjunctival inoculation of SARS-CoV-2 can cause mild COVID-19 in rhesus macaques. *Nature communications* **2020**, *11*, 1-7.
257. Dabisch, P.A.; Biryukov, J.; Beck, K.; Boydston, J.A.; Sanjak, J.S.; Herzog, A.; Green, B.; Williams, G.; Yeager, J.; Bohannon, J.K. Seroconversion and fever are dose-dependent in a nonhuman primate model of inhalational COVID-19. *PLoS pathogens* **2021**, *17*, e1009865.
258. Zuo, Y.Y.; Uspal, W.E.; Wei, T. Airborne transmission of COVID-19: aerosol dispersion, lung deposition, and virus-receptor interactions. *ACS nano* **2020**, *14*, 16502-16524.
259. Karimzadeh, S.; Bhopal, R.; Tien, H.N. Review of infective dose, routes of transmission and outcome of COVID-19 caused by the SARS-COV-2: comparison with other respiratory viruses. *Epidemiology & Infection* **2021**, *149*.
260. Amurri, L.; Reynard, O.; Gerlier, D.; Horvat, B.; Iampietro, M. Measles Virus-Induced Host Immunity and Mechanisms of Viral Evasion. *Viruses* **2022**, *14*, 2641.
261. Ferren, M.; Horvat, B.; Mathieu, C. Measles encephalitis: towards new therapeutics. *Viruses* **2019**, *11*, 1017.
262. Adhikari, B.B.; Goodson, J.L.; Chu, S.Y.; Rota, P.A.; Meltzer, M.I. Assessing the potential cost-effectiveness of microneedle patches in childhood measles vaccination programs: the case for further research and development. *Drugs in R&D* **2016**, *16*, 327-338.
263. Tatsuo, H.; Ono, N.; Tanaka, K.; Yanagi, Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **2000**, *406*, 893-897.
264. Mühlebach, M.D.; Mateo, M.; Sinn, P.L.; Prüfer, S.; Uhlig, K.M.; Leonard, V.H.; Navaratnarajah, C.K.; Frenzke, M.; Wong, X.X.; Sawatsky, B. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* **2011**, *480*, 530-533.
265. Dörig, R.E.; Marcil, A.; Chopra, A.; Richardson, C.D. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **1993**, *75*, 295-305.
266. Nanche, D.; Varior-Krishnan, G.; Cervoni, F.; Wild, T.; Rossi, B.; Roubourdin-Combe, C.a.; Gerlier, D. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *Journal of virology* **1993**, *67*, 6025-6032.
267. De Swart, R. Measles studies in the macaque model. *Measles: Pathogenesis and Control* **2009**, 55-72.
268. De Swart, R.L.; Ludlow, M.; De Witte, L.; Yanagi, Y.; Van Amerongen, G.; McQuaid, S.; Yüksel, S.; Geijtenbeek, T.B.; Duprex, W.P.; Osterhaus, A.D.E. Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* **2007**, *3*, e178.
269. Lemon, K.; de Vries, R.D.; Mesman, A.W.; McQuaid, S.; van Amerongen, G.; Yüksel, S.; Ludlow, M.; Rennick, L.J.; Kuiken, T.; Rima, B.K. Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathog* **2011**, *7*, e1001263.
270. Low, N.; Bavdekar, A.; Jeyaseelan, L.; Hirve, S.; Ramanathan, K.; Andrews, N.J.; Shaikh, N.; Jadi, R.S.; Rajagopal, A.; Brown, K.E. A randomized, controlled trial of an aerosolized vaccine against measles. *New England Journal of Medicine* **2015**, *372*, 1519-1529.
271. de Vries, R.D.; Lemon, K.; Ludlow, M.; McQuaid, S.; Yüksel, S.; van Amerongen, G.; Rennick, L.J.; Rima, B.K.; Osterhaus, A.D.; de Swart, R.L. In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. *Journal of virology* **2010**, *84*, 4714-4724.
272. Ludlow, M.; Lemon, K.; de Vries, R.D.; McQuaid, S.; Millar, E.L.; van Amerongen, G.; Yüksel, S.; Verburgh, R.J.; Osterhaus, A.D.; de Swart, R.L. Measles virus infection of epithelial cells in the

- macaque upper respiratory tract is mediated by subepithelial immune cells. *Journal of virology* **2013**, *87*, 4033-4042.
273. Han, A.; Czajkowski, L.M.; Donaldson, A.; Baus, H.A.; Reed, S.M.; Athota, R.S.; Bristol, T.; Rosas, L.A.; Cervantes-Medina, A.; Taubenberger, J.K. A dose-finding study of a wild-type influenza A (H3N2) virus in a healthy volunteer human challenge model. *Clinical Infectious Diseases* **2019**, *69*, 2082-2090.
274. Memoli, M.J.; Czajkowski, L.; Reed, S.; Athota, R.; Bristol, T.; Proudfoot, K.; Fargis, S.; Stein, M.; Dunfee, R.L.; Shaw, P.A. Validation of the wild-type influenza A human challenge model H1N1pdMIST: an A (H1N1) pdm09 dose-finding investigational new drug study. *Clinical Infectious Diseases* **2015**, *60*, 693-702.
275. Mills, J.; Van Kirk, J.E.; Wright, P.F.; Chanock, R.M.; Fishburne, I.E. Experimental respiratory syncytial virus infection of adults: possible mechanisms of resistance to infection and illness. *The Journal of Immunology* **1971**, *107*, 123-130.
276. Wonderlich, E.R.; Swan, Z.D.; Bissel, S.J.; Hartman, A.L.; Carney, J.P.; O'Malley, K.J.; Obadan, A.O.; Santos, J.; Walker, R.; Sturgeon, T.J. Widespread virus replication in alveoli drives acute respiratory distress syndrome in aerosolized H5N1 influenza infection of macaques. *The Journal of Immunology* **2017**, *198*, 1616-1626.
277. Lee, J.H.; Hammoud, D.A.; Cong, Y.; Huzella, L.M.; Castro, M.A.; Solomon, J.; Laux, J.; Lackemeyer, M.; Bohannon, J.K.; Rojas, O. The Use of Large-Particle Aerosol Exposure to Nipah Virus to Mimic Human Neurological Disease Manifestations in the African Green Monkey. *The Journal of infectious diseases* **2020**, *221*, S419-S430.
278. Chua, K.; Bellini, W.; Rota, P.; Harcourt, B.; Tamin, A.; Lam, S.; Ksiazek, T.; Rollin, P.; Zaki, S.; Shieh, W.-J. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* **2000**, *288*, 1432-1435.
279. Nikolay, B.; Salje, H.; Hossain, M.J.; Khan, A.D.; Sazzad, H.M.; Rahman, M.; Daszak, P.; Ströher, U.; Pulliam, J.R.; Kilpatrick, A.M. Transmission of Nipah virus—14 years of investigations in Bangladesh. *New England Journal of Medicine* **2019**, *380*, 1804-1814.
280. Pelissier, R.; Iampietro, M.; Horvat, B. Recent advances in the understanding of Nipah virus immunopathogenesis and anti-viral approaches. *F1000Research* **2019**, *8*.
281. Soman Pillai, V.; Krishna, G.; Valiya Veetil, M. Nipah virus: past outbreaks and future containment. *Viruses* **2020**, *12*, 465.
282. Luby, S.P. The pandemic potential of Nipah virus. *Antiviral research* **2013**, *100*, 38-43.
283. Geisbert, T.W.; Daddario-DiCaprio, K.M.; Hickey, A.C.; Smith, M.A.; Chan, Y.-P.; Wang, L.-F.; Mattapallil, J.J.; Geisbert, J.B.; Bossart, K.N.; Broder, C.C. Development of an acute and highly pathogenic nonhuman primate model of Nipah virus infection. *PLoS one* **2010**, *5*, e10690.
284. Cong, Y.; Lentz, M.R.; Lara, A.; Alexander, I.; Bartos, C.; Bohannon, J.K.; Hammoud, D.; Huzella, L.; Jahrling, P.B.; Janosko, K. Loss in lung volume and changes in the immune response demonstrate disease progression in African green monkeys infected by small-particle aerosol and intratracheal exposure to Nipah virus. *PLoS neglected tropical diseases* **2017**, *11*, e0005532.
285. Prasad, A.N.; Agans, K.N.; Sivasubramani, S.K.; Geisbert, J.B.; Borisevich, V.; Mire, C.E.; Lawrence, W.S.; Fenton, K.A.; Geisbert, T.W. A lethal aerosol exposure model of Nipah virus strain Bangladesh in African green monkeys. *The Journal of infectious diseases* **2020**, *221*, S431-S435.
286. Hammoud, D.A.; Lentz, M.R.; Lara, A.; Bohannon, J.K.; Feuerstein, I.; Huzella, L.; Jahrling, P.B.; Lackemeyer, M.; Laux, J.; Rojas, O. Aerosol exposure to intermediate size Nipah virus particles induces neurological disease in African green monkeys. *PLoS neglected tropical diseases* **2018**, *12*, e0006978.
287. Lara, A.; Cong, Y.; Jahrling, P.B.; Mednikov, M.; Postnikova, E.; Yu, S.; Munster, V.; Holbrook, M.R. Peripheral immune response in the African green monkey model following Nipah-Malaysia virus exposure by intermediate-size particle aerosol. *PLoS neglected tropical diseases* **2019**, *13*, e0007454.

288. Mathieu, C.; Porotto, M.; Figueira, T.N.; Horvat, B.; Moscona, A. Fusion inhibitory lipopeptides engineered for prophylaxis of Nipah virus in primates. *The Journal of Infectious Diseases* **2018**, *218*, 218-227.
289. Chapman, J.; Nichols, D.; Martinez, M.; Raymond, J. Animal models of orthopoxvirus infection. *Veterinary pathology* **2010**, *47*, 852-870.
290. Zaucha, G.M.; Jahrling, P.B.; Geisbert, T.W.; Swearingen, J.R.; Hensley, L. The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Laboratory investigation* **2001**, *81*, 1581-1600.
291. Aebersold, P. FDA experience with medical countermeasures under the animal rule. *Advances in preventive medicine* **2012**, *2012*.
292. Johnson, R.F.; Hammoud, D.A.; Lackemeyer, M.G.; Yellayi, S.; Solomon, J.; Bohannon, J.K.; Janosko, K.B.; Jett, C.; Cooper, K.; Blaney, J.E. Small particle aerosol inoculation of cowpox Brighton Red in rhesus monkeys results in a severe respiratory disease. *Virology* **2015**, *481*, 124-135.
293. Smith, A.L.; St Claire, M.; Yellayi, S.; Bollinger, L.; Jahrling, P.B.; Paragas, J.; Blaney, J.E.; Johnson, R.F. Intrabronchial inoculation of cynomolgus macaques with cowpox virus. *The Journal of general virology* **2012**, *93*, 159.
294. Johnson, R.F.; Yellayi, S.; Cann, J.A.; Johnson, A.; Smith, A.L.; Paragas, J.; Jahrling, P.B.; Blaney, J.E. Cowpox virus infection of cynomolgus macaques as a model of hemorrhagic smallpox. *Virology* **2011**, *418*, 102-112.
295. Johnson, R.F.; Hammoud, D.A.; Perry, D.L.; Solomon, J.; Moore, I.N.; Lackemeyer, M.G.; Bohannon, J.K.; Sayre, P.J.; Minai, M.; Papaneri, A.B. Exposure of rhesus monkeys to cowpox virus Brighton Red by large-particle aerosol droplets results in an upper respiratory tract disease. *The Journal of general virology* **2016**, *97*, 1942.
296. Mekibib, B.; Ariën, K.K. Aerosol transmission of filoviruses. *Viruses* **2016**, *8*, 148.
297. Hidalgo, J.; Richards, G.A.; Jiménez, J.I.S.; Baker, T.; Amin, P. Viral hemorrhagic fever in the tropics: Report from the task force on tropical diseases by the World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. *Journal of critical care* **2017**, *42*, 366-372.
298. Paessler, S.; Walker, D.H. Pathogenesis of the viral hemorrhagic fevers. *Annu Rev Pathol* **2013**, *8*, 411-440.
299. Osterholm, M.T.; Moore, K.A.; Kelley, N.S.; Brosseau, L.M.; Wong, G.; Murphy, F.A.; Peters, C.J.; LeDuc, J.W.; Russell, P.K.; Van Herp, M. Transmission of Ebola viruses: what we know and what we do not know. *MBio* **2015**, *6*.
300. Johnson, E.; Jaax, N.; White, J.; Jahrling, P. Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *International journal of experimental pathology* **1995**, *76*, 227.
301. Jaax, N.; Jahrling, P.; Geisbert, T.; Geisbert, J.; Steele, K.; McKee, K.; Nagley, D.; Johnson, E.; Jaax, G.; Peters, C. Transmission of Ebola virus (Zaire strain) to uninfected control monkeys in a biocontainment laboratory. *The Lancet* **1995**, *346*, 1669-1671.
302. Zumbrun, E.E.; Bloomfield, H.A.; Dye, J.M.; Hunter, T.C.; Dabisch, P.A.; Garza, N.L.; Bramel, N.R.; Baker, R.J.; Williams, R.D.; Nichols, D.K. A characterization of aerosolized Sudan virus infection in African green monkeys, cynomolgus macaques, and rhesus macaques. *Viruses* **2012**, *4*, 2115-2136.
303. Bohannon, J. EBOLA VIRUS INFECTION FOLLOWING A LARGE PARTICLE AEROSOL. **2020**.
304. Reed, D.S.; Lackemeyer, M.G.; Garza, N.L.; Sullivan, L.J.; Nichols, D.K. Aerosol exposure to Zaire ebolavirus in three nonhuman primate species: differences in disease course and clinical pathology. *Microbes and infection* **2011**, *13*, 930-936.
305. Twenhafel, N.; Mattix, M.; Johnson, J.; Robinson, C.; Pratt, W.; Cashman, K.; Wahl-Jensen, V.; Terry, C.; Olinger, G.; Hensley, L. Pathology of experimental aerosol Zaire ebolavirus infection in rhesus macaques. *Veterinary pathology* **2013**, *50*, 514-529.
306. Oliveira, M.; Mason-Buck, G.; Ballard, D.; Branicki, W.; Amorim, A. Biowarfare, bioterrorism and biocrime: a historical overview on microbial harmful applications. *Forensic science international* **2020**, 110366.

307. Weis, C.P.; Intrepido, A.J.; Miller, A.K.; Cowin, P.G.; Durno, M.A.; Gebhardt, J.S.; Bull, R. Secondary aerosolization of viable *Bacillus anthracis* spores in a contaminated US Senate Office. *Jama* **2002**, *288*, 2853-2858.
308. Vasconcelos, D.; Barnewall, R.; Babin, M.; Hunt, R.; Estep, J.; Nielsen, C.; Carnes, R.; Carney, J. Pathology of inhalation anthrax in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Laboratory Investigation* **2003**, *83*, 1201-1209.
309. Savransky, V.; Shearer, J.D.; Gaaney, M.R.; Sanford, D.C.; Sivko, G.S.; Stark, G.V.; Li, N.; Ionin, B.; Lacy, M.J.; Skiadopoulos, M.H. Correlation between anthrax lethal toxin neutralizing antibody levels and survival in guinea pigs and nonhuman primates vaccinated with the AV7909 anthrax vaccine candidate. *Vaccine* **2017**, *35*, 4952-4959.
310. Longstreth, J.; Skiadopoulos, M.H.; Hopkins, R.J. Licensure strategy for pre-and post-exposure prophylaxis of biothrax vaccine: the first vaccine licensed using the FDA animal rule. *Expert review of vaccines* **2016**, *15*, 1467-1479.
311. Lever, M.S.; Stagg, A.J.; Nelson, M.; Pearce, P.; Stevens, D.J.; Scott, E.A.; Simpson, A.J.; Fulop, M.J. Experimental respiratory anthrax infection in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *International journal of experimental pathology* **2008**, *89*, 171-179.
312. Hopkins, R.J.; Dackowski, N.F.; Kaptur, P.E.; Muse, D.; Sheldon, E.; LaForce, C.; Sari, S.; Rudge, T.L.; Bernton, E. Randomized, double-blind, placebo-controlled, safety and immunogenicity study of 4 formulations of Anthrax Vaccine Adsorbed plus CPG 7909 (AV7909) in healthy adult volunteers. *Vaccine* **2013**, *31*, 3051-3058.
313. Harper, G.; Morton, J. The respiratory retention of bacterial aerosols: experiments with radioactive spores. *Epidemiology & Infection* **1953**, *51*, 372-385.
314. Druett, H.; Henderson, D.; Packman, L.; Peacock, S. Studies on respiratory infection: I. The influence of particle size on respiratory infection with anthrax spores. *Epidemiology & Infection* **1953**, *51*, 359-371.
315. White, A.D.; Sarfas, C.; Sibley, L.S.; Gullick, J.; Clark, S.; Rayner, E.; Gleeson, F.; Català, M.; Nogueira, I.; Cardona, P.-J. Protective Efficacy of Inhaled BCG Vaccination Against Ultra-Low Dose Aerosol *M. tuberculosis* Challenge in Rhesus Macaques. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 394.
316. Sibley, L.; Dennis, M.; Sarfas, C.; White, A.; Clark, S.; Gleeson, F.; McIntyre, A.; Rayner, E.; Pearson, G.; Williams, A. Route of delivery to the airway influences the distribution of pulmonary disease but not the outcome of *Mycobacterium tuberculosis* infection in rhesus macaques. *Tuberculosis* **2016**, *96*, 141-149.
317. Sharpe, S.; White, A.; Sibley, L.; Gleeson, F.; Hall, G.; Basaraba, R.; McIntyre, A.; Clark, S.; Gooch, K.; Marsh, P. An aerosol challenge model of tuberculosis in Mauritian cynomolgus macaques. *PLoS One* **2017**, *12*, e0171906.
318. Day, W.C.; Berendt, R.F. Experimental tularemia in *Macaca mulatta*: relationship of aerosol particle size to the infectivity of airborne *Pasteurella tularensis*. *Infection and immunity* **1972**, *5*, 77-82.
319. Blundell, G.P.; Mulder, J.B.; Day, W.C.; Kerpsack, R.W. *Response of Monkeys to Pasteurella Tularensis: Histopathology of Tularemia Induced with Aerosols of Different Particle Size*; ARMY BIOLOGICAL LABS FREDERICK MD: 1962.
320. Goodlow, R.J.; Leonard, F.A. Viability and infectivity of microorganisms in experimental airborne infection. *Bacteriological reviews* **1961**, *25*, 182-187.
321. Warawa, J.; Shannon, J.G.; Bosio, C.M. Immunology of Bacterial Biodefense Agents: *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei*, and *Yersinia pestis*. **2016**.
322. Perry, R.D.; Fetherston, J.D. *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clinical microbiology reviews* **1997**, *10*, 35-66.
323. Van Andel, R.; Sherwood, R.; Gennings, C.; Lyons, C.R.; Hutt, J.; Gigliotti, A.; Barr, E. Clinical and pathologic features of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) infected with aerosolized *Yersinia pestis*. *Comparative medicine* **2008**, *58*, 68-75.

324. Warren, R.; Lockman, H.; Barnewall, R.; Krile, R.; Blanco, O.B.; Vasconcelos, D.; Price, J.; House, R.V.; Bolanowski, M.A.; Fellows, P. Cynomolgus macaque model for pneumonic plague. *Microbial pathogenesis* **2011**, *50*, 12-22.
325. Finegold, M.J. Pneumonic plague in monkeys. An electron microscopic study. *The American journal of pathology* **1969**, *54*, 167.
326. Layton, R.C.; Brasel, T.; Gigliotti, A.; Barr, E.; Storch, S.; Myers, L.; Hobbs, C.; Koster, F. Primary pneumonic plague in the African Green monkey as a model for treatment efficacy evaluation. *Journal of medical primatology* **2011**, *40*, 6-17.
327. Hewitt, J.A.; Lanning, L.L.; Campbell, J.L. The African green monkey model of pneumonic plague and US Food and Drug Administration approval of antimicrobials under the animal rule. *Clinical Infectious Diseases* **2020**, *70*, S51-S59.
328. Lavoie, J.; Cloutier, Y.; Lara, J.; Marchand, G. Guide sur la protection respiratoire contre les bioaérosols: recommandations sur le choix et l'utilisation. *Rapport RG* **2007**, 497.
329. Chen, H.Y.; Foo, L.Y.; Loke, W.K. Ricin and abrin: A comprehensive review of their toxicity, diagnosis, and treatment. *Toxinology. Dordrecht: Springer Netherlands* **2014**, 1-20.
330. Audi, J.; Belson, M.; Patel, M.; Schier, J.; Osterloh, J. Ricin poisoning: a comprehensive review. *Jama* **2005**, *294*, 2342-2351.
331. FM, A. TREATMENT OF BIOLOGICAL WARFARE AGENT CASUALTIES. **2000**.
332. Roy, C.; Reed, D.; Hutt, J. Aerobiology and inhalation exposure to biological select agents and toxins. *Veterinary pathology* **2010**, *47*, 779-789.
333. Bhaskaran, M.; Didier, P.J.; Sivasubramani, S.K.; Doyle, L.A.; Holley, J.; Roy, C.J. Pathology of lethal and sublethal doses of aerosolized ricin in rhesus macaques. *Toxicologic pathology* **2014**, *42*, 573-581.
334. Pincus, S.H.; Bhaskaran, M.; Brey III, R.N.; Didier, P.J.; Doyle-Meyers, L.A.; Roy, C.J. Clinical and pathological findings associated with aerosol exposure of macaques to ricin toxin. *Toxins* **2015**, *7*, 2121-2133.
335. Leffel, E.K.; Hartings, J.M.; Pitt, M.L.M.; Stevens, L.E. Comparison of deposition patterns for small and large particle aerosolized toxins and resulting disease in guinea pigs and African green monkeys. *Defence against the Effects of Chemical Hazards: Toxicology, Diagnosis, and Medical Countermeasures*.
336. Wolfe, D.N.; Florence, W.; Bryant, P. Current biodefense vaccine programs and challenges. *Human vaccines & immunotherapeutics* **2013**, *9*, 1591-1597.
337. Wilhelmsen, C.; Pitt, M. Lesions of acute inhaled lethal ricin intoxication in rhesus monkeys. *Veterinary pathology* **1996**, *33*, 296-302.
338. Nof, E.; Zidan, H.; Artzy-Schnirman, A.; Mouhadeb, O.; Beckerman, M.; Bhardwaj, S.; Elias-Kirma, S.; Gur, D.; Beth-Din, A.; Levenberg, S. Human multi-compartment airways-on-chip platform for emulating respiratory airborne transmission: from nose to pulmonary acini. *Frontiers in Physiology* **2022**, 400.
339. Valle, R.P.; Wu, T.; Zuo, Y.Y. Biophysical influence of airborne carbon nanomaterials on natural pulmonary surfactant. *ACS nano* **2015**, *9*, 5413-5421.
340. Testud, F.; Grillet, J. Insecticides organophosphorés, carbamates, pyrèthrinoïdes de synthèse et divers. *Encycl méd chir* **2007**, 16.
341. Rosenberg, Y.J.; Fink, J.B. Creation of a protective pulmonary bioshield against inhaled organophosphates using an aerosolized bioscavenger. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2016**, *1374*, 151.
342. Rosenberg, Y.J.; Mao, L.; Jiang, X.; Lees, J.; Zhang, L.; Radic, Z.; Taylor, P. Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reverses early and advanced symptoms in macaques exposed to sarin vapor. *Chemico-biological interactions* **2017**, *274*, 50-57.
343. Rosenberg, Y.; Fink, J.; MacLoughlin, R.; Ooms-Konecny, T.; Sullivan, D.; Gerk, W.; Mao, L.; Jiang, X.; Lees, J.; Urban, L. Aerosolized recombinant human butyrylcholinesterase delivered by a nebulizer provides long term protection against inhaled paraoxon in macaques. *Chemico-biological interactions* **2019**, *309*, 108712.

344. Russell, W.M.S.; Burch, R.L. *The principles of humane experimental technique*; Methuen: 1959.
345. Hartings, J.M.; Roy, C.J. The automated bioaerosol exposure system: preclinical platform development and a respiratory dosimetry application with nonhuman primates. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **2004**, *49*, 39-55.
346. Bowling, J. Challenging the gold standard: alternatives to the collision for aerosol generation in research. University of Pittsburgh, 2016.
347. Council, N.R. Overcoming challenges to develop countermeasures against aerosolized bioterrorism agents: appropriate use of animal models. **2006**.
348. Barnewall, R.E.; Fisher, D.A.; Robertson, A.B.; Vales, P.A.; Knostman, K.A.; Bigger, J.E. I. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2012**, *2*, 117.
349. Heuer, J.F.; Crozier, T.A.; Howard, G.; Quintel, M. Can breathing circuit filters help prevent the spread of influenza A (H1N1) virus from intubated patients? *GMS Hygiene and infection control* **2013**, *8*.
350. Bartrand, T.A.; Weir, M.H.; Haas, C.N. Dose-response models for inhalation of Bacillus anthracis spores: interspecies comparisons. *Risk Analysis: An International Journal* **2008**, *28*, 1115-1124.
351. Jernigan, D.B.; Raghunathan, P.L.; Bell, B.P.; Brechner, R.; Bresnitz, E.A.; Butler, J.C.; Cetron, M.; Cohen, M.; Doyle, T.; Fischer, M. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerging infectious diseases* **2002**, *8*, 1019-1028.
352. Dubois, T.; Faegri, K.; Perchat, S.; Lemy, C.; Buisson, C.; Nielsen-LeRoux, C.; Gohar, M.; Jacques, P.; Ramarao, N.; Kolstø, A.-B. Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in Bacillus thuringiensis. *PLoS pathogens* **2012**, *8*, e1002629.
353. Stewart, G.C. The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2015**, *79*, 437-457.
354. Setlow, P. Spore germination. *Current opinion in microbiology* **2003**, *6*, 550-556.
355. Cleret, A. Etude des interactions entre les cellules dendritiques pulmonaires murines et Bacillus anthracis. Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2007.
356. Sella, S.R.; Vandenberghe, L.P.; Soccol, C.R. Bacillus atrophaeus: main characteristics and biotechnological applications—a review. *Critical reviews in biotechnology* **2015**, *35*, 533-545.
357. Stanley, J.; Smith, H.; Sargeant, K.; Stanley, J. Purification of factor I and recognition of a third factor of the anthrax toxin. *Microbiology* **1961**, *26*, 49-66.
358. Lowe, D.E.; Glomski, I.J. Cellular and physiological effects of anthrax exotoxin and its relevance to disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2012**, *2*, 76.
359. Strom, B.L.; Durch, J.S.; Zwanziger, L.L.; Joellenbeck, L.M. The anthrax vaccine: is it safe? Does it work? **2002**.
360. Turnbull, P.C. Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine* **1991**, *9*, 533-539.
361. Cassier, M. Appropriation and commercialization of the Pasteur anthrax vaccine. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* **2005**, *36*, 722-742.
362. Nakamura, L. Taxonomic Relationship of Black-Pigmented Bacillus subtilis Strains and a Proposal for Bacillus atrophaeus sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1989**, *39*, 295-300.
363. Leighton, T.; Doi, R.H. The stability of messenger ribonucleic acid during sporulation in Bacillus subtilis. *Journal of Biological Chemistry* **1971**, *246*, 3189-3195.
364. Respaud, R.; Marchand, D.; Parent, C.; Pelat, T.; Thullier, P.; Tournamille, J.-F.; Viaud-Massuard, M.-C.; Diot, P.; Si-Tahar, M.; Vecellio, L. Effect of formulation on the stability and aerosol performance of a nebulized antibody. In Proceedings of the MAbs, 2014; pp. 1347-1355.
365. Le Guellec, S.; Pardessus, J.; Bodier-Montagutelli, E.; L'hostis, G.; Dalloneau, E.; Piel, D.; Samai, H.C.; Guillon, A.; Mujic, E.; Guillot-Combe, E. Administration of Bacteriophages via

- Nebulization during Mechanical Ventilation: In Vitro Study and Lung Deposition in Macaques. *Viruses* **2023**, *15*, 602.
366. Mayor, A.; Chesnay, A.; Desoubeaux, G.; Ternant, D.; Heuzé-Vourc'h, N.; Sécher, T. Therapeutic antibodies for the treatment of respiratory tract infections—Current overview and perspectives. *Vaccines* **2021**, *9*, 151.
367. Lai, S.K.; McSweeney, M.D.; Pickles, R.J. Learning from past failures: Challenges with monoclonal antibody therapies for COVID-19. *Journal of Controlled Release* **2021**, *329*, 87-95.
368. Hickey, A.J.; Stewart, I.E. Inhaled antibodies: Quality and performance considerations. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **2022**, *18*, 1940650.
369. Respaud, R.; Vecellio, L.; Diot, P.; Heuzé-Vourc'h, N. Nebulization as a delivery method for mAbs in respiratory diseases. *Expert opinion on drug delivery* **2015**, *12*, 1027-1039.
370. Benoît Delache, C.H., Paule Hermet, Andres Männik, Quentin Sconosciuti, Francis Relouzat, Asma Berriche, Thibaut Nanninck, Nathalie Deureudde-Bosquet, Roger Le Grand and Mart Ustav Jr., A monoclonal anti-SARS-COV-2 IgG administered by intravenous or nebulization route reduces viral load in upper and lower respiratory tract In Proceedings of the Drug Delivery to the Lungs (DDL), 2023.
371. Benoît Delache^{1*}, C.H., Paule Hermet², Andres Männik², Quentin Sconosciuti¹, Francis Relouzat¹, Asma Berriche¹, Thibaut Nanninck¹, Nathalie Deureudde-Bosquet¹, Roger Le Grand¹ and Mart Ustav Jr², A monoclonal anti-SARS-COV-2 IgG administered by intravenous or nebulization route reduces viral load in upper and lower respiratory tract 2023.
372. Ari, A. Jet, ultrasonic, and mesh nebulizers: an evaluation of nebulizers for better clinical outcomes. **2014**.
373. Kesavan, J.S.; Altstadt, V.J.; Laube, B.L. Aerosol deposition in 3D models of the upper airways and trachea of rhesus macaques. *Aerosol Science and Technology* **2020**, 1-9.
374. Kelly, J.T.; Asgharian, B.; Wong, B.A. Inertial particle deposition in a monkey nasal mold compared with that in human nasal replicas. *Inhalation toxicology* **2005**, *17*, 823-830.
375. Peters, C.; Hartley, D. Anthrax inhalation and lethal human infection. *The Lancet* **2002**, *359*, 710-711.
376. Gauthier, Y.P.; Tournier, J.-N.; Paucod, J.-C.; Corre, J.-P.; Mock, M.; Goossens, P.L.; Vidal, D.R. Efficacy of a vaccine based on protective antigen and killed spores against experimental inhalational anthrax. *Infection and immunity* **2009**, *77*, 1197-1207.
377. Hartman, A.L.; Powell, D.S.; Bethel, L.M.; Caroline, A.L.; Schmid, R.J.; Oury, T.; Reed, D.S. Aerosolized rift valley fever virus causes fatal encephalitis in african green monkeys and common marmosets. *Journal of virology* **2014**, *88*, 2235-2245.
378. Verbanck, S.; Ghorbaniasl, G.; Biddiscombe, M.F.; Dragojlovic, D.; Ricks, N.; Lacor, C.; Ilse, B.; de Mey, J.; Schuermans, D.; Underwood, S.R. Inhaled aerosol distribution in human airways: a scintigraphy-guided study in a 3D printed model. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* **2016**, *29*, 525-533.
379. Alexander, D.J.; Collins, C.J.; Coombs, D.W.; Gilkison, I.S.; Hardy, C.J.; Healey, G.; Karantabias, G.; Johnson, N.; Karlsson, A.; Kilgour, J.D. Association of Inhalation Toxicologists (AIT) working party recommendation for standard delivered dose calculation and expression in non-clinical aerosol inhalation toxicology studies with pharmaceuticals. *Inhalation toxicology* **2008**, *20*, 1179-1189.

ANNEXES

ANNEXE 1- Calcul de la Dose dans les études d'inhalation.

Les calculs de la dose inhalée et biodistribuée dans les études d'inhalation sont complexes et non standardisés.

Alexander et al., 2008 [379] démontrent qu'il est difficile de comprendre et de déterminer la notion de dose dans les études d'inhalation car elle fait référence en réalité à différentes mesures, d'où la confusion possible pour les novices ou même les chercheurs expérimentés du domaine. Dans ces conditions, une standardisation de la terminologie et des définitions s'avère nécessaire pour une harmonisation des calculs et des déterminations des doses lors des études d'inhalation [26]. De plus, dans ce rapport, ces auteurs démontrent comme nous l'avons schématisé dans la figure 2 de la revue de littérature, qu'il y a diverses pertes tout le long du circuit, du dispositif d'inhalation ou d'administration des aérosols jusqu'à l'arrivée dans le tractus respiratoire. La dose initiale administrée par inhalation est donc différente de la dose biodistribuée dans le tractus respiratoire.

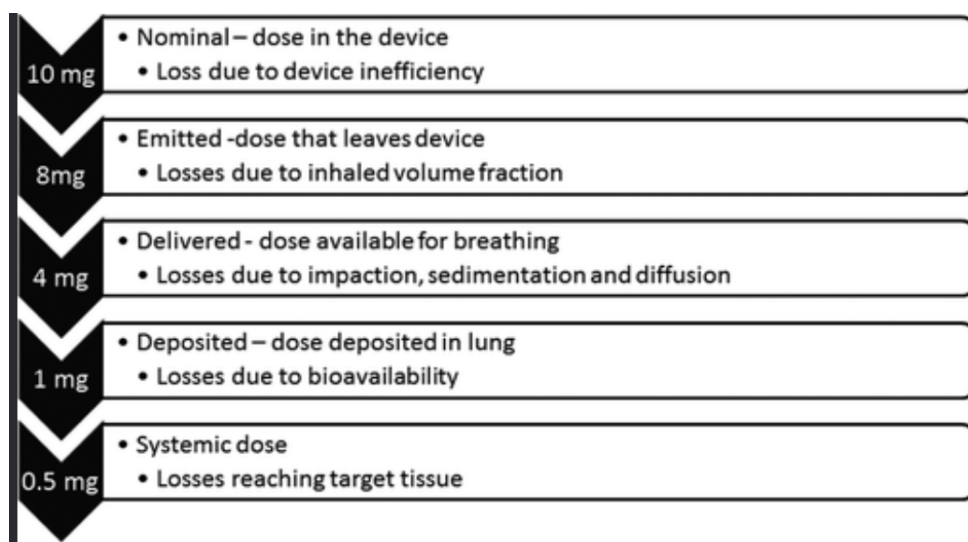


Schéma d'après Tepper et al.,[26] illustrant la biodisponibilité d'un médicament administrée sous forme inhalée. Les facteurs impliqués entre la dose délivrée par le dispositif d'administration (dose initiale) et la dose atteignant les poumons puis la circulation systémique, doses délivrées, y sont mentionnés.

D'après Paracelse, « Tout est poison, et rien n'est poison, c'est la dose qui fait le poison » cette citation datant du 15^{ème} siècle du médecin Paracelse pose la question du choix du seuil ou de la dose d'une substance. Elle est donc applicable dans le domaine des aérosols pour la détermination de la dose inhalée. Tepper et al., 2016 [26] affirment aussi dans un résumé exhaustif à la suite d'un symposium sur les études

de développement de médicaments par voie inhalée que la détermination de la dose inhalée est complexe dans la science des aérosols pour une étude d'inhalation car elle dépend de différents paramètres qui sont tels que lorsqu'un seul varie, la dose est modifiée. Cependant, un consortium de toxicologues travaillant sur les particules inhalées a tenté d'établir diverses équations définissant la dose délivrée (Delivered Dose ou DD) à déterminer dans les études réglementaires de toxicologie préclinique portant sur l'inhalation d'aérosols thérapeutiques. Ils affirment [26,379] que la dose délivrée ou DD doit idéalement être exprimée en mg/Kg.

Équation déterminant la dose inhalée

$$\text{Dose (mg/kg/d)} = (\text{C (mg/L)} \times \text{RMV (L/min)} \times \text{D (min)} \times \text{DF/}) \text{BWT (kg)}$$

C représente la concentration en mg/L dans l'air inhalé (concentration d'aérosol) ; **RMV** le volume respiratoire par minute (L/min), **D** est la durée d'exposition exprimée en minute, **DF** la fraction déposée et **BWT** le poids de l'espèce animal exprimée en kg. Le **d** signifie day (Jour (j)).

Le **RMV** est calculée comme suit pour les espèces animales utilisés dans les études précliniques : $\text{RMV}^* = 0,608 \times \text{BW (kg)}^{0,852}$.

Une autre possibilité pour calculer la dose à inhaler, aussi nommée « presented dose » est présentée selon l'équation qui suit :

$$D_{\text{inh}} = [(C \times V_i)(S \times T)^{-1}] \times (V_{\text{inh}}) = C_a \times V_{\text{inh}}$$

D_{inh} = Total inhaled dose (PFU)

C = Filter sample concentration (PFU/mL)

V_i = Filter sample volume (mL)

S = Filter sampling rate (L/min)

T = Exposure time (min)

V_{inh} = Total inhaled tidal volume (L), as determined by plethysmography

C_a = Aerosol concentration (PFU/L)

Au sein du système « *Head Only Exposure* » la dose totale inhalée (D_{inh}) d'un agent infectieux, peut se calculer automatiquement selon l'équation ci-dessus [348]. *L'encadré rouge dans l'équation est la formule de la concentration de l'aérosol généré.*

ANNEXE 2- Détail du cahier des charges des dispositifs développés.

L'Agence Innovation Défense (AID) et l'Institut de Recherche Biomédicales des Armées (IRBA) pour la conception du système d'administration d'aérosols chez le Primate Non Humain (PNH).

Dans sa conception, le dispositif prototype répond aux besoins spécifiques de la DGA, du CEA, et du CEPR (Centre d'Études des Pathologies Respiratoires) à savoir être capable de générer des aérosols thérapeutiques ou infectieux.

Ce cahier des charges indique les spécifications, et a permis de définir, les ressources, les attentes et les besoins en termes de conception et de maniabilité pour le développement des outils d'administration d'aérosols chez le PNH.

Description du cahier des charges pour la mise au point de systèmes de génération d'aérosols liquides chez le Primates Non Humain

Les éléments du cahier des charges sont les suivants :

1-Modèle d'étude

Le modèle animal d'étude choisi est le PNH (Cf. Revue de la littérature). Nous travaillons dans cette thèse sur le genre *Macacca* et l'espèce *fascicularis*.

La position de l'animal durant la nébulisation a été abordée. Les dispositifs seront testés sur les macaques en fonction des contraintes imposés dans chaque laboratoire. Par exemple le CEPR de Tours dispose d'une chaise de contention permettant l'administration d'aérosols, chez le PNH assis. Cette chaise n'étant pas disponible au CEA-IDMIT, l'aérosolisation ne pouvait se faire qu'avec l'animal en position de décubitus dorsal.

2- Performances du générateur prototype, lors des administrations d'aérosols

Le générateur prototype doit pouvoir administrer des bioaérosols (infectieux ou non) et des aérosols thérapeutiques. Il doit prioritairement pouvoir administrer des aérosols infectieux ou simulacres d'aérosols infectieux. Ce dispositif prototype doit également être en mesure d'administrer à l'aide d'un masque (masque nez- bouche) des bioaérosols viables.

3- Ciblage des voies respiratoires

Les aérosols générés doivent cibler l'ensemble des voies aériennes respiratoires du macaque pour mimer une exposition proche d'une attaque malveillante environnementale. On entend par ensemble les voies respiratoires : les voies respiratoires supérieures et les voies respiratoires inférieures (VAI) (poumons central et poumon périphérique).

Par conséquent, des générateurs d'aérosols permettant d'obtenir une taille d'aérosols

permettant ce ciblage de l'ensemble des voies respiratoires chez le macaque ont été sélectionnés.

4-Stabilité de l'aérosol généré par le dispositif

L'objectif étant de simuler une exposition réelle, il est important d'exposer l'animal à un aérosol à concentration constante, durant toute l'exposition. L'autre possibilité aurait été d'avoir des bolus d'aérosols durant la période d'exposition. Le but a été de tenter d'avoir une relation linéaire entre la durée d'exposition et la quantité déposée dans les voies aériennes respiratoires.

Pour cela, une mesure de la concentration de l'aérosol, par intervalle d'une minute, à l'aide d'un compteur optique de particule a été effectuée.

En parallèle, la stabilité des gouttelettes d'aérosols générées par le dispositif prototype au cours du temps a été évaluée en mesurant la tailles des particules d'aérosols s'impactant sur les différents plateaux d'un impacteur en cascade de type NGI.

5- Robustesse du dispositif

Le dispositif d'administration développé est robuste et il a été pensé et conçu pour être à usage unique afin d'éviter tout risque de contamination. En effet, dans le cas où le dispositif servira à l'administration de pathogènes hautement toxiques, le dispositif doit pouvoir être détruit.

Dans le cadre d'une administration de Micro-organisme et Toxines (MOT) il n'est pas aisé de procéder à une décontamination des outils utilisés (par exemples les bactéries sporulantes ont des spores très résistantes). L'idée d'un système lavable à l'hypochlorite (javel), ou désinfecté par d'autres procédés comme la peroxydation ou l'autoclavage, doit être abandonnée afin de ne pas endommager le dispositif ou réduire ses performances au fur et à mesure des lavages. Tout ceci explique la nécessité d'un dispositif robuste à usage unique pour chaque pathogène.

6- Suivi des paramètres respiratoires de l'animal

L'idée est de disposer d'un outil de mesure des paramètres respiratoires de l'animal, en ventilation spontanée durant la nébulisation. Cet outil, peut être un spiromètre ou un pléthysmographie adaptable au macaque.

7- Hygiène et Sécurité : L'expérimentateur, l'animal et l'environnement

Cette étude, a nécessité d'obtenir en amont des autorisations réglementaires.

Les délais d'autorisations ont été pris en compte notamment pour l'utilisation des spores de *Bacillus anthracis* chez le macaque au sein des installations CEA-IDMIT. Dans

le cas où ces autorisations ne seraient pas accordées, des alternatives aux spores pathogènes ont été prévues. Il s'agit de spores atténuées non pathogènes : spores de *Bacillus atrophaeus*.

Nous avons prévu le cas échant de transporter l'animal post-nébulisation avec un agent infectieux, selon une procédure qui éviterait de contaminer l'enceinte dans laquelle se déroulera la nébulisation. Et en cas d'une éventuelle contamination, une procédure rapide de décontamination a été mise en place et validée.

8- Les coûts de notre dispositif : son évolution dans le temps et la veille concurrentielle

Concernant l'aspect financier, nous avons convenu de ne pas dépasser un coût total de 1000 euros par exposition à un agent infectieux chez un animal soit pour un essai de nébulisation.

Le faible coût des dispositifs de génération d'aérosols utilisés rend aisée cette condition (pour information un nébuliseur à tamis ou à membrane de type Aerogen® à un coût unitaire d'environ 30 euros, le coût est inférieur pour un jet nébuliseur).

De plus, il est important de garantir l'approvisionnement des composants du dispositif de nébulisation. Nous avons pensé aux choix de plusieurs entreprises (si possible françaises) afin de faire jouer la concurrence et ne pas nous retrouver bloqués, si les fournisseurs sont hors de France ou hors d'Europe, ou encore en cas de rupture de stocks chez l'un d'entre eux.

L'autre option possible est l'utilisation de l'impression 3D à partir d'un plan de nébuliseur pneumatique permettant ainsi une indépendance totale des utilisateurs vis à vis des fabricants de nébuliseurs.

Il est important de noter que ce cahier des charges répond aux prérequis nécessaires pour l'administration d'aérosols d'agents biologiques, rédigés et suggérés par le comité du « **National Research Council (US) Committee on Animal Models for Testing Interventions Against Aerosolized Bioterrorism Agents** » [347].

Le comité recommande d'inclure dans tout rapport sur la génération d'aérosols les **5 points** décrits et encadrés dans **le résumé qui suit** : 1) **Les caractéristiques** de l'aérosol généré ; 2) **La métrologie de l'aérosol généré** ; 3) Le **système de biocollection** de l'aérosol généré dans le cas de la nébulisation de microorganismes ; 4) **Le système d'exposition de l'animal aux aérosols** ; 5) **Les informations sur l'espèce animal utilisé.**

Dans son élaboration et sa conception, le cahier des charges précédemment décrit tente de répondre aux 5 critères établis par ce comité d'experts américains dans l'image qui suit.

Aerosol-generation information

1. Type of aerosol generator, including manufacturer name and location
 2. Identification of aerosol vehicle (e.g., water, phosphate-buffered saline, glycerol, lactose)
-

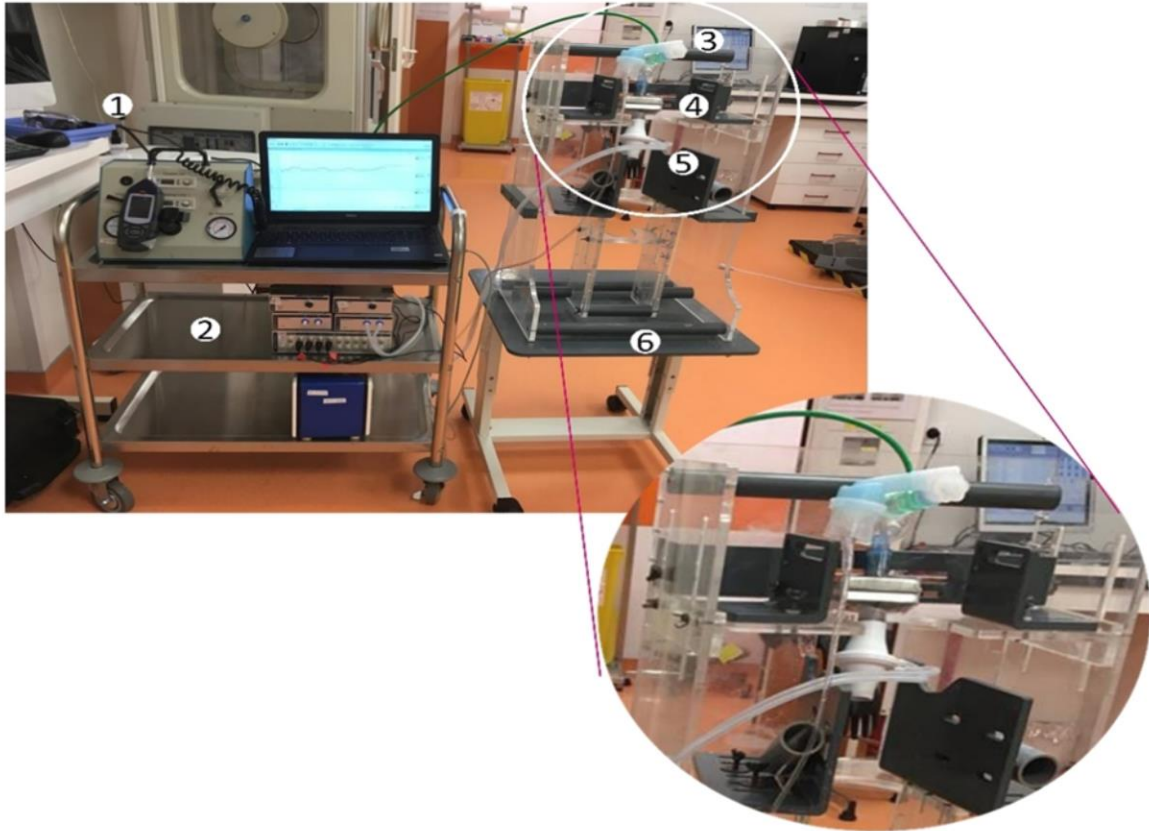
Particle-size information, depending on type of instrument used

1. MMAD
 2. GSD
 3. Volume median diameter ($V_{0.50}$)
 4. Type of particle-sizing instrument used, including manufacturer name and location
 5. Sampling time and flow rate
 6. Calibration method for the particle sizing instrument
-

Impinger information, if aerosolizing microorganisms

1. Type of impinger
2. Sampling time and flow rate
3. Indication of whether impinger was sterilized, and method used
4. Estimate of microorganism viability and how estimate was obtained

ANNEXE 3- Station d'analyse du prototype de type Jet connecté au spiromètre et au compteur de particules.



Constant concentration method

- 1 - Optical counter (concentration)**
- 2 - Spirometer (Respiratory volume)**
- 3 - Concentration sampling**
- 4 - Exhaled particles filter**
- 5 - Spirometer (air flow sensor)**
- 6 - Macaque special aerosol chair**

Station de montage du prototype de type Jet connecté au spiromètre et au compteur de particules

ANNEXE 4 - Brevet 1 : Système de nébulisation fonctionnant avec un air humide**Description****Titre de l'invention : SYSTÈME DE NÉBULISATION****DOMAINE DE L'INVENTION**

[0001] La présente invention concerne un système de nébulisation et son utilisation pour générer un aérosol stable au cours du temps qui présente une forte concentration, une large gamme de taille de gouttelettes et mettant en œuvre des liquides sur une large gamme de viscosité.

ÉTAT DE LA TECHNIQUE

[0002] Un aérosol liquide est un mélange biphasique comprenant des gouttelettes et un gaz qui est le plus généralement de l'air. L'aérosolthérapie consiste en l'administration de cet aérosol dans les voies respiratoires (ou voies aériennes) d'un sujet.

[0003] L'étude de l'effet des aérosols inhalés sur les voies respiratoires nécessite de contrôler et connaître la quantité de principe actif déposé dans les voies respiratoires. Cette quantité est calculée sur base, notamment, de la concentration de principe actif dans l'aérosol.

[0004] Dans ce contexte d'étude, les textes réglementaires imposent une stabilité de la concentration de manière à produire un aérosol dont la concentration en principe actif varie de moins de 20% (variation relative) dans les chambres d'exposition. Puisque la durée d'exposition durant une étude peut être de plusieurs heures, il est nécessaire de réaliser une génération d'aérosol avec une concentration stable dans le temps.

[0005] Cependant, les systèmes de nébulisation connus ne sont pas satisfaisants.

[0006] En effet, un premier système connu est la nébulisation pneumatique qui utilise une source de gaz comprimé injecté en continu dans une chambre de nébulisation (ou nébuliseur) comprenant le liquide à nébuliser. Le liquide est alors atomisé en formant des gouttelettes en suspension dans l'air de la chambre de nébulisation. Au cours de la nébulisation, il se produit un phénomène de recyclage et d'évaporation au sein du réservoir du nébuliseur qui a pour conséquence une augmentation de la concentration en principe actif du liquide à nébuliser contenu dans le réservoir au cours du temps.

[0007] En effet, le liquide à nébuliser est une solution comprenant un principe actif dont la pression de vapeur saturante est moins élevée que le solvant (généralement de l'eau) dans lequel il est mélangé. Ainsi, l'atmosphère dans la chambre de nébulisation formée par le gaz injecté aura pour effet d'évaporer le solvant plus rapidement que le principe actif. Il en résulte que la concentration de principe actif dans le liquide à nébuliser augmentera à mesure que le solvant s'évaporerait. Les gouttelettes d'aérosol présentent (à leur création) la même concentration en principe actif que le liquide à nébuliser. Ainsi, la concentration en principe actif des gouttelettes va aussi augmenter au cours de

la nébulisation. De plus, durant le transport des gouttelettes vers la sortie du nébuliseur, le phénomène d'évaporation continue de se produire sur ces dernières ce qui augmentera d'autant plus la concentration en principe actif des gouttelettes jusqu'à leur inhalation.

- [0008] De plus, l'agencement géométrique de certains types de nébuliseurs pneumatiques tels que les nébuliseurs Pari (marque déposée) ou Sidestream (marque déposée) générant un flux d'aérosol en direction du liquide dans le réservoir, favorisent l'impaction des gouttelettes dans le liquide contenu dans le réservoir. Un volume de liquide plus important favorise davantage l'impaction des gouttelettes en comparaison d'un plus faible volume de liquide dans le réservoir. En conséquence, le débit et la taille des particules augmentent au cours du temps lorsque le liquide est nébulisé au fur et à mesure (diminution du volume du liquide contenu dans le réservoir). Ces types de nébuliseurs ne permettent donc pas de générer un aérosol stable au cours du temps.
- [0009] Un autre système connu est un système de Blam qui consiste à amener le liquide à nébuliser dans le nébuliseur par une pompe à débit continu et constant. Le gaz acheminé avec un débit constant vient atomiser le liquide injecté. Une sélection est ensuite opérée sur les gouttelettes de manière à ce que seules les gouttelettes de petite taille soient transportées en dehors du nébuliseur pour être inhalées. Les gouttelettes les plus grosses sont dirigées hors de la chambre de nébulisation et sont destinées à être éliminées. Ce système permet d'éviter le recyclage et l'évaporation du liquide avant nébulisation. Cependant, ce système génère une très faible concentration d'aérosol liquide (0.001mg/m^3 - 0.01g/m^3 en concentration en masse des gouttelettes) et produit une grande quantité de déchet (typiquement plus de 98% de l'aérosol est éliminé).
- [0010] Finalement, certains systèmes connus utilisent une technologie de tamis vibrant. Le liquide à nébuliser en contact avec le tamis est alors expulsé au travers des orifices du tamis pour se mélanger au gaz. Les concentrations de gouttelettes produites sont plus importantes qu'avec le système Blam. Cependant, ce système présente des problèmes de bouchage des orifices du tamis pouvant altérer son fonctionnement et donc le débit de gouttelettes et par conséquent la concentration de principe actif au cours du temps. De plus, le nébuliseur à tamis ne permet pas de nébuliser des solutions avec une forte viscosité ni de faibles tailles de gouttelettes inférieures à $2\ \mu\text{m}$ contrairement au nébuliseur pneumatique.
- [0011] Il y a donc un besoin d'un système de nébulisation qui permet d'éviter un ou plusieurs de ces problèmes en favorisant la génération d'un aérosol de concentration en principe actif haute et stable au cours du temps, une large gamme de tailles de gouttelettes et mettant en œuvre des liquides sur une large gamme de viscosité.
- [0012] Le but de l'invention est de fournir un système de nébulisation comprenant un réservoir apte à recevoir un liquide à nébuliser comprenant une buse à deux fluides

ainsi qu'une source de gaz humide injectant un gaz d'humidité contrôlée dans le réservoir.

RÉSUMÉ

[0013] Dans ce but, la présente invention concerne un système de nébulisation comprenant :

[0014] a) Un dispositif comprenant :

- Un réservoir comprenant une buse de gaz définissant un axe de nébulisation et comprenant une première ouverture située à l'intérieur du réservoir, le réservoir étant apte à recevoir un liquide à nébuliser,
- Une buse de nébulisation superposée à la buse de gaz comprenant une deuxième ouverture,
- Un distributeur monté sur le réservoir, le distributeur étant aligné avec l'axe de nébulisation pour acheminer l'aérosol hors du réservoir,

la buse de nébulisation et la buse de gaz formant une buse de nébulisation à deux fluides comprenant :

- Un canal gaz à l'intérieur de la buse de gaz,
- Un canal liquide entre la buse de nébulisation et la buse de gaz, et
- Une zone de nébulisation à l'intersection du canal gaz et du canal liquide, la sortie de la zone de nébulisation correspondant à la deuxième ouverture, et

b) Une source de gaz humide qui alimente le canal gaz de manière à injecter un gaz humide d'humidité contrôlée dans le réservoir, l'injection de gaz humide permettant d'aspirer le liquide à nébuliser dans le canal liquide.

[0015] En effet, la géométrie du dispositif et l'injection de gaz humide d'humidité contrôlée permet la production d'un aérosol à forte concentration (0.1-1 g/m³ en concentration en masse de gouttelettes) présentant une large gamme de tailles de gouttelettes (50 nm-10 microns) et mettant en œuvre des liquides sur une large gamme de viscosité (0.1-200 cP). De plus, cela limite l'évaporation du liquide et des gouttelettes dans le réservoir ce qui permet de ne pas augmenter la concentration du principe actif contenu dans l'aérosol au cours du temps.

[0016] Selon un autre aspect avantageux, l'invention présente les caractéristiques suivantes prises isolément ou en combinaison :

- au moins une partie du distributeur présente un angle compris entre 30° et 70° par rapport à l'axe de nébulisation ;
- la buse de nébulisation à deux fluides comprend un déflecteur situé à la sortie de la zone de nébulisation.

[0017] En effet, les deux modes de réalisation permettent de faciliter la sélection des gouttelettes en fonction de leur taille. L'utilisation du déflecteur permet en outre une fragmentation supplémentaire des gouttelettes et donc une augmentation de rendement.

[0018] Selon un autre aspect avantageux de l'invention, la première ouverture présente une

première taille et la deuxième ouverture présente une deuxième taille supérieure à la première taille, la première ouverture étant alignée avec la deuxième ouverture et la première ouverture et la deuxième ouverture étant perpendiculaires à l'axe de nébulisation

[0019] En effet, cette différence de taille permet d'optimiser la quantité d'aérosol produit et la taille des gouttelettes.

[0020] Selon un autre aspect avantageux, l'invention présente les caractéristiques suivantes prises isolément ou en combinaison :

- la première taille est comprise entre 0.1 mm et 1 mm et la deuxième taille est comprise entre 0.2 mm et 2 mm ;
- la buse de nébulisation présente une paroi interne et la buse de gaz présente une paroi externe, la paroi interne étant écartée de 0.2 mm à 2 mm de la paroi externe ;
- la source de gaz humide comprend une source de gaz et un dispositif d'humidification connecté à la source de gaz et à la buse de gaz, le dispositif d'humidification étant configuré pour humidifier un gaz provenant de la source de gaz ;
- le dispositif d'humidification est un nébuliseur ;
- le dispositif d'humidification comprend une plaque chauffante ;
- le dispositif d'humidification comprend un filtre de sortie ;
- le dispositif d'humidification est un bulleur.

[0021] De plus, l'invention concerne aussi un procédé de génération d'un aérosol comprenant les étapes de :

- Fournir le système de nébulisation selon un des modes de réalisation ci-dessus,
- Introduire un liquide à nébuliser dans le réservoir,
- Fournir, à partir de la source de gaz humide, un gaz humide avec une pression constante comprise entre 0.1 bar et 10 bar et une humidité contrôlée d'humidité relative supérieure à 60%,
- Injecter le gaz humide d'humidité contrôlée dans le réservoir via le canal gaz.

DÉFINITIONS

[0022] Dans la présente invention, les termes ci-dessous sont définis de la manière suivante :

- « **Buse de nébulisation à deux fluides** » concerne un agencement de deux buses permettant l'aspiration du liquide à nébuliser par l'effet Venturi. Cet effet est produit lorsque deux buses sont superposées de manière à créer un interstice entre la paroi interne de la buse externe et la paroi externe de la buse interne. Ainsi, lorsque la buse externe est partiellement plongée dans un liquide et qu'un gaz est injecté dans la buse interne, une dépression est créée

dans l'interstice permettant l'aspiration du liquide.

- « **Concentration en principe actif** » concerne, pour un aérosol, la concentration en principe actif – réparti dans les gouttelettes – au moment de l'inhalation, c'est-à-dire la quantité de principe actif (en gramme) contenue dans l'air (en m³) au moment de l'inhalation.
- « **Concentration en masse de gouttelettes** » concerne, pour un aérosol, la masse de gouttelette d'aérosol (en gramme) contenue dans l'air (en m³).
- « **Grosse gouttelette** » concerne une gouttelette présentant un diamètre plus grand ou égal à 5 µm.
- « **Petite gouttelette** » concerne une gouttelette présentant un diamètre plus petit ou égal à 5 µm.

BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES

[0023] D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention ressortiront de la description faite ci-dessous, en référence aux dessins annexés qui en illustrent des exemples de réalisation dépourvus de tout caractère limitatif. Sur les figures :

[0024] [Fig.1] montre un système de nébulisation selon un mode de réalisation de l'invention.

[0025] [Fig.2] montre la géométrie du dispositif de nébulisation selon un mode de réalisation de l'invention.

[0026] [Fig.3] schématise le fonctionnement du système selon l'invention.

[0027] [Fig.4] montre le dispositif de nébulisation comprenant un déflecteur (137).

[0028] [Fig.5] montre le dispositif de nébulisation dans lequel le distributeur (120) est incliné.

[0029] [Fig.6] montre le système de nébulisation dans lequel le dispositif d'humidification (210) est un nébuliseur.

[0030] [Fig.7] compare la variation de la concentration de principe actif en fonction de la durée de nébulisation avec un dispositif de l'art antérieur et un dispositif selon un mode de réalisation de l'invention.

[0031] [Fig.8] montre l'efficacité de dépôt de l'aérosol dans les voies respiratoires.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE

[0032] La [Fig.1] montre un système de nébulisation comprenant un dispositif 100 et une source de gaz humide 200.

[0033] Le dispositif 100 comprend :

- Un réservoir 111 comprenant une buse de gaz 113,
- Une buse de nébulisation 130 superposée à la buse de gaz 113, et
- Un distributeur 120 monté sur le réservoir 111.

[0034] Le réservoir 111 est apte à recevoir un liquide à nébuliser.

- [0035] Le liquide peut comprendre, par exemple, un ou plusieurs principes actifs qui vont agir sur les voies respiratoires ou une ou des substances ou un ou des marqueurs qui seront injectés dans les voies respiratoires du sujet dans le cadre de tests cliniques ou de recherches. Le principe actif peut être dilué dans un solvant, préférentiellement du sérum physiologique stérile (NaCl 0.9%).
- [0036] Les buses du dispositif (la buse de gaz 113 et la buse de nébulisation 130) sont des buses ou tuyaux conventionnels de forme préférentiellement cylindrique présentant une paroi interne, une paroi externe ainsi que deux extrémités.
- [0037] Une des extrémités de la buse de gaz 113 est située à l'intérieur du réservoir. Cette extrémité est partiellement fermée et comprend une première ouverture 113o. La buse de gaz 113 définit un axe de nébulisation Z qui correspond à l'axe longitudinal de la buse. La buse de gaz 113 et le réservoir 111 sont préférentiellement formés en une seule pièce.
- [0038] La buse de nébulisation 130 située dans le réservoir 111 est superposée à la buse de gaz 113 en ce sens que la buse de nébulisation 130 entoure, sur une partie de sa longueur, la buse de gaz 113. La buse de gaz 113 est préférentiellement centrée dans la buse de nébulisation 130.
- [0039] Les deux extrémités de la buse de nébulisation 130 sont situées à l'intérieur du réservoir. Une des extrémités de la buse de nébulisation 130 comprend une deuxième ouverture 130o. La buse de nébulisation 130 est superposée à la buse de gaz 113 de manière à ce que les deux extrémités comprenant les ouvertures (113o, 130o) se juxtaposent.
- [0040] Dans un mode de réalisation, la première ouverture 113o présente une première taille et la deuxième ouverture 130o présente une deuxième taille préférentiellement supérieure à la première taille. Ces ouvertures sont représentées en détail à la [Fig.2]. Les ouvertures peuvent être de n'importe quelle forme. La taille d'une ouverture correspond alors à leur dimension la plus grande. Les ouvertures sont préférentiellement circulaires ; la taille correspondant alors au diamètre. Par exemple, la première taille est comprise entre 0.1 mm et 1 mm tandis que la deuxième taille est comprise entre 0.2 mm et 2 mm. De préférence, la première taille est comprise entre 0.2 mm et 0.8 mm et la deuxième taille est comprise entre 0.3 mm et 1.6 mm. La première ouverture 113o est alignée avec la deuxième ouverture 130o et les deux ouvertures sont préférentiellement alignées sur l'axe de nébulisation Z. La première ouverture 113o et la deuxième ouverture 130o sont de préférence perpendiculaires à l'axe de nébulisation Z.
- [0041] La paroi interne de la buse de nébulisation 130 et la paroi externe de la buse de gaz 113 sont préférentiellement écartées de 0.2 mm à 2 mm l'une de l'autre.
- [0042] La buse de nébulisation 130 et la buse de gaz 113 forment ainsi une buse de nébu-

lisation à deux fluides comme représentée à la [Fig.2] comprenant :

- un canal gaz 132 (représenté par des tirets) à l'intérieur de la buse de gaz 113,
- un canal liquide 134 (représenté par des traits pleins) entre la buse de nébulisation 130 et la buse de gaz 113, et
- une zone de nébulisation 131 (représentée par des pointillés) à l'intersection du canal gaz 132 et du canal liquide 134.

[0043] La buse de nébulisation 130 est agencée pour qu'un interstice soit présent entre l'extrémité ne comprenant pas l'ouverture 130o et la surface interne du réservoir 111 pour permettre au liquide d'entrer dans le canal liquide 130.

[0044] La buse de nébulisation à deux fluides permet, lorsque le système est utilisé, de créer un effet Venturi dont le fonctionnement sera décrit par après. Le liquide est alors aspiré par le canal liquide 134 jusqu'à la zone de nébulisation 131 comme représenté par les flèches 460 de la [Fig.3]. Le liquide est alors fragmenté en gouttelettes par le flux de gaz injecté dans le canal gaz 132. On dit que le liquide est atomisé ou nébulisé pour former l'aérosol. Les gouttelettes sortent de la zone de nébulisation 131 par la deuxième ouverture 130o. Le dispositif décrit ci-dessus permet de créer des gouttelettes d'une taille comprise entre 10 nm et 100 µm. Ainsi, la gamme de tailles des gouttelettes créées s'étend sur quatre ordres de grandeur. Cet ordre de grandeur pouvant être régulé, entre autre, avec le débit du gaz.

[0045] Le distributeur 120 est aligné avec l'axe de nébulisation Z pour acheminer l'aérosol hors du réservoir. Par exemple, la section du distributeur 120 est plus grande que la section de la buse de gaz 113.

[0046] Les dimensions du réservoir 111 sont configurées de manière à ce que les plus petites gouttelettes soient acheminées hors du réservoir 111 par le distributeur 120 tandis que les plus grosses gouttelettes qui possèdent donc une énergie cinétique plus importante s'impactent sur les parois du distributeur 120 puis retombent dans le réservoir 111. Cela diminue donc la quantité de déchets car les plus grosses gouttelettes seront réutilisées. Par conséquent, ce dimensionnement permet de distribuer toutes les gouttelettes qui possèdent une taille inférieure à une limite déterminée par ledit dimensionnement. Ainsi, cela permet de sélectionner les gouttelettes en fonction de leur taille afin de mieux ajuster la concentration en masse des gouttelettes d'aérosol distribué et/ou de mieux contrôler le transport des gouttelettes sans évaporation vers le sujet.

[0047] Afin d'affiner la sélection des tailles de gouttelettes qui seront distribuées et d'augmenter l'efficacité de la nébulisation, la buse de nébulisation à deux fluides peut comprendre un déflecteur 137 situé à la sortie de la zone de nébulisation 131 comme cela est représenté à la [Fig.4]. Le déflecteur 137 possède avantageusement un double rôle : premièrement, il permet une fragmentation supplémentaire des gouttelettes augmentant ainsi le nombre de gouttelettes ayant la taille adéquate pour sortir de

réservoir 111. Deuxièmement, il permet une sélection plus fine de la taille des gouttelettes. En effet, le déflecteur permet aussi de défléchir la trajectoire des gouttelettes vers les bords (surface latérale) du réservoir 111. Ainsi, des gouttelettes ayant une énergie cinétique élevée impacteront la surface du réservoir 111. Ces gouttelettes vont donc s'accumuler sur la surface du réservoir 111 et retourneront dans le réservoir 111 tout comme les grosses gouttelettes. Ainsi, le déflecteur 137 permet de distribuer des gouttelettes plus fines et de suivre la trajectoire les menant à l'extérieur du réservoir.

[0048] Afin d'affiner encore davantage la sélection de tailles de gouttelettes qui seront distribuées, au moins une partie du distributeur 120 peut présenter un angle A compris entre 30° et 70° , de préférence entre 45° et 60° , par rapport à l'axe de nébulisation Z comme représenté sur la [Fig.5]. Ainsi, les gouttelettes qui ont une énergie cinétique élevée impacteront la surface du distributeur 120. Ces gouttelettes vont donc s'accumuler sur la surface du distributeur 120 et retourneront dans le réservoir 111 tout comme les grosses gouttelettes. Ainsi, l'angle A du distributeur 120 permet avantageusement de distribuer uniquement les gouttelettes qui possèdent une taille comprise dans une certaine gamme leur permettant de suivre la trajectoire de la courbure du distributeur 120. Ce mode de réalisation est combinable avec la présence d'un déflecteur 137.

[0049] Selon l'invention, la source de gaz humide 200 alimente le canal gaz 132 de manière à injecter un gaz humide 440 d'humidité contrôlée dans le réservoir 111. Le contrôle de l'humidité du gaz injecté permet avantageusement la génération d'un aérosol présentant une concentration stable de principe actif au cours du temps. En effet, l'injection de gaz humide a pour effet de saturer (ou de tendre vers la saturation de) l'atmosphère du réservoir en humidité. Ainsi, le phénomène d'évaporation du solvant contenu dans le liquide à nébuliser ou dans les gouttelettes est ralenti voir stoppé. Par conséquent, la concentration en principe actif dans l'aérosol devient stable. Cela permet donc avantageusement de produire un aérosol à forte concentration de principe actif ($0.1-1 \text{ g/m}^3$) présentant une large gamme de taille de gouttelettes (10 nm-10 microns) et mettant en œuvre des liquides sur une large gamme de viscosité (jusqu'à 200 cP). Comparé aux systèmes connus pour lesquels la concentration peut atteindre 0.01 g/m^3 , le système selon l'invention permet d'augmenter la concentration d'au moins un facteur 10. La taille des gouttelettes ne semble pas dépendre de l'humidité relative du gaz humide.

[0050] La source de gaz humide 200 peut comprendre une source de gaz 220 et un dispositif d'humidification 210 connecté à la source de gaz 220 et à la buse de gaz 113 comme cela est représenté sur la [Fig.3].

[0051] La source de gaz 220 distribue un gaz 420 vers le dispositif d'humidification 210. Le gaz peut par exemple être un gaz sec. Le gaz est préférentiellement de l'air. La source

- de gaz 220 peut, par exemple, être une bouteille de gaz pressurisé ou un compresseur.
- [0052] Le dispositif d'humidification 210 est configuré pour humidifier le gaz provenant de la source de gaz 220. Le gaz ainsi humidifié 440 présente donc une humidité contrôlée. Le gaz humide 440 est ensuite acheminé vers le canal gaz 132 via un tuyau 217 connecté à la buse de gaz 113 afin de créer les gouttelettes d'aérosol présentant les caractéristiques avantageuses présentées ci-dessus.
- [0053] Le dispositif d'humidification 210 peut par exemple être un nébuliseur comme cela est représenté sur la [Fig.6]. Le gaz provenant de la source de gaz 220 est acheminé vers l'entrée du nébuliseur 210 par un tuyau 215. Le liquide compris dans le nébuliseur du dispositif d'humidification 210 est préférentiellement de l'eau.
- [0054] Alternativement, le dispositif d'humidification 210 peut être un bulleur afin d'humidifier le gaz par micro-bullage.
- [0055] Le dispositif d'humidification 210 peut comprendre en outre une plaque chauffante.
- [0056] Le dispositif d'humidification 210 peut comprendre en outre un filtre de sortie, de préférence un filtre absolu en fibre de verre par exemple, retenant par exemple 99,95% des particules d'un diamètre supérieur à 0,3 μm . Le filtre est à faible résistance et peut être changé lorsque celui-ci est saturé de gouttelettes d'eau. Le filtre est positionné entre le dispositif d'humidification 210 et la buse de gaz 113. Le filtre permet, par définition, de bloquer les particules d'eau (ou d'autre liquide d'humidification) et de ne laisser passer que l'eau sous forme vapeur.
- [0057] Le dispositif d'humidification 210 peut aussi être intégré à la source de gaz 220 comme c'est le cas dans un compresseur médical.
- [0058] Le nébuliseur peut également comprendre un système complémentaire d'alimentation de liquide à nébuliser via un système de goutte à goutte ou de pousse seringue. Dans ce cas, l'alimentation du liquide dans le réservoir du nébuliseur s'effectue à l'aide d'un fin tuyau traversant le distributeur 120. L'utilisation d'un pousse-seringue avec un débit équivalent au débit de nébulisation permet ainsi de s'affranchir d'un dimensionnement important du réservoir 111 du nébuliseur et de le faire fonctionner non limitativement dans le temps.
- [0059] L'invention concerne aussi une utilisation du système décrit ci-dessus pour générer un aérosol.
- [0060] La première étape du procédé de génération d'un aérosol est d'introduire un liquide à nébuliser dans le réservoir 111. Le réservoir 111 est préférentiellement rempli jusqu'à ce que la surface du liquide à nébuliser soit au-dessus de l'extrémité de la buse de nébulisation 130 ne comprenant pas l'ouverture 130o.
- [0061] La deuxième étape consiste à fournir, à partir de la source de gaz humide 200, un gaz humide avec une pression constante comprise entre 0.1 bar et 10 bar, de préférence entre 0.5 bar et 5 bar et une humidité contrôlée d'humidité relative supérieure à 60%,

de préférence supérieur à 70%.

[0062] Ce gaz humide d'humidité contrôlée est ensuite injecté dans réservoir 111 via le canal gaz 132. L'injection est préférentiellement effectuée de manière continue, c'est-à-dire, à débit constant. En effet, l'injection continue permet de générer une concentration en masse de gouttelettes dans l'atmosphère de la chambre de nébulisation qui est continue. Combiné avec la concentration de principe actif qui est constante dans les gouttelettes grâce à l'injection de gaz humide d'humidité contrôlée, cela conduit à stabiliser d'autant plus la concentration de principe actif inhalé par l'utilisateur.

[0063] Durant l'utilisation, le réservoir 111 est préférentiellement maintenu de sorte que l'axe de nébulisation Z soit substantiellement vertical et que le distributeur 120 soit positionné au-dessus la buse de nébulisation à deux fluides. Ainsi, lorsqu'un flux de gaz est injecté dans le canal gaz 132 vers l'intérieur du réservoir 111, une dépression est créée par effet Venturi dans le canal liquide 134. Le liquide à nébuliser est alors aspiré par le canal liquide 134, comme représenté par les flèches 460 de la [Fig.3], jusqu'à la zone de nébulisation 131 dans laquelle le liquide est atomisé par le gaz humide 440.

EXEMPLES

[0064] Des essais expérimentaux mesurant l'efficacité du système selon l'invention ont été réalisés.

[0065] Exemple 1: Stabilité de la concentration de principe actif au cours du temps

[0066] Dans cet exemple, la concentration de principe actif généré avec un système selon l'invention et avec un système connu sont comparées. Le liquide à nébuliser est une solution d'eau et de fluorescéine ayant une viscosité de 1 cP.

[0067] Le système selon l'invention comprend un déflecteur 137. La première ouverture 113o présente un diamètre de 0.7 mm tandis que la deuxième ouverture 130o présente un diamètre de 1.3 mm.

[0068] Le dispositif d'humidification est un nébuliseur comprenant un filtre à sa sortie. Le gaz humide est de l'air humidifié par de l'eau. L'humidité relative du gaz humide injecté dans le canal gaz est fixée à $72\% \pm 2\%$.

[0069] Le système connu comprend le même dispositif de nébulisation que le système selon l'invention. Le liquide à nébuliser est atomisé par un flux de gaz non humidifié. L'humidité relative du gaz injecté dans ce nébuliseur est de $12\% \pm 1\%$.

[0070] La concentration de principe actif (fluorescéine) distribué est mesurée pour les deux systèmes. La variation de la concentration (axe y) est montrée à la [Fig.7] en fonction de la durée de nébulisation en minutes (axe x). La concentration mesurée pour le système connu est représentée par la ligne pointillée tandis que la concentration par le système selon l'invention est montrée par la ligne continue.

[0071] La concentration de principe actif en utilisant le système selon l'invention présente une faible variation comparée à la concentration générée par le système connu qui augmente dès les premières minutes d'utilisation. De plus, la variation de la concentration de principe actif générée par le système selon l'invention reste en-dessous de la variation relative de concentration réglementaire de 20% pour les études des essais d'aérosol.

[0072] Exemple 2 : Rendement de dépôt de l'aérosol dans les voies respiratoires

[0073] Dans cet exemple, l'efficacité de dépôt de l'aérosol (rendement de nébulisation) dans les voies respiratoires en utilisant un système selon l'invention est mesurée. Le liquide à nébuliser est une solution radioactive.

[0074] Le système de l'invention utilisé est le même que dans l'exemple 1.

[0075] Le système est utilisé sur un modèle durant 10 minutes. A la fin de la séance de nébulisation, l'efficacité de dépôt de l'aérosol dans les voies respiratoires du modèle est mesurée par imagerie scintigraphique.

[0076] La [Fig.8] montre un dépôt satisfaisant dans les voies respiratoires. Ainsi, cela montre que l'aérosol est bien délivré dans les voies respiratoires.

REFERENCES NUMERIQUES

[0077] 100 – Dispositif de nébulisation // 111 – Réservoir // 113 – Buse de gaz // 113o – Première ouverture // 120 – Distributeur // 130 – Buse de nébulisation // 130o – Deuxième ouverture // 131 – Zone de nébulisation // 132 – Canal gaz // 134 – Canal liquide // 137 – Déflecteur // 200 – Source de gaz humide // 210 – Dispositif d'humidification // 215 – Tuyau // 217 – Tuyau // 220 – Source de gaz // 420 – Flux de gaz // 440 – Flux de gaz humide d'humidité contrôlée // 460 – Aspiration du liquide par effet Venturi // A – Angle du distributeur // Z – Axe de nébulisation

Revendications

[Revendication 1]

Un système de nébulisation comprenant :

a) Un dispositif (100) comprenant :

- Un réservoir (111) comprenant une buse de gaz (113) définissant un axe de nébulisation (Z) et comprenant une première ouverture (113o) située à l'intérieur du réservoir (111), le réservoir (111) étant apte à recevoir un liquide à nébuliser,
- Une buse de nébulisation (130) superposée à la buse de gaz (113) comprenant une deuxième ouverture (130o),
- Un distributeur (120) monté sur le réservoir (111), le distributeur (120) étant aligné avec l'axe de nébulisation (Z) pour acheminer l'aérosol hors du réservoir,

la buse de nébulisation (130) et la buse de gaz (113) formant une buse de nébulisation à deux fluides comprenant :

- Un canal gaz (132) à l'intérieur de la buse de gaz (113),
- Un canal liquide (134) entre la buse de nébulisation (130) et la buse de gaz (113), et
- Une zone de nébulisation (131) à l'intersection du canal gaz (132) et du canal liquide (134), la sortie de la zone de nébulisation correspondant à la deuxième ouverture (130o), et

b) Une source de gaz humide (200) qui alimente le canal gaz (132) de manière à injecter un gaz humide (440) d'humidité contrôlée dans le réservoir (111), l'injection de gaz humide (440) permettant d'aspirer le liquide à nébuliser dans le canal liquide (134).

[Revendication 2]

Le système de nébulisation selon la revendication 1 dans lequel au moins une partie du distributeur (120) présente un angle (A) compris entre 30° et 70° par rapport à l'axe de nébulisation (Z).

[Revendication 3]

Le système de nébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 2 dans lequel la buse de nébulisation à deux fluides comprend un déflecteur (137) situé à la sortie de la zone de nébulisation (131).

[Revendication 4]

Le système de nébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans lequel la première ouverture (113o) présente une première taille et la deuxième ouverture (130o) présente une deuxième taille supérieure

à la première taille, la première ouverture (113o) étant alignée avec la deuxième ouverture (130o) et la première ouverture (113o) et la deuxième ouverture (130o) étant perpendiculaires à l'axe de nébulisation (Z).

- [Revendication 5] Le système de nébulisation selon la revendication 4 dans lequel la première taille est comprise entre 0.1 mm et 1 mm et la deuxième taille est comprise entre 0.2 mm et 2 mm.
- [Revendication 6] Le système de nébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lequel la buse de nébulisation (130) présente une paroi interne et la buse de gaz (113) présente une paroi externe, la paroi interne étant écartée de 0.2 mm à 2 mm de la paroi externe.
- [Revendication 7] Le système de nébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans lequel la source de gaz humide (200) comprend une source de gaz (220) et un dispositif d'humidification (210) connecté à la source de gaz (220) et à la buse de gaz (113), le dispositif d'humidification (210) étant configuré pour humidifier un gaz provenant de la source de gaz (220).
- [Revendication 8] Le système de nébulisation selon la revendication 7 dans lequel le dispositif d'humidification (210) est un nébuliseur.
- [Revendication 9] Le système de nébulisation selon la revendication 7 ou 8 dans lequel le dispositif d'humidification (210) comprend un filtre de sortie.
- [Revendication 10] Procédé de génération d'un aérosol comprenant les étapes de :
- Fournir le système de nébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9,
 - Introduire un liquide à nébuliser dans le réservoir (111),
 - Fournir, à partir de la source de gaz humide (200), un gaz humide avec une pression constante comprise entre 0.1 bar et 10 bar et une humidité contrôlée d'humidité relative supérieure à 60%,
 - Injecter le gaz humide d'humidité contrôlée dans le réservoir (111) via le canal gaz (132).

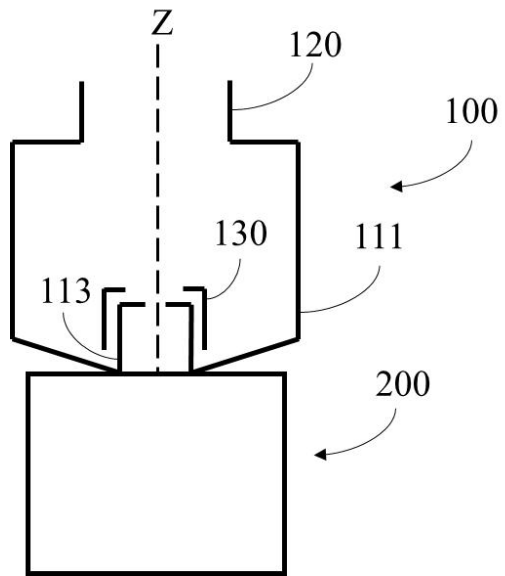
Abrégé

SYSTÈME DE NÉBULISATION

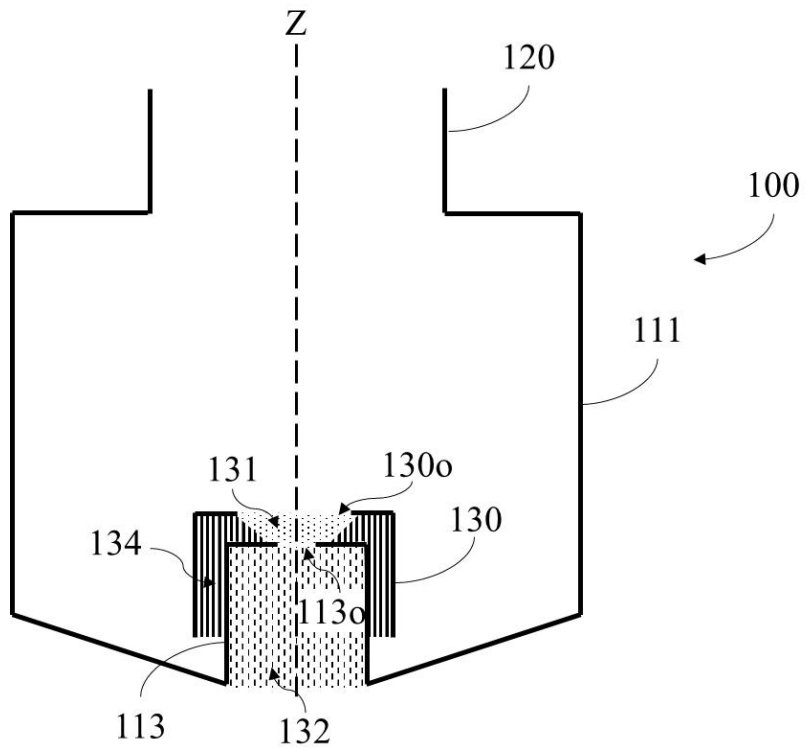
L'invention concerne un système de nébulisation comprenant un réservoir, une buse de nébulisation à deux fluides, un distributeur monté sur le réservoir, ainsi qu'une source de gaz humide apte à injecter un gaz d'humidité contrôlée dans le réservoir.

Figure de l'abrégé : Fig. 1

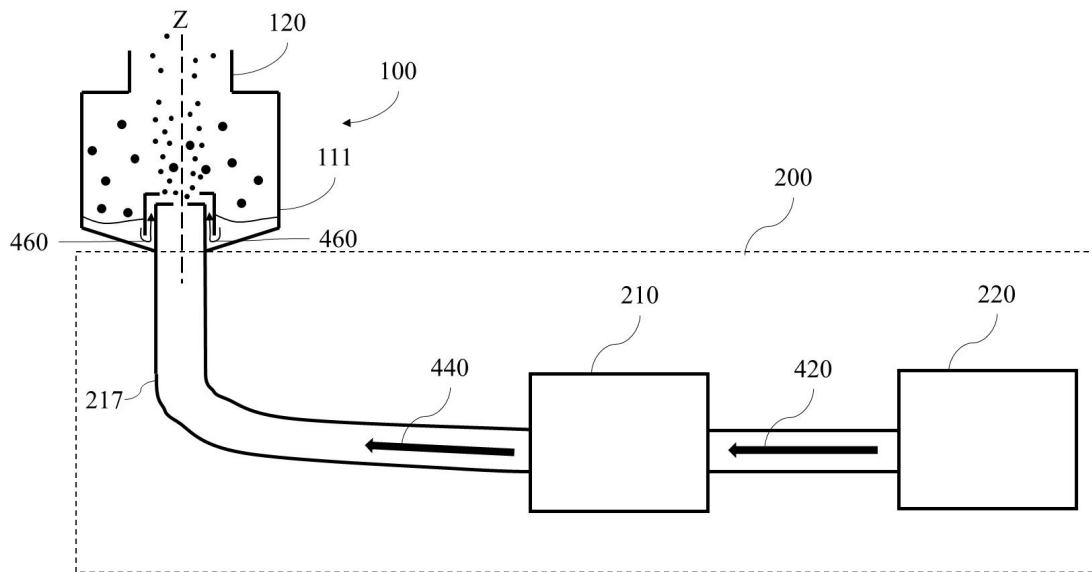
[Fig. 1]



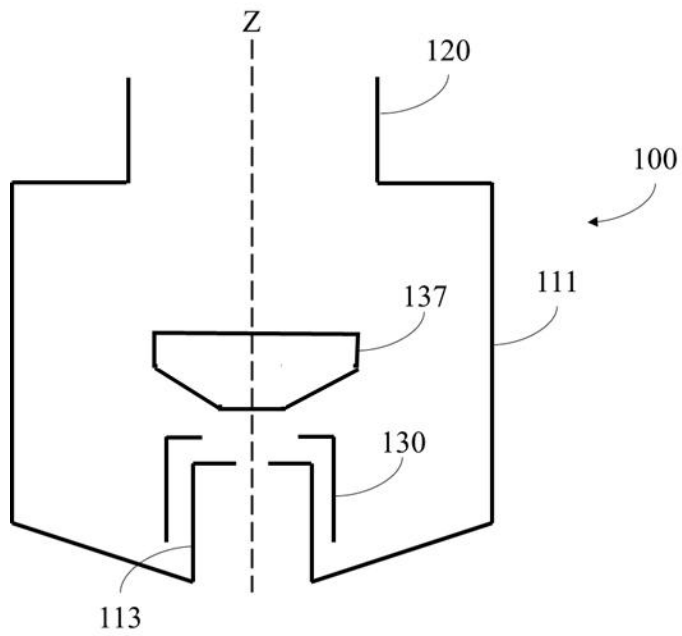
[Fig. 2]



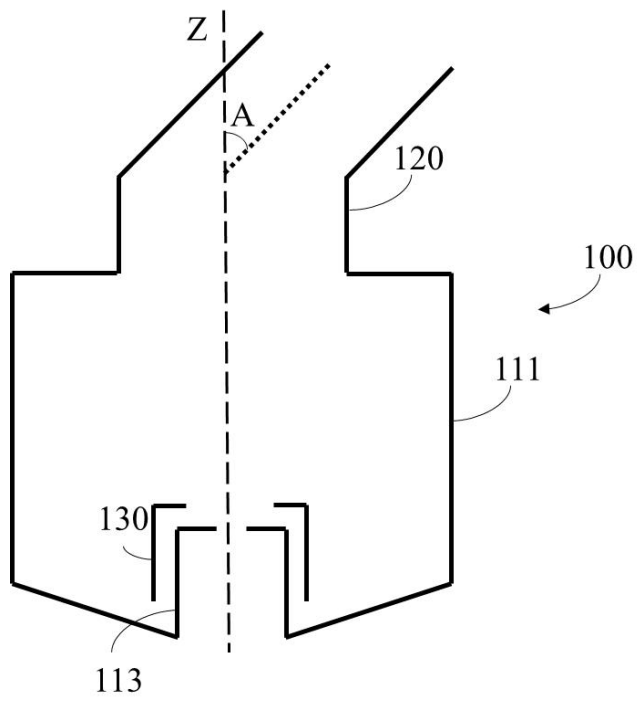
[Fig. 3]



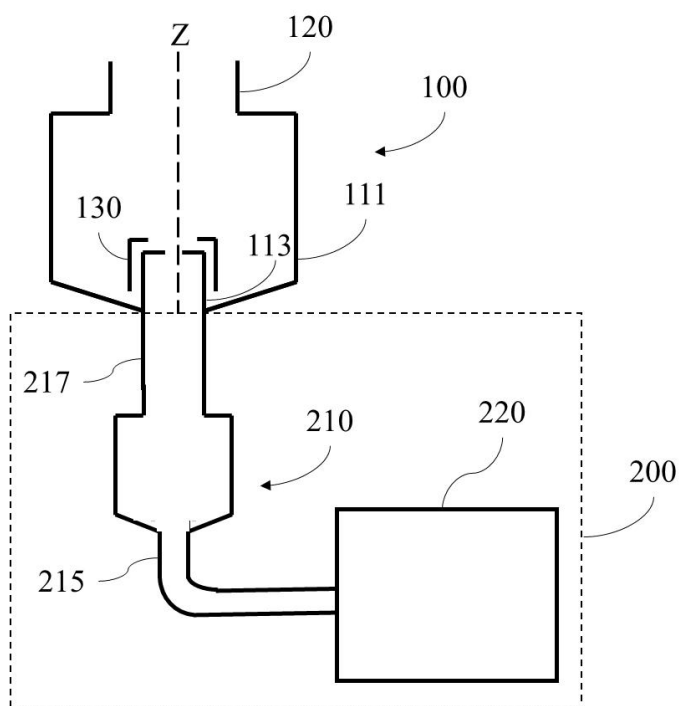
[Fig. 4]



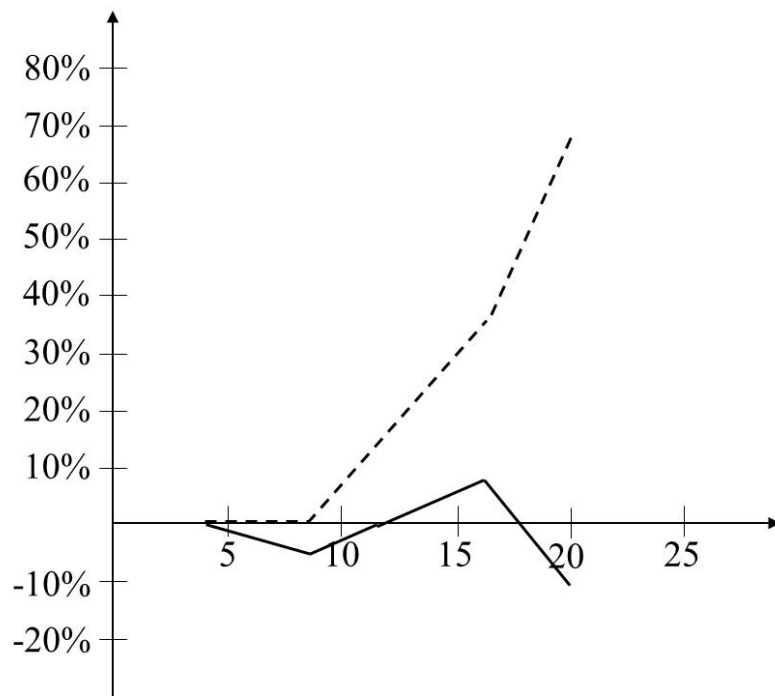
[Fig. 5]



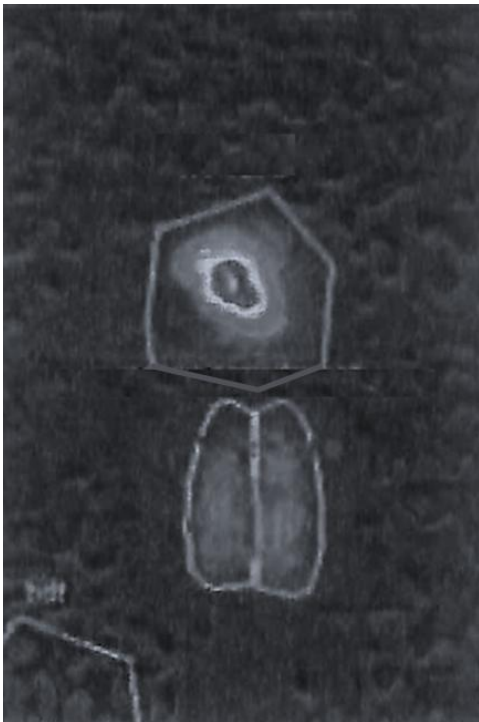
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



ANNEXE 5 - Brevet 2 : Système de nébulisation par masque sans dépôt sur la face



Direction de la recherche fondamentale
DRF/DCEPI – Cellule propriété industrielle
CEA – SACLAY Bât. 608 point courrier 152
F-91191 Gif sur Yvette CEDEX Contacts: DRF-brevets@cea.fr

CHIMIE-MATERIAUX	Mme Julienne CHARLIER	
BIOLOGIE-SANTE	M. Michaël BRITES TEIXEIRA Mme Emmanuelle KEMPF	
PHYSIQUE- ELECTRONIQUE	M. Dominique LESTELLE Mme Véronique L'HEVEDER	

Référence dossier CEA : BD

Fiche de déclaration d'invention et Proposition de demande de brevet

Titre : Système de nébulisation par masque sans dépôt sur la face

Interlocuteur principal du dossier :

NOM Prénom	Tel / e-mail	Unité	Employeur
VECELLIO NONE Laurent		PST-A	Université de Tours

Rédacteur(s) : (2 max)

NOM Prénom	Numéro Badge CEA	Unité	Employeur
1 VECELLIO NONE Laurent		PST-A	Université de Tours
2.			

Laboratoire(s) impliqué(s)

Laboratoire	Responsable	Tutelles	Institut DRF
1. IDMIT	R. Le Grand	CEA	JACOB
2. CEPR	M Si Tahar	Université de Tours/INSERM	



Référence dossier CEA : BD

LISTE DES INVENTEURS**Titre : Système de nébulisation par masque sans dépôt sur la face**

Nature de la contribution :

NOM Prénom	N° de badge CEA	EMPLOYEUR (CEA, CNRS, Université, ...)	Statut (CDI, CDD, ...)	Contribution (%)	Direction / Institut Service / Labo	Adresse personnelle et Nationalité	Date et signature
VECELLIO Laurent		Université de Tours			CEPR		
DUCANCEL Frederic		CEA			IDMIT		
CREPPY Justina		CEA			IDMIT		
NANNINCK Thibault		CEA			IDMIT		
CABRERA Maria		Université de Tours					
DELACHE Benoit		CEA			IDMIT		

Description Technique

TITRE :

- Une présentation publique (totale ou partielle) a-t-elle déjà eu lieu ? : non oui Date :
Dans quelles conditions ?
- Une divulgation de l'invention est-elle prévue à une date précise ? : non oui Date :
09/2023 Dans quelles conditions ? Article scientifique

1 Dans quel domaine TECHNIQUE se situe l'invention ?

L'invention se situe dans le domaine des équipements de laboratoire, en particulier dans les systèmes d'exposition d'aérosols pour la recherche fondamentale, les études précliniques et les études toxicologiques réglementaires. L'invention se situe également dans le domaine des dispositifs médicaux pour le traitement thérapeutique par aérosol des patients.

2 Quel problème veut-on résoudre ? / De quoi s'agit-il ? Que veut-on TECHNIQUEMENT améliorer ? Pourquoi ?

Les modèles animaux sont classiquement utilisés dans des études pour évaluer l'effet de substances toxiques et thérapeutiques. Parmi les espèces animales, les primates non humains (PNH) sont particulièrement pertinents pour modéliser la physiopathologie humaine suite à une exposition aéroportée et les traitements associés. Différentes techniques sont utilisées pour administrer des substances dans les voies respiratoires des PNH, mais force est de constater que ces méthodes et systèmes de délivrance sont différents de ceux utilisés chez l'humain. Ceci peut s'expliquer par les contraintes imposées lors des études chez l'animal nécessitant de contrôler et connaître précisément la quantité d'aérosol déposée dans les voies respiratoires. De plus les animaux présentent des différences anatomiques et respiratoires en comparaison de l'humain modifiant le site de dépôt des aérosols : le ciblage pulmonaire de l'humain nécessite une taille de particule inférieure à 5µm alors que le PNH nécessite une taille de particules inférieure à 1µm [Creppy et al 2023].

L'utilisation d'un seul et même système pour l'administration de médicament chez l'animal et l'humain pourrait permettre d'accélérer le développement vers la clinique en s'affranchissant du coût et du temps de développement galénique nécessaire avec le dispositif d'inhalation humaine. De plus, l'utilisation d'un même système capable d'administrer un toxique aérosol et sa thérapeutique inhalée associée est scientifiquement pertinent afin d'étudier l'effet de la thérapeutique au même site de dépôt respiratoire que le toxique.

Dans ce contexte, il est nécessaire de disposer d'un système d'administration d'aérosol utilisable chez l'humain et le PNH, qui permet d'administrer à la fois des toxiques et des thérapeutiques en doses contrôlées dans les voies respiratoires du PNH.

3 Etat de l'art antérieur : Comment ce problème est-il résolu actuellement ? Comment procède-t-on habituellement ?

Plusieurs méthodes sont utilisées pour administrer des substances dans les voies respiratoires des PNH.



L'instillation intranasale consiste en l'administration d'un liquide dans les narines du PNH. En fonction du volume administré il est possible de cibler plus ou moins les poumons. Un volume de 100µL ne permettra pas d'atteindre les poumons alors qu'un volume supérieur à 250µL sera associé à une pénétration pulmonaire. L'avantage de cette technique est la précision de la dose délivrée chez l'animal. Néanmoins, elle associée à une variabilité de la distribution de la dose dans les voies respiratoires (et éventuellement dans l'estomac) ainsi qu'une faible pénétration dans le poumon périphérique [Beck et al, 2002].

L'administration liquide endotrachéale est une autre technique utilisée pour l'administration d'un liquide dans les voies respiratoires. Elle consiste en l'administration d'un liquide au moyen d'une sonde endotrachéale. L'avantage que présente cette méthode est la précision de la dose délivrée et la garantie de l'administration pulmonaire. Néanmoins, cette méthode n'est pas physiologique et ne mime pas parfaitement le dépôt dans les voies respiratoires, impactant la physiopathologie du modèle [Capuano et al, 2003]. En effet, la substance d'essai n'est pas déposée dans les voies respiratoires supérieures et elle n'atteint pas le poumon périphérique [Beck et al, 2002].

L'administration d'un spray endotrachéal est également une autre méthode utilisée par les laboratoires en expérimentation animale. Elle consiste en l'utilisation d'un dispositif spécifique muni d'une buse de pulvérisation située à l'extrémité d'un fin cathéter. L'animal est intubé avec une sonde endotrachéale et le cathéter est introduit dans la sonde jusqu'à l'extrémité de celle-ci. Le spray polydispersé de gouttelettes (25-30µm) est alors généré à l'extrémité de la sonde et est déposé dans les poumons. Cette technique permet une administration contrôlée de la dose et assure un dépôt plus distal dans les poumons que les techniques précédentes par instillation. Néanmoins, la distribution de dépôt du spray ne mime pas parfaitement le dépôt des aérosols, en particulier en ce qui concerne l'homogénéité du dépôt surfacique des gouttelettes et la quantité déposée dans les alvéoles [Guillon et al, 2019] pouvant avoir des conséquences sur le modèle physiopathologique.

L'ensemble de ces techniques n'est pas utilisable en routine chez l'humain.

La nébulisation est une technique utilisée chez l'humain et le PNH pour administrer des substances sous forme aérosol. La nébulisation consiste en transformation d'un liquide sous la forme de microgouttelettes d'une taille inférieure à 10µm. Le nébuliseur est classiquement connecté à un masque facial pour administrer la substance dans les voies respiratoires. En fonction de la taille des gouttelettes, l'aérosol va se déposer plus ou moins dans les voies respiratoires basses et dans les alvéoles. Ce type d'administration par masque facial possède l'avantage de mimer une exposition à un aérosol toxique se déposant dans l'ensemble des voies respiratoires mais pose le problème du contrôle de la dose. En effet en fonction du type de nébuliseur utilisé et de l'animal exposé, la quantité de substance déposée peut varier d'un facteur 100 [Vecellio et al, 2011].

Une autre méthode utilisant les nébuliseurs consiste à intuber et ventiler mécaniquement le PNH et administrer l'aérosol au travers de la sonde d'intubation. Dans ce contexte, les paramètres ventilatoires sont parfaitement contrôlés, le système est clos et l'aérosol est administré directement dans les poumons de l'animal. La limitation que présente ce système est l'administration aérosol en pression positive ou bout d'une sonde dans les poumons ce qui modifie la mécanique respiratoire et la cinétique de l'aérosol en comparaison d'une respiration spontanée en pression négative : l'aérosol étant davantage impacté au niveau de la carène et administré préférentiellement d'un coté du poumon [Le Guellec et al, 2023]. De plus l'aérosol est uniquement déposé dans les poumons et non pas dans l'ensemble des voies respiratoires, limitant la représentativité du dépôt d'un aérocontaminant dans les voies respiratoires.

Ainsi les méthodes classiques d'administrations de substances dans les voies respiratoires du PNH ne permettent pas de garantir simultanément un dépôt respiratoire représentatif d'une contamination aérienne et une dose reproductible et contrôlée. Seule la nébulisation pourrait permettre l'administration chez le PNH et l'humain mais elle est associée à une forte variabilité de dépôt chez le PNH.

Dans le cadre de l'exposition des aérosols de toxiques chez des primates non humains (PNH), le système de référence est la « Chad box ». Ce système initialement développé par l'armée américaine consiste en l'exposition de la tête du PNH à un aérosol produit à concentration constante dans une boîte en dépression. Le contrôle de la quantité d'aérosol déposée est réalisé de manière indirecte par l'intermédiaire d'un calcul prenant en compte la durée de l'exposition, le volume minute de l'animal et la concentration de l'aérosol dans l'air [Hartings et al, 2004]. Ce système possède l'avantage de reproduire une exposition ambiante atmosphérique en exposant la totalité de la tête



de l'animal à l'aérosol d'essai d'une taille de $1\mu\text{m}$. Néanmoins, ce système n'est pas totalement satisfaisant dans le cadre d'étude des aérosols sur les voies respiratoires car :

- Une partie de l'aérosol est déposée sur l'extérieur de l'animal. Ceci conduit à un risque lors de la manipulation de l'animal après son exposition ainsi qu'une possible diffusion de l'aérosol au travers de la peau de l'animal ne permettant pas l'étude exclusive de l'aérosol dans les voies respiratoires (Toxique de type V par exemple)
- Le système possède un faible rendement de nébulisation, c'est-à-dire qu'une faible fraction de toxique introduit dans le réservoir du nébuliseur est administrée à l'animal. Ceci pose des problèmes d'hygiène et sécurité et nécessite d'augmenter les stocks de toxiques pouvant être problématique vis-à-vis des agences règlementaires. On considère un rendement d'environ 0.0001% pour le système Chad box
- Le débit d'aérosol produit par la Chad box nécessite des durées d'expositions pouvant être de plusieurs dizaines de minutes.
- Le système doit être nettoyé entre chaque exposition. Ceci limite l'utilisation quotidienne du système et donc le nombre d'expérimentations par jour. Ceci pose également le problème de décontamination sans endommager le dispositif.

Bien que ce système « évolué » d'exposition à des toxiques soit opérationnel, il n'est pas totalement adapté pour limiter les risques H&S, permettre la réalisation d'un nombre important d'expérimentations par jour, cibler spécifiquement les voies respiratoires, et limiter la durée de l'anesthésie afin de ne pas interagir avec le protocole. Par ailleurs, il ne permet pas une utilisation chez l'humain pour l'administration de thérapeutiques inhalées.

Certains types de nébuliseurs utilisés chez l'humain présentent des performances améliorées. En effet, les nébuliseurs ultrasoniques et pneumatiques possèdent un rendement faible impliquant la présence d'une forte proportion (jusqu'à 50%) de liquide résiduel dans le nébuliseur en fin de séance. A contrario, les nébuliseurs à tamis possèdent l'avantage d'une faible perte de liquide dans le réservoir du nébuliseur et d'assurer une stabilité de la formulation de l'aérosol produit au cours du temps. Certains systèmes sont munis d'un nébuliseur à tamis connecté sur une pièce en « T » munie de deux ouvertures dont l'une d'elle est connectée à un masque et l'autre est laissée libre à l'air ambiant. Lors de la phase expiratoire, l'air expiré sort par l'ouverture laissée libre et entraîne l'aérosol produit par le nébuliseur vers l'air extérieur générant ainsi des pertes d'aérosols

Certains systèmes, tels que ceux décrits dans les demandes de brevets français FR2985909 et FR2879465, proposent des améliorations à l'aide de chambre d'inhalation valvée permettant l'entrée et la sortie d'aérosol par une unique ouverture dans le masque. Cependant, l'ouverture de la valve n'est pas déclenchée instantanément au début de chaque phase inspiratoire à cause de la propriété de détente des gaz dans le masque, en particulier pour les petits volumes respiratoires. Cet effet contribue à une diminution de l'administration de l'aérosol dans le masque et à une réduction de l'efficacité du nébuliseur. Par ailleurs, dans ce type de système, le volume du masque représente un espace mort réduisant la quantité d'aérosol inhalée. En effet, la première partie de l'air inhalée par l'animal est dépourvue d'aérosol et correspond au volume du masque. Le brevet FR2112823 décrit un système de nébulisation projetant l'aérosol directement dans le masque afin de s'affranchir du problème de volume mort du masque. Bien que ce système soit performant en termes de rendement, il est associé à un dépôt sur la face de l'animal rendant problématique sa manipulation suite à l'administration d'une substance toxique.

Force est de constater, qu'aucune des systèmes de nébulisation ne permet d'assurer à la fois un rendement pulmonaire important ($>1\text{log}$, cad supérieur à 10%), un dépôt pulmonaire profond et un faible dépôt sur la face.

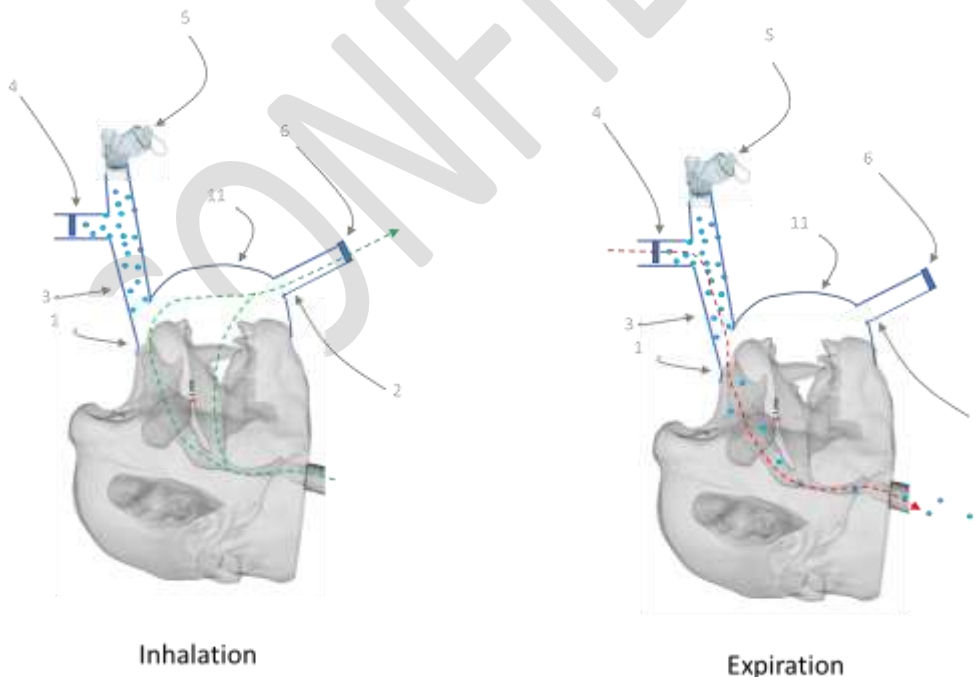
En conséquence, les méthodes et moyens de délivrances actuels ne permettent pas d'administrer de manière satisfaisante des toxiques et des thérapeutiques dans les voies respiratoires des PNH. Seuls les nébuliseurs présentent l'avantage de pouvoir être utilisés à la fois chez l'humain et le PNH.

Description du dispositif de l'invention : Quelles solutions TECHNIQUES nouvelles propose-t-on ? Quelle est l'originalité TECHNIQUE de ce nouveau système ? Quels avantages en attend-on ?

L'invention consiste en un système de nébulisation comprenant :

- un masque (11) étanche sur la face de l'animal muni d'une première ouverture (1) située sur la partie supérieure du masque et une deuxième ouverture située sur la partie inférieure du masque (2)
- une chambre de stockage de l'aérosol (3) orientée selon un axe longitudinal et vertical par rapport la force de la pesanteur, et connectée à la première ouverture (1), et munie d'une valve unidirectionnelle (4) permettant le passage de l'air extérieur vers la chambre de stockage (3), et connectée à un nébuliseur à tamis (5) tel que l'aérosol projeté par le nébuliseur à tamis (5) est situé dans l'axe longitudinal de la chambre de stockage
- une valve unidirectionnelle (6) connectée sur la deuxième ouverture du masque et permettant le passage de l'air depuis le masque vers l'air extérieur.

Ainsi dans une configuration de l'invention l'animal est allongé sur le dos, la chambre de stockage (3) à un volume de 30mL, les valves (4, 6) ont une résistance inférieure à 1 cmH₂O*min/L, et le nébuliseur à tamis (5) produit un débit compris entre 0.05mL/min et 0.2mL/min. Lors de la phase expiratoire de l'animal, le nébuliseur à tamis (5) produit l'aérosol dans la chambre de stockage (3). L'aérosol reste stocké dans la chambre (3) sans passage au travers de première ouverture selon un phénomène physique encore non complètement expliqué (Figure 7). L'aérosol est concentré dans le bas de la chambre (3), proche du nez de l'animal et créé une dépression dans la partie supérieure de la chambre de stockage. Durant la phase inspiratoire, l'aérosol stocké dans la chambre (3) avec un volume proche du volume courant du PNH est inhalé. L'air inspiré par le PNH génère une dépression qui s'additionne à la dépression dans le haut de la zone de stockage (3) ouvrant ainsi la valve inspiratoire (4). L'ouverture de la valve (4) est ainsi facilitée grâce à l'orientation du dispositif de stockage (3) et de la concentration d'aérosol dans le bas de la chambre de stockage (3). La proximité de l'extrémité de la chambre et le gradient de concentration dans la chambre (3) favorise la rapide pénétration de l'aérosol dans les voies respiratoires avec un faible espace mort. Ainsi, le système s'adapte à la respiration de l'animal pour envoyer des bolus d'aérosols calibrés tout en limitant les pertes dans le système d'inhalation. Le stockage de l'aérosol dans la zone de stockage (3) n'est pas associé à un dépôt sur la face de l'animal, la distance entre les deux ouvertures (1 et 2) permet de rincer le masque (11) à l'aide de l'air expiré par le PNH afin de pas favoriser des zones non ventilées qui concentreraient l'aérosol et favoriserait son dépôt sur la face du PNH.



Ce système cumule les avantages car il ne produit pas de condensation dans le système d'inhalation, il limite le dépôt sur la face de l'animal, il possède un rendement élevé (environ 40% par rapport à la

charge de introduite dans le nébuliseur), il délivre rapidement une quantité importante d'aérosol dans les voies respiratoires, il permet de délivrer des particules supérieures à $1\mu\text{m}$ dans les poumons du PNH (ceci étant d'intérêt pour les formulations de type suspension ou spores comprenant des particules supérieures à $1\mu\text{m}$). De plus, compte tenu de son rendement élevé, il est possible de rajouter un traceur radioactif à la substance d'essai pour mesurer les contaminations particulières ambiantes et surfaciques lors de la nébulisation. Un système de type « Chad box » ne permet pas d'assurer une mesure de la contamination d'un agent biologique en temps réel par traçage radioactif compte tenu du faible rendement du système. Ceci nécessiterait de mettre en œuvre des activités trop importantes et à risque pour la santé (environ $3.7 \cdot 10^7 \text{ MBq}$)

Le modèle mathématique développé par L Vecellio et al (Vecellio et al, 2009) a été appliqué à l'invention pour expliquer l'effet de la chambre de stockage et la capacité à administrer des particules supérieures à $1\mu\text{m}$ dans les poumons de l'animal. Il a également été appliqué à un modèle de nébuliseur de l'état de l'art utilisant un masque muni d'un unique trou connecté à un nébuliseur à tamis par l'intermédiaire d'une pièce en T. Le volume mort du masque et de la pièce en T a été fixé à 10mL. Considérant un animal respirant un volume courant de 25mL, une fréquence de 30/min et un T_i/T_{ot} de 0.4, nous obtenons les simulations sur les figures 3 et 4.

La figure 3 montre la concentration normalisée au cours du temps d'inhalation pour l'invention et l'état de l'art ainsi que le débit inspiratoire de l'animal. Lors des débits les plus importants, l'état de l'art montre une forte concentration de l'aérosol inhalé, favorisant l'impaction dans les voies respiratoires supérieures. A contrario l'invention, délivre une forte concentration d'aérosol lors du début de l'inhalation, c'est-à-dire lors des débits inspiratoires les plus faibles, limitant ainsi le phénomène d'impaction dans les voies respiratoires supérieures et permettant l'administration de particules plus grosses que $1\mu\text{m}$ dans les poumons.

La figure 4 montrent la concentration de l'aérosol dans le volume inhalé par le PNH. La première partie du volume inhalé (de 0 à 17mL) correspond au volume qui pénètre dans les poumons alors que la deuxième partie du volume inhalé correspond au volume qui pénètre dans les voies respiratoires supérieures en fin d'inspiration. La figure montre clairement que l'invention favorise la pénétration pulmonaire en comparaison de l'état de l'art : l'air inhalé (20-25mL) par le PNH en fin d'inspiration est beaucoup moins riche en aérosol en comparaison de l'état de l'art (donc moins de perte dans les voies aériennes supérieures). De plus, il est à noter que la première partie de l'air inhalé (0-10mL) ne contient pas d'aérosol dans l'état de l'art, ce qui ne permet pas une pénétration efficace de l'aérosol dans le poumons profond (alvéoles), alors que l'invention permet une concentration plus forte dans les premiers volumes d'air inhalés permettant une pénétration alvéolaire. Ainsi l'invention, (selon le modèle de simulation) permet d'améliorer la pénétration pulmonaire et alvéolaire de l'aérosol inhalé chez le PNH en comparaison de l'état de l'art.

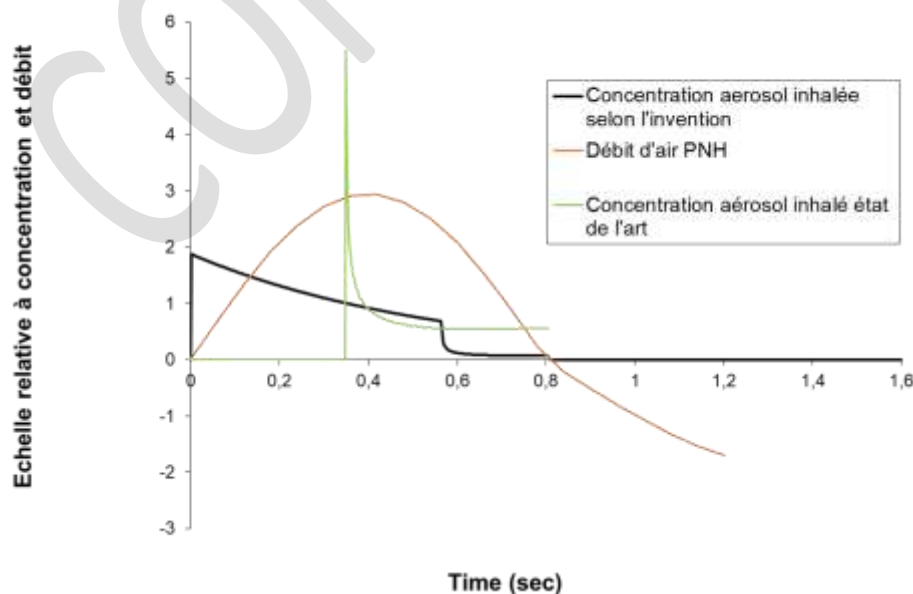


Figure 2 : Simulation de la concentration d'aérosol inhalée chez le PNH et son débit d'air au cours du temps

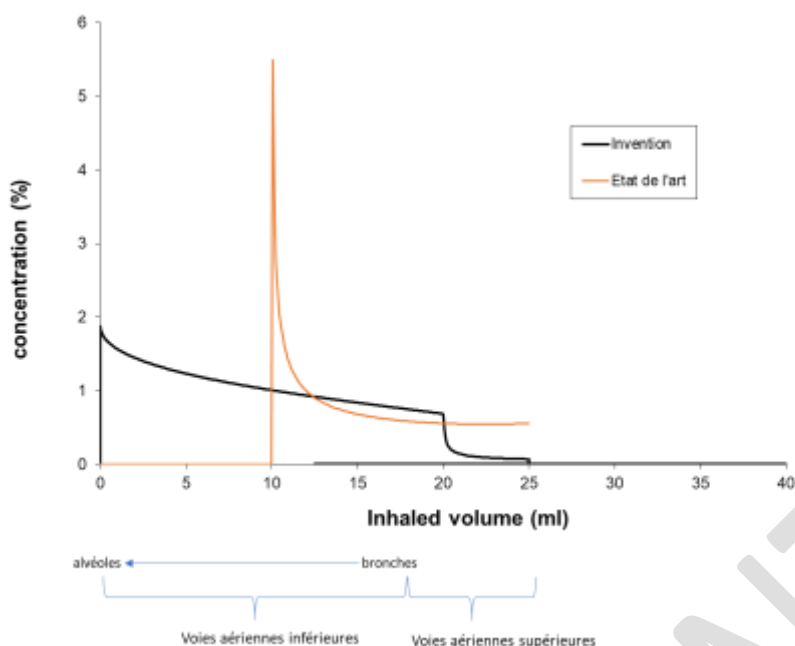


Figure 3 : Simulation de la concentration d'aérosol dans le volume d'air inhalé par le PNH

Les résultats de dépôt mesurés par imagerie scintigraphique (Tableau 1) confirment un dépôt respiratoire important avec l'invention en comparaison des nébuliseurs commerciaux (56% vs 8%) comme présenté dans le tableau.

Le ciblage pulmonaire est amélioré en comparaison des autres nébuliseurs grâce à l'effet de bolus d'aérosol. La proportion de dépôt dans les poumons est de 3%, 10% et 17% respectivement pour des particules de 13.9, 3.2 et 0.4 μ m avec des nébuliseurs de l'état de l'art alors qu'elle est de 35% avec l'invention générant une taille de particule de 3.9 μ m. L'image de dépôt par PET Scan (Figure 4) démontre également une pénétration de l'aérosol dans l'ensemble des poumons de l'animal.

Aerosol delivery device	MMAD (μ m)	Upper airway deposition	Lower airway deposition	Airways Deposition variability (Standard deviation/Mean)	Deposition efficiency after 10min (airway deposition/nebulizer charge)	Deposition output (μ L/min) (airway deposition/nebulization time)
Microcirrus nebulizer	0.4	84%	17%	54%	0.8%	2.5
Sidestream nebulizer	3.2	90%	10%	61%	5.7%	17
NL20 jet nebulizer	13.9	97%	3%	75%	8%	41
Invention	3.9	65%	35%	24%	56%	56

Tableau 1: Depots d'aérosols obtenus avec 3 macaques pour différent types de nébuliseurs en comparaison de l'invention

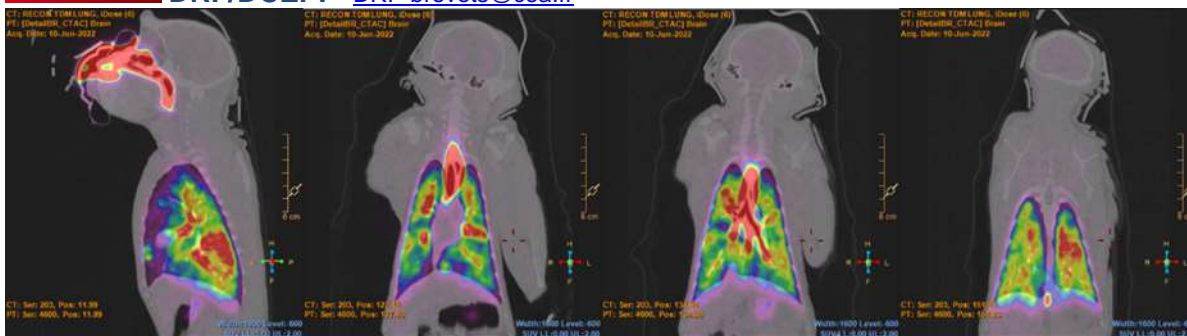


Figure 4 : Dépôt par imagerie sur le macaque à l'aide du PET-Scan

Par ailleurs, le dépôt sur la face de l'animal a été comparé entre le dispositif utilisé dans le brevet EP2804647A1 et la présente invention. Les 3 macaques utilisés étant leurs propres témoins. Les résultats de la figure 5 démontrent clairement une diminution de dépôt de l'aérosol sur la face de l'animal, facilitant ainsi sa manipulation en cas d'aérosolisation de substances.

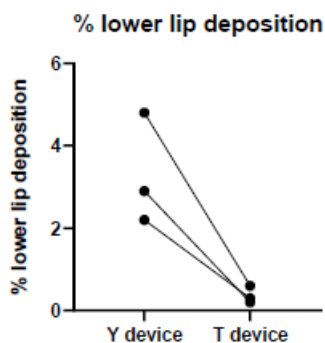


Figure 6: comparaison du dépôt d'aérosol sur la face de l'animal avec un nébuliseur à tamis utilisant une unique ouverture dans le masque (Y device) (brevet EP2804647A1) en comparaison de l'invention (T device).

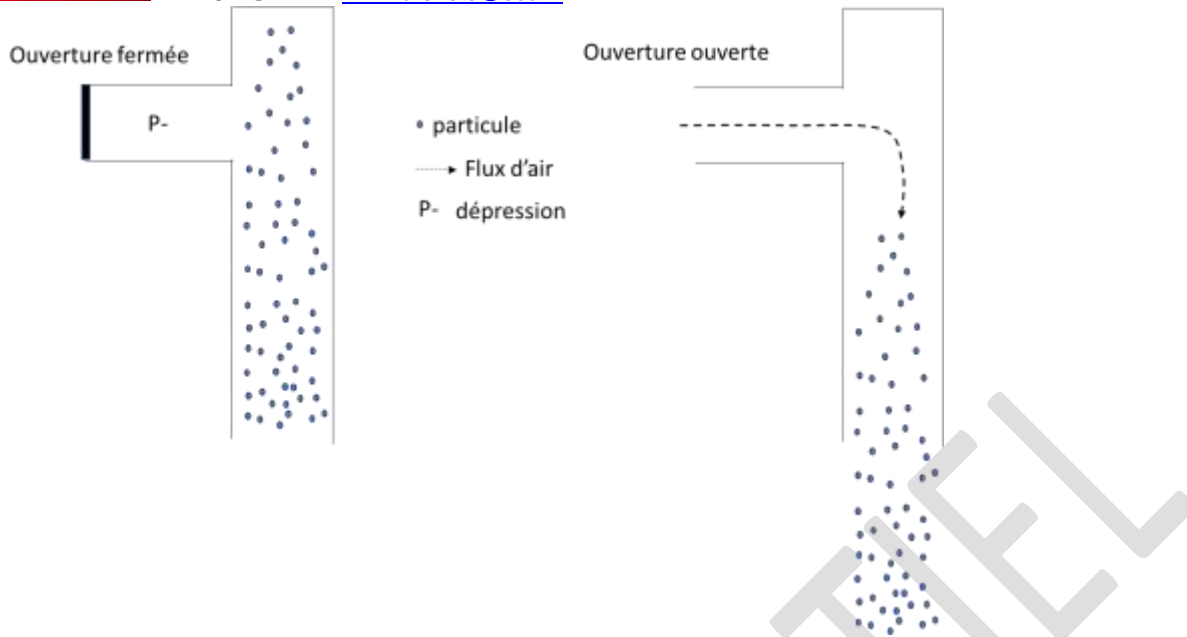


Figure 7 : Phénomène physique non expliqué participant à la limitation du dépôt sur la face et la réaction d'ouverture de la valve inspiratoire

4 Les différentes variantes du « procédé », du « composant », du « composé », ou du « dispositif » etc...:

Valves connectées à des filtres absolus
 Système de nébulisation utilisable en position assise
 Système de nébulisation utilisable chez l'homme
 Système connecté à une source de gaz sec pour diminuer la taille des particules
 Animal connecté à un système de mesure des paramètres ventilatoires.

5 Suggestions d'applications éventuelles

-Etude préclinique chez le PNH
 -Adaptation possible à d'autres espèces larges (cochons, chiens etc...)
 -Application chez l'humain pour les thérapeutiques

Références bibliographiques :

Beck, S.E.; Laube, B.L.; Barberena, C.I.; Fischer, A.C.; Adams, R.J.; Chesnut, K.; Flotte, T.R.; Guggino, W.B. Deposition and expression of aerosolized rAAV vectors in the lungs of Rhesus macaques. *Molecular Therapy* 2002, 6, 546-554

Capuano, S.V.; Croix, D.A.; Pawar, S.; Zinovik, A.; Myers, A.; Lin, P.L.; Bissel, S.; Fuhrman, C.; Klein, E.; Flynn, J.L. Experimental Mycobacterium tuberculosis infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human M. tuberculosis infection. *Infection and immunity* 2003, 71, 5831-5844.

Justina Rose CREPPY^{1,2*}, Benoit DELACHE¹, Julien LEMAITRE¹, Branka HORVAT⁴, Laurent VECILLIO^{2,3} and Frédéric DUCANCEL, 2023, Biological aerosol administration in non-human primates, *Pharmaceutics*, soumis



Guillon, A.; Darrouzain, F.; Heuzé-Vourc'h, N.; Petitcollin, A.; Barc, C.; Vecellio, L.; Cormier, B.; Lanotte, P.; Sarradin, P.; Dequin, P.-F. Intra-tracheal amikacin spray delivery in healthy mechanically ventilated piglets. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2019, 57, 101807.

Hartings JM, Roy CJ. The automated bioaerosol exposure system: preclinical platform development and a respiratory dosimetry application with nonhuman primates. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004 Jan-Feb;49(1):39-55. doi: 10.1016/j.vascn.2003.07.001. PMID: 14670693.

Sandrine Le Guellec *, Jeffrey Pardessus, Elsa Bodier-Montagutelli, Guillaume L'Hostis, Emilie Dalloneau, Damien Piel, Hakim Samai, Antoine Guillon, Elvir Mujic, Emmanuelle Guillot-Combe, Stephan Ehrmann, Eric Morello, Jérôme Gabard, Nathalie Heuze-Vourc'h, Cindy Fevre, Laurent Vecellio, 2023, Bacteriophages by nebulization in Mechanical Ventilation: In Vitro Study and lung Deposition in Macaques, Viruses, Soumis

Vecellio L, Abdelrahim ME, Montharu J, Galle J, Diot P, Dubus JC. Disposable versus reusable jet nebulizers for cystic fibrosis treatment with tobramycin. *J Cyst Fibros*. 2011 Mar;10(2):86-92. doi: 10.1016/j.jcf.2010.10.004. Epub 2010 Nov 12. PMID: 21075063.

Vecellio L. 2006. The mesh nebulizer, a recent technical innovation for aerosol delivery. *Breathe*. 2:252-260

Vecellio L, Kippax P, Rouquette S, Diot P. Influence of realistic airflow rate on aerosol generation by nebulizers. *Int J Pharm*. 2009 Apr 17;371(1-2):99-105. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.12.027. Epub 2008 Dec 27. PMID: 19150494.

6 Mots clés :

Nébuliseur, aérosol, toxicologie, réglementaire, thérapeutique

7 Informations contractuelles

.

8 Partenaires industriels possibles

- Addair
- Ecomesure
- CH Technology
- Aerogen
- Création de start up