Formulation microfluidique et fonctionnalisation « Layer-by-Layer » de nanocomplexes de Vancomycine pour le traitement par voie orale d'infections intestinales

Sébastien WANG[1], Guillaume LEFEBVRE[1], Marie BONNIN[1], Camille SAVARY[1], Florence DUMAS[1], Florian ROUSSEAU[1], Jean-Christophe GIMEL[1], Brice CALVIGNAC[1]

[1]Univ Angers, Inserm, CNRS, MINT, SFR ICAT, F-49000 Angers, France

Introduction

La résistance aux thérapies antimicrobiennes est un problème mondial majeur depuis plusieurs décennies. L'usage généralisé et excessif d'antibiotiques a engendré des phénomènes de multirésistances microbiennes. Une solution à ce problème peut être le développement de nouveaux systèmes de délivrance (SD) thérapeutiques, proposés notamment par la Nanomédecine. Le but est de produire et administrer des principes actifs sous forme de nanoparticules pouvant être vectorisées et/ou fonctionnalisées. Ainsi, le traitement d'une pathologie est rendu plus efficace, et engendre moins d'effets indésirables, en ciblant le site infectieux au plus proche. L'objectif de ce travail est (i) de développer un procédé microfluidique de formulation de nanocomplexes (NC) chargés en vancomycine (VAN) et (ii) de les fonctionnaliser par des polyélectrolytes (PEL) via un procédé continu innovant de fonctionnalisation de surface « Layer-by-Layer » (LbL) en vue d'une administration par voie orale. La VAN est un antibiotique utilisé pour le traitement d'infections bactériennes intestinales comme la colite pseudomembraneuse à *Clostridium Difficile.* Il s'agit de l'antibiotique le plus prescrit pour les infections nosocomiales. Cependant, son action a un mauvais ciblage de l'infection, ce qui implique l'administration de doses importantes. Indépendamment de la fonctionnalisation par des PEL, les NC formés eux-mêmes de PEL auto-associés ont déjà prouvé leur potentiel en tant que SD[1] : bonne bio-assimiliation et biodégradabilité, faible toxicité et procédé d'obtention éco-responsable en conditions ambiantes et sans utilisation de solvants organiques. Ensuite, la fonctionnalisation des NC par des couches de PEL (LbL) permettra la protection de la VAN jusqu'au site infectieux puis le ciblage via des interactions électrostatiques avec la paroi bactérienne.

Formulation microfluidique et caractérisation physico-chimique de nanoparticules NC-VAN@PAA

Ce procédé continu de nanocomplexation consiste à injecter deux phases aqueuses en conditions ambiantes, l'une de VAN (charge cationique) et l'autre d'un PEL anionique tel que l'acide polyacrylique (PAA) afin d'encapsuler la VAN (Fig. A-B). La formation des NC-VAN@PAA résulte des interactions électrostatiques entre les groupes cationiques et anioniques[2], à un ratio molaire optimal VAN:PAA 12:1, conduisant à la nanoprécipitation de particules insolubles dans l'eau. Dans ce travail, nous avons étudié l'effet du débit total (1-20 mL/min) et de la concentration en VAN (1,5-10 mg/mL) sur la charge/rendement de complexation, taille et la polydispersité, ainsi que les cinétiques de stabilité des NC dans le temps et à la dilution. A une concentration inférieure à 5 mg/mL de VAN, nous avons pu montrer que l'hydrodynamique (débit x20) permet de moduler la taille des NC de 100 à 60 nm, et de diminuer d'un facteur 3,5 l'indice de polydispersité (PDI) soit de 0,14 à 0,04. A une concentration supérieure à 5 mg/mL de VAN, la taille des NC est modulée de 200 à 55 nm, avec cependant un PDI > 0,2. Au-delà de 10 mL/min, nous n'observons pas de variation significative de la taille des NC, en revanche la polydispersité est nettement mieux contrôlée à une concentration inférieure à 5 mg/mL avec un PDI 3,5 à 7 fois plus faible qu'à une concentration supérieure à 5 mg/mL. Le potentiel zêta des NC est de -25,1 mV, signifiant que la VAN est protégée par le PAA en surface des NC. Le rendement de complexation est de 80% indépendamment des paramètres opératoires. La taille des NC est stable en conditions ambiantes pendant au moins 14j, ainsi qu'à dilution d'un facteur 2. Dans le but d'une administration par voie orale des NC et pour la conduite ultérieure d'études d'efficacité *in vitro* envisagées sur souches bactériennes, une fonctionnalisation de surface de NC (par dépôt de couches de PEL par procédé LbL) permettrait d'améliorer cette stabilité à la dilution.

Fonctionnalisation par dépôt LbL en surface des NC-VAN@PAA

Dans ce travail, la fonctionnalisation LbL avec un couple de PEL anionique/cationique est envisagée par un procédé d'ultrafiltration tangentielle (Fig. C). Le principe consiste à mettre en contact dans un réservoir agité la suspension de NC-VAN@PAA chargés négativement avec un PEL cationique tel que le polyhydrochlorure d'allylamine (PAH). Le mélange circule ensuite en circuit fermé dans la boucle LbL pendant plusieurs minutes, avant de circuler dans la boucle de lavage afin d'éliminer le PAH libre par ultrafiltration tangentielle, celui-ci pouvant être recyclé. Dès lors, le même protocole est répété avec l'autre PEL du couple (PAA), et ce jusqu'à atteindre le nombre de couches souhaité pour stabiliser les NC. L'intérêt d'un tel procédé est qu'il permet de fonctionnaliser chaque couche en moins de 10 min contrairement à la centrifugation qui très chronophage (30-60 minutes)[2]. La validation du procédé a été réalisée sur une suspension de microparticules « modèles » de CaCO3 fonctionnalisées par 2 couches de PEL. A ce stade du travail, la fonctionnalisation d'une couche de PAH a été réalisée sur une suspension de NC-VAN@PAA dont le potentiel zêta est positif comme attendu (+44,4 mV). Les études de stabilité sont en cours.

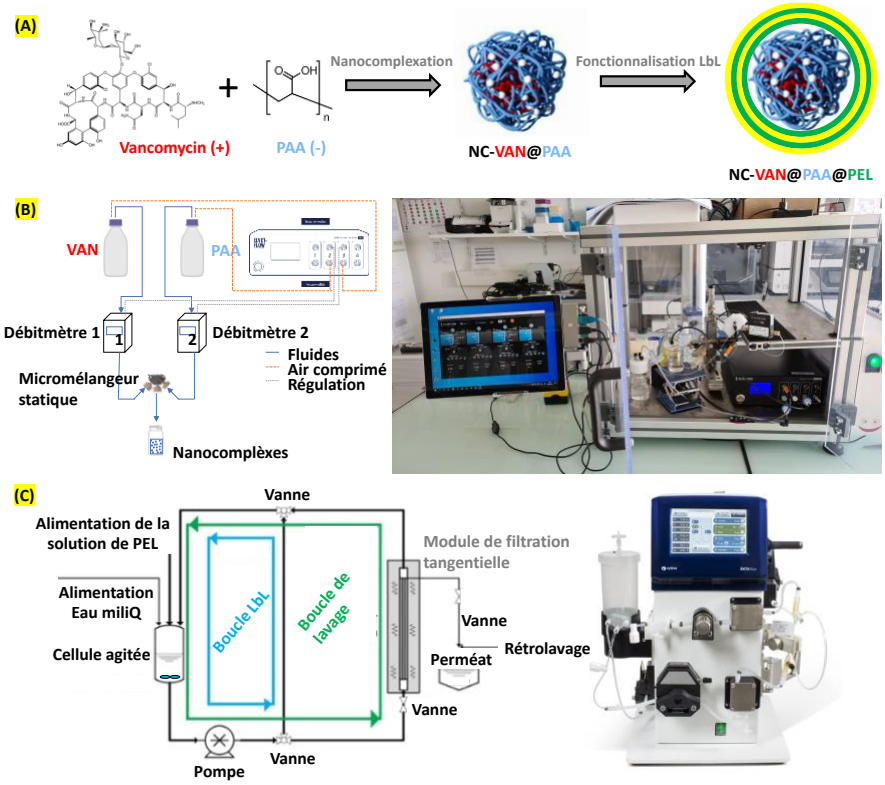

Figure (A) Formulation de nanoparticules de VAN@PAA par nanocompléxation et fonctionnalisation de surface par dépôt LbL ; (B) Procédé et pilote de nanocompléxation et (C) d'ultrafiltration tangentielle

Conclusion

Ce travail a permis d'établir la preuve de concept de l'approche proposée de formulation de NC-VAN@PAA fonctionnalisés par une première couche de PEL par le biais d'un couplage technologique de la microfluidique et de l'ultrafiltration tangentielle. L'originalité de cette étude repose sur son approche (i) technologique au travers du couplage de procédés continus, éco-responsables, à basse énergie et facilement industrialisables, et (ii) thérapeutique par le biais de la fonctionnalisation, la protection et le ciblage de la VAN pour potentiellement améliorer son efficacité et réduire les doses administrées.

Références bibliographiques

1) Correa S. et al., Engineering nanolayered particles for modular drug delivery, *Journal of Control Release,* **2016**, 240, 364-386
2) Dhiraj R. et al., Polyelectrolyte complex of vancomycin as a nanoantibiotic: Preparation, in vitro an in-silico studies, *Material Science and Engineering C*, **2020**, 489-498