

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

CHRISTIAN BEAULAC

(BEAC 08026705)

**Elaboration et évaluation de chémoliposomes à action bactéricide
anti-*Pseudomonas aeruginosa* chez un modèle animal d'infection chronique**

AVRIL 1995

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

TABLE DES MATIERES

	PAGE
RESUME.....	VI
REMERCIEMENTS.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIV
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION.....	2
II. REVUE DE LITTERATURE.....	5
2,1 La fibrose kystique.....	5
2.1.1 Le gène de fibrose kystique.....	6
2.1.2 Structure de la protéine CFTR	6
2.1.3 Lien entre le défaut génétique et les infections respiratoires.....	7
2.1.4 Colonisation pulmonaire.....	9
2,2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.2.1 Classification	11
2.2.2 Culture	11
2.2.3 Les pigments.....	12
2.2.4 Pathogénicité.....	13

		II
2,3	Susceptibilité et résistance aux traitements.....	13
2.3.1	Les β -lactames.....	14
2.3.2	Les aminoglycosides.....	15
2,4	Les liposomes.....	16
2.4.1	Historique.....	16
2.4.2	Caractéristiques physico-chimiques.....	18
2.4.3	Températures de transition de phase.....	19
2.4.4	Miscibilité des phospholipides présents.....	20
2.4.5	Utilisation du cholestérol (CHOL).....	20
2.4.6	Potentiel des liposomes.....	22
2,5	Objectifs du présent travail de recherche.....	22
III.	MATERIEL ET METHODES.....	25
3.1	Matériel.....	25
3.1.1	Les phospholipides.....	25
3.1.2	Le tampon.....	29
3.1.3	Les antibiotiques.....	29
3.1.4	Bactéries et conservation des souches.....	29
3.1.5	Animaux.....	30
3.1.5.1	Modèle murin.....	30
3.1.5.2	Modèle animal d'infection chronique.....	31

3.2	Méthodes.....	31
3.2.1	Détermination de la CMI.....	31
3.2.2	Production des chémoliposomes.....	33
3.2.2.1	Méthode de déshydratation/réhydratation.....	33
3.2.2.2	Filtrations et lavages.....	35
3.2.3	Dosage des phospholipides.....	35
3.2.4	Préparation de solutions de référence McFarland.....	36
3.2.5	Dosage des antibiotiques par méthode microbiologique	36
3.2.5.1	Souche indicatrice: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619.....	36
3.2.6	Méthode de dosage HPLC.....	39
3.2.7	Calorimétrie à balayage différentiel (DSC).....	41
3.2.8	Cinétique <i>in vitro</i>	42
3.2.9	Cinétique <i>in vivo</i>	43
3.2.10	Modèle animal d'infection chronique à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
3.2.10.1	Enrobage des bactéries dans des billes d'agar.....	44
3.2.10.2	Infection.....	45
3.2.10.3	Traitements.....	46
3.2.10.4	Préparation et analyse des suspensions de tissus.....	46

	IV		IV
IV	RESULTATS.....		48
4.1	Dosage microbiologique de la tobramycine sur une souche indicatrice		
	de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619.....		48
4.2	Analyse quantitative de la tobramycine par HPLC.....		48
4.3	Reproductibilité des analyses HPLC sur deux appareils différents.....		49
4.4	Analyse des paramètres affectant la quantité d'antibiotique encapsulée.....		55
4.5	Influence du gradient de porosité des filtres sur la perte d'antibiotique encapsulé.....		55
4.6	Détermination de la température de transition de phase (T_c) de différentes formulations		
	liposomales après incorporation de l'antibiotique.....		62
4.7	Cinétique <i>in vitro</i> de libération de l'antibiotique à partir des différentes		
	formulations liposomales.....		68
4.8	Cinétique <i>in vivo</i> et persistance pulmonaire chez un modèle animal murin non infecté.....		74
4.9	Analyse de l'effet bactéricide anti- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de chémoliposomes		
	sur un modèle animal d'infection chronique.....		79
V	DISCUSSION ET CONCLUSION.....		85
5.1	Analyse quantitative de la tobramycine.....		86
5.2	Paramètres affectant l'encapsulation.....		88
5.3	Influence de la T_c et des différents phospholipides sur le comportement des		
	chémoliposomes.....		89

5.4	Persistence pulmonaire de la tobramycine encapsulée chez un modèle animal murin non infecté.....	91
5.5	Formulation liposomale à effet bactericide.....	93
5.6	Prospective.....	96

BIBLIOGRAPHIE.....	99
--------------------	----

ANNEXES

1.	Pulmonary retention of free and liposome-encapsulated tobramycin after intratracheal administration in uninfected rats and rats infected with <i>P. aeruginosa</i>	113
----	--	-----

RESUME

Il est reconnu que l'antibiothérapie traditionnelle est impuissante à éliminer les infections pulmonaires chroniques causées par *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de fibrose kystique. La résistance de cette bactérie serait due principalement à l'imperméabilité de sa membrane externe aux antibiotiques et au fait qu'elle secrète des exopolysaccharides muqueux qui la protègent contre les défenses immunitaires de l'hôte ainsi que contre les antibiotiques, rendant son éradication pratiquement impossible avec les moyens thérapeutiques dont nous disposons actuellement.

Dans le but d'augmenter l'efficacité bactéricide des antibiotiques anti-*P. aeruginosa*, en l'occurrence la tobramycine, nous avons cherché à développer une formulation liposomale qui permettrait de prolonger la persistance de l'antibiotique au niveau pulmonaire, d'en diminuer la toxicité et d'en amplifier la pénétration intra-bactérienne tout en modulant sa libération. Les travaux de notre équipe, antérieurs à cette étude, ont permis d'atteindre certains de ces objectifs, mais n'ont pas entraîné une amélioration de l'efficacité bactéricide de nos chémoliposomes sur notre modèle animal d'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa*.

A la lumière de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que le facteur limitant était la composition phospholipidique de nos liposomes qui semblait induire une trop forte stabilité\rigidité "in vivo" de nos chémoliposomes.

Pour résoudre notre problème concernant la trop forte stabilité "in vivo" de nos chémoliposomes, nous avons étudié différents paramètres physico-chimiques touchant plus de 20

mélanges de phospholipides. Dix formulations ont été retenues pour des tests de cinétique "in vitro". Les résultats de ces tests suggéraient que 5 formulations (no 2, no 4, no 5, no 7, no 10) présentaient des cinétiques intéressantes de libération de l'antibiotique comparativement à notre formulation initiale (no 1). Ces formulations ont alors été soumises à des études "in vivo" dans le but de vérifier leur degré de persistance intra-pulmonaire sur des souris normales. Finalement, les formulations les plus prometteuses composées de dipalmytoyl phosphatidylcholine (DPPC) / dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) dans un ratio de 10:1 et 15:1 ainsi que celle composée de distearoyl phosphatidylcholine (DSPC) / dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) dans un ratio molaire de 15:1, ont été testées sur notre modèle animal d'infection chronique à *P. aeruginosa*. La formulation DPPC/DMPG a démontré une efficacité bactéricide importante puisque l'infection, chez les animaux traités avec cette formulation liposomale, a été pour ainsi dire éliminée, le nombre de bactéries dénombré étant inférieur aux normes acceptées comme étant statistiquement significatives. Parallèlement, chez les rats traités avec la formulation DSPC/DMPC 15:1, et chez les rats témoins traités avec la même quantité de tobramycine libre ou à l'aide de liposomes-PBS, on retrouvait des niveaux d'infection supérieurs à $10^6 - 10^7$ c.f.u./ paire de poumons.

Conjointement à ces résultats, notre étude a démontré que le fait d'ajouter l'antibiotique uniquement lors de l'étape de réhydratation permettait d'augmenter le taux d'encapsulation de 30 à 50 % par mole de phospholipides. Nous avons également démontré que la réhydratation des liposomes avec des concentrations de tobramycine, se situant entre 10 et 40 mg/ml, favorisait une meilleure efficacité d'encapsulation. Finalement, notre étude a permis de démontrer que la quantification de la

tobramycine par HPLC à l'aide d'un détecteur U.V. était davantage reproductible aux valeurs limites de détection lorsque l'on utilise une longueur d'onde de 350 nm plutôt que 340 nm tel que suggéré dans la littérature.

En conclusion, les résultats obtenus démontrent que le fait d'encapsuler les antibiotiques dans certaines formulations liposomales favorise fortement leur effet bactéricide. Cet effet bactéricide est probablement dû à une meilleure pénétration de l'antibiotique encapsulé à travers les exopolysaccharides muqueux du *P. aeruginosa* ainsi qu'à un phénomène de fusion qui faciliterait la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie. Les étapes suivantes consisteront à développer une méthode efficace de nébulisation de nos chémoliposomes. Cette méthode éthiquement acceptable d'administration "in situ" de chémoliposomes devrait permettre de traiter efficacement les patients atteints de fibrose kystique. Il sera également important de vérifier si notre formulation liposomale peut être efficace contre d'autres agents infectieux et plus particulièrement contre d'autres bactéries Gram négatif.

N.B.: Une demande de brevet américain portant sur la formulation DPPC\DMPG a été déposée, en date du 23 Décembre 1994, par l'intermédiaire de SWABEY OGILVY RENAULT (S.E.N.C.) agents de brevets et de marques de commerce, 1981 Avenue McGill College, Bureau 1600, Montréal, Québec, Canada, H3A 2Y3

REMERCIEMENTS

A mes parents, pour leur patience et leur encouragement continu.

Au docteur Jacqueline Lagacé (Université de Montréal), ma directrice de recherche, je tiens à exprimer toute ma gratitude, pour son appui, son support exceptionnel, sa grande disponibilité, sa compréhension ainsi que pour m'avoir donné la possibilité d'approfondir mes connaissances en immunologie.

Au Dr Hélène Marie Therrien (Université du Québec à Trois Rivières), co-directrice de projet, pour ses conseils et son encouragement ainsi qu'au Dr Claude Gicquaud pour son assistance dans mes expériences de DSC.

Je désire témoigner ma reconnaissance au personnel du département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal qui a rendu possible la rédaction de ce mémoire, et plus spécialement au personnel du laboratoire du Dr Lagacé pour sa grande collaboration.

Un merci tout spécial à l'Institut de Recherche en Biotechnologie ainsi qu'au Dr. Jalal Hawari et à son équipe pour leur accueil chaleureux et leur collaboration.

J'aimerais aussi souligner l'apport très apprécié de M. Sébastien Clément Major à ce travail de recherche au cours de son stage d'été dans notre laboratoire.

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	PAGE
1. Caractéristiques des phospholipides utilisés.....	26
2. Description des différentes formulations liposomales analysées.....	27
3. Résistance des souches bactériennes utilisées.....	32
4. Description de la composition des tubes McFarland.....	37
5. Analyses de formulations liposomales par calorimétrie à balayage différentiel.....	64
6. Quantification de l'antibiotique (µg/reins) suivant l'administration de liposomes	78
7. Etude de l'effet bactéricide des chémoliposomes chez un modèle animal d'infection chronique à <i>P. aeruginosa</i>	82
8. Etude de l'effet bactéricide des chémoliposomes chez un modèle animal d'infection chronique à <i>P. aeruginosa</i>	83

LISTE DES FIGURES

Figures	PAGE
1. Représentation graphique du diamètre moyen des zones d'inhibition d'une courbe standard en fonction de la concentration de la tobramycine présente.....	50
2. % d'écart entre les valeurs dosées en triplicata en fonction de la longueur d'onde pour une concentration de tobramycine de 15.56 $\mu\text{g} / \text{ml}$	51
3. % d'écart entre les valeurs dosées en triplicata en fonction de la longueur d'onde pour une concentration de tobramycine de 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$	52
4. Surface intégrée par HPLC en fonction de la variation de la longueur d'onde pour une concentration de tobramycine de 15.56 $\mu\text{g} / \text{ml}$	53
5. Surface intégrée par HPLC en fonction de la variation de la longueur d'onde pour une concentration de tobramycine de 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$	54

6.	Comparaison entre le dosage effectué à l'Université de Mtl et celui effectué à l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB) pour les mêmes inconnus analysés par HPLC.....	57
7.	Concentration de tobramycine encapsulée suite à l'utilisation de quantités variables d'antibiotique lors de la fabrication et de la réhydratation des liposomes.....	58
8.	Courbes du pourcentage de pertes en fonction du nombre de filtrations sous filtre pressurisé.....	59
9.	Courbes du pourcentage de pertes en fonction du gradient de porosité des filtres.....	60
10.	Courbe de la tobramycine détectée en fonction du gradient de porosité des filtres pour la formulation liposomale DPPC/DMPC (10:1).....	61
11.	Calorimétrie à balayage différentiel.....	65
12.	Calorimétrie à balayage différentiel.....	66

13.	Calorimétrie à balayage différentiel.....	67
14.	Cinétique <i>in vitro</i> de libération de l'antibiotique à partir des formulations:	
A:	DSPC/DMPG.....	69
B:	DSPC/DMPC.....	70
C:	DSPC/DPPC.....	71
D:	DPPC/DMPG.....	72
E:	DPPC/DMPC.....	73
15.	Persistance pulmonaire de la tobramycine chez un modèle animal murin non infecté :	
A:	DPPC/DMPG.....	75
B:	DPPC/DMPC.....	76
C:	DSPC/DMPC.....	77

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléique
ATP:	Adénosine triphosphate
°C:	Degré Celcius
ex:	Exemple
FK:	Fibrose kystique
LPS:	Lipopolysaccharide
OMP:	Protéine de la membrane externe
pb:	Paire de bases
µg:	Microgramme
µl:	Microlitre
µmole:	Micromole
µm:	Micromètre
nm:	Nanomètre
ml:	Mililitre
P.A.:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS:	Tampon phosphate salin
PL:	Phospholipides
DSC:	Calorimétrie à balayage différentiel

CMI:	Concentration minimale inhibitrice
C.F.T.R.:	Protéine régulatrice transmembranaire de la Fibrose kystique
DSPC:	Disteroyl phosphatidylcholine
DMPC:	Dimyristoyl phosphatidylcholine
DMPG:	Dimyristoyl phosphatidylglycerol
DPPC:	Dipalmitoyl phosphatidylcholine
CHOL:	Cholesterol

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa, un pathogène opportuniste, est responsable de la majorité des décès chez les patients atteints de fibrose kystique. Sa présence chronique au niveau du tractus respiratoire de la majorité des patients atteints de fibrose kystique favoriserait la sécrétion d'un mucus anormalement épais. Ces facteurs couplés à l'imperméabilité de la membrane externe de la bactérie et à la sécrétion d'exopolysaccharides muqueux rendent son éradication presque impossible avec les moyens thérapeutiques actuels. De plus, chez ces patients, une élimination rapide des antibiotiques couplée à une administration à des doses se situant près des zones de toxicité des molécules, ne permettent pas une action bactéricide efficace. Dans le but d'augmenter l'efficacité bactéricide des antibiotiques anti-*P.aeruginosa*, nous avons tenté de développer une formulation liposomale permettant de prolonger la demie-vie de l'antibiotique, d'en diminuer la toxicité et d'en augmenter l'effet bactéricide.

Nos récents travaux (Omri *et al.*, 1994) confirment qu'il est possible d'augmenter de façon marquée le temps de persistance de la tobramycine dans le système pulmonaire, suite à son encapsulation dans des liposomes. Ces travaux ont également démontré une baisse de la toxicité des antibiotiques au niveau rénal. Toutefois, la formulation liposomale utilisée n'a pas permis d'augmenter l'efficacité bactéricide de l'antibiotique.

Les informations obtenues, nous ont toutefois permis d'identifier les forces et les faiblesses de nos travaux, et de modifier notre démarche expérimentale en conséquence. C'est ainsi que nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation de phospholipides présentant des températures de transition de phase (Tc) inférieures à la température corporelle, pourrait permettre une meilleure modulation de la libération des antibiotiques ainsi qu'une meilleure miscibilité avec les phospholipides des bactéries.

Ce travail a consisté à élaborer de nouvelles formulations liposomales, à déterminer leur Tc réelle par calorimétrie à balayage différentiel (DSC) et à tester ces formulations dans des expériences de cinétiques "in vitro" et "in vivo". Par la suite, les formulations les plus prometteuses ont été testées pour leur effet bactéricide dans un modèle animal d'infection chronique à *P. aeruginosa*.

Une des formulations liposomales testées a démontré un effet bactéricide très important comparativement à l'utilisation de tobramycine libre sur notre modèle animal d'infection chronique à *P.aeruginosa*. De plus, contrairement au tissu pulmonaire, la concentration d'antibiotique retrouvée au niveau rénal était minimale. Le taux sérique était inférieur à 1,9 µg / ml ce qui correspond au seuil de détection limite de la méthode.

REVUE DE LA LITTERATURE

II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 La fibrose kystique

La fibrose kystique (FK), ou mucoviscidose, est une maladie héréditaire mortelle très répandue. Elle est causée par un gène autosomique récessif. Elle touche la population caucasienne selon une incidence de 1/2000 à 1/4000 naissances en Europe et en Amérique du Nord (Cohen, 1986).

Cette maladie se caractérise par une sécrétion anormale des ions à travers les canaux chlore des cellules épithéliales des glandes exocrines ainsi que des cellules de l'arbre respiratoire (Jallat, 1991).

Cliniquement, on observe un épaissement des sécrétions exocrines qui viennent obstruer les voies respiratoires aériennes supérieures et favoriser les infections pulmonaires répétées. Ces atteintes répétées causent la destruction progressive des bronches et des bronchioles du poumon et conduisent irréversiblement à une insuffisance respiratoire (Di Sant'Agnese, 1979; Pennington *et al.*, 1979; Marks, 1981). Depuis les 20 dernières années, le taux de survie des patients atteints de fibrose kystique a considérablement augmenté pour atteindre en 1991, un âge moyen de survie de 29,4 ans aux Etats-Unis (Fiel, 1993). Cette amélioration notable a été rendue possible grâce aux nombreuses approches thérapeutiques, qui agissent à titre préventif ou qui visent à diminuer certains symptômes sans toutefois permettre de traiter le défaut primaire de la maladie.

2.1.1 Le gène de la Fibrose Kystique

Cinquante-trois ans après la première description de la maladie, le gène responsable de ce désordre métabolique généralisé fut identifié et localisé sur le bras long du chromosomes 7 (Tsui *et al*, 1985), puis cloné deux ans plus tard en 1989 par le groupe de Riordan, Tsui et Collins (Rich, 1991; Tsui *et al.*, 1991). Ce gène est exprimé dans plusieurs tissus affectés chez les patients atteints de fibrose kystique, comme les poumons, le pancréas, le foie, les glandes sudoripares ainsi que l'épithélium respiratoire. Le gène de la fibrose kystique code pour une protéine de membrane qui est associée directement à la régulation et au transport des ions à l'intérieur du canal chlore. Cette protéine se nomme protéine régulatrice transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR). L'identification et le clonage de ce gène furent une étape déterminante dans la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des anomalies cellulaires fonctionnelles de la mucoviscidose.

2.1.2 Structure de la protéine CFTR

Le gène FK code pour une protéine transmembranaire de 170 kDa sous sa forme mature glycosylée. La protéine CFTR, qui comporte deux domaines transmembranaires à six hélices hydrophobes, est avant tout une protéine cytosolique formée de deux domaines hydrophiles NBF1 et NBF2 (*nucleotide binding fold*), sites de fixation de l'ATP et d'un domaine régulateur R, phosphorylé par des protéines kinases (Quinton, 1983).

Il est important de préciser que les fonctions physiologiques de cette protéine (CFTR) sont encore incomplètement connues. Il est cependant admis que la CFTR est un canal ionique de faible conductance (7 pS), sélectif pour les anions ($\text{Br} > \text{Cl} > \text{I}$) et contrôlé par l'AMPc par l'intermédiaire de la phosphorylation de CFTR par une protéine kinase A au niveau du domaine R.

La principale mutation de la protéine CFTR, présente chez plus de 70% des sujets atteints, est une délétion d'un simple résidu d'acide aminé en position 508. La prépondérance de cette délétion varie selon la localisation géographique des patients. A ce jour, plus de 60 mutations, autres que la 508, ont été recensées chez des patients atteints de FK (Boucher *et al.*, 1986; Quinton, 1983; Rommens *et al.*, 1988; Tsui, 1991).

La disponibilité d'anticorps développés contre des peptides de synthèse et reconnaissant certains épitopes des différents domaines CFTR, a permis la localisation de la protéine CFTR dans les différents épithéliums. (Stratton *et al.*, 1987; Trias *et al.*, 1989).

2.1.3 Lien entre le défaut génétique et les infections respiratoires

Chez les sujets normaux (non FK), les ions chlore quittent les cellules via les canaux calciques se trouvant sur la bordure apicale de la membrane plasmique. Ces canaux s'ouvrent lorsqu'il y a augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc, ce qui active une protéine kinase, qui à son

tour vient phosphoryler, soit le canal calcique, soit une protéine de régulation permettant l'ouverture de ce dernier. Chez les individus normaux, la surface de l'arbre trachéo-bronchique est constituée d'un épithélium cilié capable de sécréter une variété de composés. Son rôle est d'éliminer les particules et les microorganismes susceptibles de s'introduire dans le tractus respiratoire inférieur. La surface pulmonaire (Gaillard *et al.*, 1992) est recouverte d'une fine couche fluide composée principalement de liquide péricellulaire (phase sol) et de glycoprotéines (mucines) sécrétées par les cellules à gobelets.

Dans le cas de patients FK, les différentes mutations génétiques répertoriées chez la protéine CFTR interfèrent dans la régulation du transport des ions chlore à travers la membrane des cellules épithéliales. La protéine canal Cl^- CFTR participe aux flux ioniques transépithéliaux qui s'accompagnent d'un flux d'eau modulant l'hydratation du mucus et de la muqueuse respiratoire et contrôlant par ce fait l'osmolarité du liquide dans lequel baigne les cellules épithéliales. Les modifications de l'osmolarité de la phase périciliaire peuvent empêcher l'hydratation du mucus, augmenter sa viscosité et finalement inhiber son exocytose, diminuant ainsi le transport muco-ciliaire (Quinton, 1994). Ces modifications d'osmolarité pourraient également favoriser une augmentation de l'apparition de récepteurs membranaires tels les glycolipides, glycoprotéines ou protéoglycans qui seraient spécifiquement reconnus par *P. aeruginosa* (Pennacino-Savage *et al.*, 1990). Les mécanismes de libération naturelle du poumon (Hoiby, 1982) étant alors largement paralysés par l'épaississement des sécrétions en raison du mauvais fonctionnement des canaux calciques. L'épithélium respiratoire serait alors progressivement infecté et ensuite endommagé par des réactions inflammatoires chroniques.

Une question demeure à ce jour sans réponse, à savoir, si les infections à *Pseudomonas* sont avant tout secondaires à une diminution primaire de la libération naturelle du poumon au niveau muco-ciliaire par les cellules épithéliales en réponse à un environnement particulier ou tout simplement si la diminution de cette libération naturelle muco-ciliaire causée par des néo-récepteurs membranaires de l'épithélium (Hoiby, 1982) induits par la libérations d'exotoxines bactériennes dans la lumière bronchique (Girod de Benlzmann *et al.*, 1994).

2,1,4 Colonisation pulmonaire

Chez les patients atteints de FK, la colonisation bactérienne au niveau pulmonaire apparaît relativement tôt après la naissance (Myers *et al.*, 1983; Wood, 1989). Habituellement, *Staphylococcus aureus* (Sa) et *Haemophilus influenzae* (Hi) sont les premières bactéries recensées et associées aux problèmes bronchiques chroniques. A ce stade, l'antibiothérapie parvient normalement à éliminer la ou les souches bactériennes présentes. *Staphylococcus aureus* adhère à la muqueuse pulmonaire par l'intermédiaire de la fibronectine. La disparition de cette glycoprotéine de la surface de l'épithélium pulmonaire, coïncide avec l'invasion et la colonisation par *P. aeruginosa* (Foucaud *et al.*, 1990). La très forte colonisation par *P. aeruginosa*, (plus de 10^8 bactéries par millilitre d'expectoration chez certains patients atteints de FK) attire une très grande quantité de granulocytes dans la lumière de l'arbre bronchique (Ney, 1983; Smith *et al.*, 1988), ce qui a pour effet de créer une augmentation de la viscosité du mucus due à la présence de fortes concentrations d'ADN (Lethem *et al.*, 1990).

D'autres microorganismes anaérobiques et aérobiques tels des champignons ainsi que des bactéries Gram positif et des bactéries Gram négatif ont été répertoriées (Bellon *et al.*, 1991), mais *P. aeruginosa* demeure le pathogène dominant (Bodey *et al.*, 1983). Le rôle des bactéries aérobiques et anaérobiques (Thomassen *et al.*, 1984) ainsi que celui des infections virales ou encore à champignons ne sont pas totalement clarifiés (Petersen *et al.*, 1981); il est cependant certain que ces agents participent à la détérioration de l'état général des patients.

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie opportuniste, Gram négatif, mobile grâce à un flagelle polaire, et se développant généralement dans des conditions d'aérobie stricte. Ce batonnet mesure 0,5 à 1 mm par 1,5 à 4 mm de long et ne forme pas de spores. C'est une bactérie présentant une réaction positive au test de cytochrome-oxydase ainsi qu'à la catalase. Sur un milieu minimal, les colonies de *P. aeruginosa* sont opaques, planes, légèrement crèmeuses et possèdent un aspect nacré à reflet métallique. La pigmentation ainsi que l'odeur caractéristique du raisin originant de la production d'aminocétophénone demeurent des caractéristiques intéressantes pour le diagnostic. Grâce à sa capacité d'adaptation à différentes conditions physiques et à ses exigences nutritionnelles minimales, *P. aeruginosa* peut croître dans plusieurs environnements. Il s'agit de la bactérie qui sécrète le plus grand nombre de pigments et d'exoproduits dans le milieu où elle se développe.

2.2.1 Classification

Louis Pasteur, à la fin du XIX^{ième} siècle, a donné la première description du *P. aeruginosa*. A cette époque les médecins observaient la présence d'une coloration bleu-verte sur les pansements de certains de leurs patients. Cette coloration caractéristique provient de la pyocyanine : "pyo" pour pus et "cyanine" pour bleu.

P. aeruginosa comporte 17 sérotypes. Cette classification repose sur la diversité de la chaîne O des lipopolysaccharides (LPS), un complexe où sont étroitement associés glucides, lipides et protéines. La spécificité antigénique de la chaîne O repose sur la nature des LPS et de leur mode de liaison. Il faut cependant prendre note que les souches muqueuses, isolées de patients, sont déficientes pour l'expression de cette chaîne, ce qui les rend non classifiables par cette méthode (Hancock *et al.*, 1979; Hancock, 1984; Hancock, 1985).

2.2.2 Culture

La croissance de cette bactérie est possible à des températures variant de 5 à 42 °C, avec un optimum de croissance à 37 °C. La bactérie se cultive facilement dans un milieu synthétique minimal simple en présence de NH₄⁺ comme source d'azote, de glucose et d'asparagine comme source de carbone (Fick *et al.*, 1989). *P. aeruginosa* est une bactérie oxydative qui se développe dans des

conditions d'aérobie stricte. Elle peut cependant croître en anaérobie en présence d'arginine, utilisant l'azote comme accepteur final d'électrons (Fick *et al.*, 1989).

2.2.3 Les pigments

P. aeruginosa sécrète deux types de pigments: la pyocyanine et la pyoverdine. La pyocyanine est un pigment bleu-vert fluorescent, dérivé de la phénazine. La production de pyocyanine est largement favorisée par l'utilisation d'un milieu très bien aéré contenant peu de sels. La pyocyanine est une sidérophore qui est capable de réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} rendant ainsi le fer accessible pour la croissance de la bactérie.

P. aeruginosa est un des premiers microorganismes dont on a démontré que les pigments présentaient un effet antibiotique (Parry *et al.*, 1976; Young *et al.*, 1984). La présence de ces pigments peut expliquer la colonisation dominante de *P. aeruginosa* et l'inhibition des autres bactéries qui sont normalement présentes dans la flore de l'arbre respiratoire. La phénazine vient principalement inhiber la fonction ciliaire et par le fait même altérer la réponse immunitaire chez l'humain (Godfrey *et al.*, 1981 et 1984).

La pyoverdine, pour sa part, est un pigment vert fluorescent dont la production est favorisée par le mélange de phosphate-sulfate et de glycérol.

2.2.4 Pathogénicité

La pathogénicité du *P. aeruginosa* n'est pas totalement comprise. Cependant plusieurs facteurs de virulences ont été clairement identifiés: 1) l'importance de la membrane externe de la bactérie aux points de vue de la persistance de l'infection, de l'adhésion, de la formation de microcolonies, de l'exclusion de nutriments et de sa faible perméabilité naturelle face aux agents antibactériens; la mesure directe de la perméabilité de la membrane externe indique que les taux de pénétration des antibiotiques face au *P. aeruginosa* (souche sauvage) représentent environ de 1 à 8 % de celui d'*Escherichia coli* (Angus *et al.*, 1984; Yoshimura *et al.*, 1982); 2) différents produits extra-cellulaires ou associés à la paroi de la bactérie tels la phospholipase C, l'élastase, la protéase alcaline, l'exoenzyme S, l'alginate, etc. entraînent, selon plusieurs études des effets délétères chez l'hôte (Nev, 1983; Pier, 1985).

La virulence de cette bactérie est fonction de sa mucosité. Plus de 80 % des souches isolées des expectorations de patients FK sont muqueuses comparativement à moins de 3% chez des sujets non atteints de FK (Hoiby, 1975).

2.3 Susceptibilité et résistance aux traitements

Le traitement des infections à *P. aeruginosa* est un défi constant pour les cliniciens. Ce microorganisme n'est pas sensible aux antibiotiques conventionnellement utilisés et n'est jamais complètement éliminé du tractus respiratoire des patients atteints de FK (Fick *et al.*, 1989; Geddes *et*

al., 1988). Durant le traitement, les antibiotiques injectés par voie intraveineuse en quantité massive, sont retrouvés dans le mucus pulmonaire à de très faibles concentrations (Marks, 1981; Permin *et al.*, 1993).

Trois mécanismes bactériens viennent expliquer la résistance acquise aux antibiotiques: 1) l'inactivation ou la modification du composé par un enzyme 2) une imperméabilité accrue de la membrane externe 3) et une modification de la cible visée (Van Klingeren, 1988). Les souches de *P. aeruginosa* peuvent produire des enzymes telles la β -lactamase (Sawai *et al.*, 1988) qui inactive les β -lactamines, alors que l'aminoglycoside acétyltransferase, la phosphoryltransferase et l'adényltransferase (Van Klingeren, 1988) inactivent les aminoglycosides. La résistance intrinsèque de la bactérie, qui se traduit par une faible perméabilité de la membrane externe aux différents antibiotiques, joue également un rôle très important. Les LPS et les protéines de la membrane externe (OMPs) seraient responsables de cette obstruction, que ce soit envers les β -lactamines (Godfrey *et al.*, 1987), l'imipenem (Busher *et al.*, 1987; Studemeister *et al.*, 1988), les quinolones (Daikos *et al.*, 1988) ou les aminoglycosides (Hancock, 1985; Norris *et al.*, 1989; Parr *et al.*, 1988).

2.3.1 Les β -lactames

Depuis les 20 dernières années, plusieurs dérivés de pénicillines et de céphalosporines ont été utilisés pour lutter contre les infections à *P. aeruginosa*. Plusieurs de ces composés se sont avérés inefficaces. La carbenicilline, l'alpha-carboxypenicilline et la ticarcilline sont les premières molécules de

la famille des β -lactames à présenter une activité contre *P. aeruginosa* (Rolinson, 1986). Ces antibiotiques sont de 2 à 4 fois plus efficaces que la molécule mère, ils sont administrés en doses considérablement plus faibles, réduisant ainsi la disfonction plaquettaire et l'hypokaliémie (Parry *et al.*, 1976). Malgré les bienfaits que procurent ces antibiotiques, leur utilisation clinique est limitée par leur activité modérée et surtout par la grande facilité des β -lactamases à les inactiver. De plus, l'apparition rapide d'une résistance face aux souches impliquées diminue grandement leur intérêt. La concentration minimale inhibitrice (CMI) des acylureidopenicillines, piperacillines, mezlocillines et azlocillines contre *P. aeruginosa* est approximativement 20 fois plus basse que celle des carboxypenicillines.

Les carbapénèmes représentent une autre classe de β -lactames démontrant une forte activité contre *P. aeruginosa*. Ces molécules possèdent une double liaison en position 2-3 et un atome de carbone au lieu d'un de soufre dans leur structure interne. Seul un composé commercial dérivant des pénèmes est présentement sur le marché, l'imipénème. L'action de cet antibiotique est principalement dirigé contre les différentes espèces de *Pseudomonas*.

Dans le groupe des céphèmes, seules les céphalosporines de troisième et quatrième génération, peuvent présenter une activité modérée contre *P. aeruginosa*.

2.3.2 Les aminoglycosides

Les aminoglycosides représentent les molécules les plus étudiées dans le cadre du combat contre les bactéries Gram négatif. Ces molécules ont été spécialement conçues pour le traitement des infections du tractus urinaire. Habituellement, ce type de médicament est utilisé en synergie avec une

pénicilline ou une céphalosporine (Young *et al.*, 1984). Un des principaux facteurs limitants de ce genre de traitement est la très grande variabilité de la pénétration de l'antibiotique dans différents tissus (Stephens *et al.*, 1983). Chez les patients atteints de FK, ce problème de pénétration est très important car l'on doit augmenter la dose par un facteur d'au moins dix et ce même pour les traitements en aérosols. Le facteur limitant le plus important lors de l'utilisation de ce type d'antibiotique est la toxicité du produit. Les aminoglycosides entraînent une néphrotoxicité au niveau du cortex rénal et une atteinte au niveau de la branche vestibulaire de l'oreille interne et du huitième nerf cranien se traduisant par une surdité irréversible. Souvent cette toxicité est plus néfaste pour le patient que le bienfait que peut apporter le traitement (Ristuccia *et al.*, 1992).

Parmi tous les aminoglycosides connus à ce jour, seules la gentamycine, l'amikacine et la tobramycine sont utilisées dans le traitement des infections à *Pseudomonas*. La CMI de la gentamycine et de la tobramycine pour *P. aeruginosa* est approximativement de 6 µg/ml, ce qui est extrêmement près de la dose sérique limite normale chez l'humain, soit 5 mg/Kg/jour (Ristuccia *et al.*, 1992). Pour cette raison, on utilise régulièrement un traitement combiné avec une pénicilline (Rabin *et al.*, 1980).

2.4 Les Liposomes

2.4.1 Historique

En 1965, Bangman introduisait le concept de liposomes (Bangham *et al.*, 1974). Les liposomes sont de petites vésicules dont les membranes sont constituées de phospholipides (PL).

Ceux-ci peuvent s'organiser de trois façons différentes dans l'eau: en micelles, en feuillets doubles ou encore en liposomes. Le type de structure formée par un PL (ou par un mélange de PL) purifié dépend de la longueur et de la saturation des chaînes acyles grasses, de la température, de la composition ionique du milieu aqueux et du mode utilisé pour disperser les PL dans la solution.

Quand on agite vigoureusement dans l'eau une solution de PL, certains d'entre eux vont s'agréger en *micelles* (structures sphériques atteignant jusqu'à 20 nm de diamètre); les chaînes hydrocarbonées sont prises au piège au centre des micelles et les groupes polaires restent à la surface au contact de la phase aqueuse.

Les PL peuvent aussi former spontanément des structures en feuillets symétriques en milieu aqueux. Les chaînes hydrocarbonées de chaque feuillet réduisent leur contact avec l'eau en se serrant l'une contre l'autre au centre de la bicouche (Chapman, 1984). Leur compactage est stabilisé par des interactions de Van der Waals (Chapman, 1984) entre les chaînes de PL adjacents. Des liaisons ioniques et hydrogènes stabilisent les interactions des têtes polaires avec l'eau. Une bicouche phospholipidique peut former un plan de dimension importante, allant de quelques nm à quelques mm. Les liposomes sont donc des structures bilamellaires sphériques plus grandes que des micelles et dont le centre est occupé par une phase aqueuse. Les liposomes peuvent accommoder des molécules hydrophiles dans leurs espaces aqueux et des molécules lipophiles dans les doubles couches de lipides.

La méthode de fabrication proposée par Bangham (Bangham *et al.*, 1974) produit des vésicules multilamellaires. Cette méthode consiste simplement à évaporer une solution contenant des PL dans un solvant organique afin de former un mince film dans un ballon; ce dernier est par la suite réhydraté avec la solution que l'on désire encapsuler.

Pour notre part, nous utilisons la méthode de Kirby et Gregoriadis (Kirby *et al.*, 1984) mieux connue sous le nom de méthode de déshydratation-réhydratation. Les liposomes sont lyophilisés, et par la suite réhydratés avec un petit volume de solution à encapsuler.

2.4.2 Caractéristiques physico-chimiques

Le choix des PL lors de la fabrication des liposomes est très important. Ces derniers influencent le taux d'encapsulation, la demi-vie, le potentiel de libération et le taux de rétention. Certains utilisent des PL naturels tels la phosphatidylcholine extraite du jaune d'oeuf, le cholestérol ainsi que des PL extraits de cellules ou de bactéries (Vakirtzi-Lemonias *et al.*, 1981). Ces PL naturels sont oxydés à l'air libre et l'utilisateur doit travailler constamment sous un jet d'azote pour éviter leur oxydation. On peut également se procurer commercialement de nombreux phospholipides synthétiques qui comportent des extrémités saturées.

L'utilisation de différentes combinaisons de phospholipides permet de moduler la température globale de transition de phase (T_c) des liposomes et/ou de leur fournir la charge électrique désirée en ajoutant des phospholipides chargés négativement ou positivement.

L'utilisation d'un calorimètre à balayage différentiel (DSC), permet d'évaluer théoriquement le comportement des différentes formulations liposomales. En créant différents mélanges de PL à des ratios différents, on peut optimiser les conditions de libération des substances encapsulées dans les liposomes.

2.4..3 Température de transition de phase

Chaque phospholipide se caractérise par une température de transition de phase (T_c), qui se définit comme la température minimale requise pour permettre à la phase aqueuse de pénétrer entre les couches de lipides (Chapman, 1984). A cette température, l'organisation des chaînes d'hydrocarbones devient labile, le mouvement moléculaire s'accélère et l'épaisseur de la membrane ainsi que l'espace entre les molécules augmentent (Chapman, 1984). En élevant la température au-dessus de la T_c , il y a une dissociation du réseau ionique par l'entrée de la phase aqueuse, et la membrane entre dans un état fluide caractérisé par un mouvement rapide des molécules dans le plan de la membrane et un processus très lent de "flip flop" s'installe (Wilschut, 1982). La T_c dépend de la nature de la chaîne d'acide gras et de la région polaire, ainsi que de la nature de la substance encapsulée à l'intérieur de la vésicule formée. Généralement, la T_c est abaissée par la diminution de la longueur de la chaîne acyle, par l'existence de

doubles liaisons entre deux carbones, par la ramification de la chaîne et par la présence de noyaux aromatiques (Chapman, 1984; Szoka *et al.*, 1981).

2.4.4 Miscibilité des phospholipides présents

La miscibilité des phospholipides doit être prise en considération lors de l'utilisation de plusieurs Pl différents pour la fabrication de chémoliposomes. Par exemple, deux molécules de phosphatidylcholine qui diffèrent par deux atomes de carbone dans leur chaîne d'acide gras sont miscibles, ceux qui diffèrent par quatre atomes de carbone sont partiellement miscibles, alors que ceux différant par six atomes de carbone sont non miscibles et sont à l'état de gel. La sélection de phospholipides non miscibles dans la fabrication de chémoliposomes, entraîne l'apparition de domaines de fluidité ou d'organisations hétérogènes de la membrane, ce qui provoque une augmentation de la taille des vésicules et affecte leur perméabilité (Massari *et al.*, 1986). La Tc des molécules miscibles ne diffère que par 20 °Kelvin alors que cet écart passe à 30 °Kelvin pour des molécules partiellement miscibles, et à 40 °Kelvin pour des molécules non miscibles. Cependant, l'addition de phosphatidylcholine à des concentrations inférieures à 12 % augmente la stabilité des domaines de fluidité (Massari *et al.*, 1986).

2.4.5 Utilisation du cholesterol (CHOL)

Le cholesterol (CHOL) est souvent utilisé pour la fabrication de liposomes. Plusieurs études antérieures ont démontré que la présence, dans la couche lipidique des vésicules, de cet alcool cyclique

possédant une Tc extrêmement élevée, améliore la stabilité membranaire. Le CHOL, en raison de sa structure moléculaire, lorsqu'utilisé conjointement avec d'autres phospholipides, stabilise le liposome en diminuant les mouvements inter-moléculaires. Il augmente également l'orientation perpendiculaire des chaînes acyles par rapport aux têtes polaires et masque ainsi la Tc des autres constituants lorsqu'il représente plus de 33 % du rapport molaire (Szoka *et al.*, 1981). De plus, le CHOL diminue la perméabilité aux ions et aux petites molécules polaires, réduisant ainsi l'habileté de certaines protéines à pénétrer la membrane et à augmenter le désordre moléculaire (Szoka *et al.*, 1981). L'encapsulation de substances hydrophiles est favorisée par l'utilisation du CHOL. Cependant, pour la plupart des vésicules composées de phospholipides saturés, formant des membranes sous forme de gel, l'addition de CHOL à ces dernières, peut conduire à une baisse de l'encapsulation et de la rétention d'une substance selon le type de PL utilisé (Puisseux *et al.*, 1985). Cet alcool cyclique est surtout ajouté aux mélanges lipidiques composés de PL à faible Tc et préférentiellement insaturés. Il est important de préciser que la présence de doubles liaisons dans la construction de molécules phospholipidiques entrant dans la formation des liposomes peut constituer un facteur négatif, à cause des risques de peroxydation. En fait les phospholipides insaturés peuvent former des liens avec l'oxygène et ainsi contribuer à la génération d'époxydes, d'aldéhydes, de cétones et de lactones nocifs pour la stabilité de la membrane du liposome (Konings, 1984). Ce mécanisme requiert de l'énergie, qui peut être fournie par la chaleur ou par des réactions d'oxydoréduction en présence d'une source de radicaux libres comme l'oxygène. Pour contrer ce phénomène, certains incorporent de l'hydroquinone dans les préparations de liposomes et maintiennent les préparations sous atmosphère d'azote ou d'argon (Frokjaer *et al.*, 1984; Hancock *et al.*, 1979; Konings, 1984; Lijana *et al.*, 1986).

2.4.6 Potentiel des liposomes

L'utilisation potentielle de liposomes comme molécules porteuses de médicaments (Gregoriadis *et al.*, 1985), contre certaines souches bactériennes résistantes aux traitements conventionnels présente un grand intérêt. En plus de réduire le niveau de toxicité des médicaments (Omri *et al.*, 1994; Padmanabhan *et al.*, 1985), le liposome permet de prolonger la demie-vie d'une molécule biologique (Pederson *et al.*, 1986) et de diminuer la quantité à administrer. En augmentant la durée de contact de l'antibiotique avec la cellule bactérienne, on potentialise son effet et cela avec des doses beaucoup moins importantes d'antibiotique. Les drogues incorporées dans les liposomes sont protégées contre les attaques enzymatiques et immunologiques de l'hôte. En plus de présenter une activité thérapeutique accrue (Senior, 1987), les drogues encapsulées dans les liposomes peuvent présenter une distribution différente dans les tissus comparativement à l'état libre (Coune, 1988; Kreuter, 1991).

Les liposomes pourraient également être utilisés dans des protocoles de traitement génique. On peut aussi les utiliser tant au niveau dermique que sous cutané. Finalement les liposomes peuvent être administrés directement au niveau pulmonaire par nébulisation.

2.5 Objectif du présent travail de recherche

Le but de ce travail de recherche était de développer de nouvelles formulations liposomales aptes à permettre une meilleure efficacité bactéricide "in vivo" de la tobramycine encapsulée.

Nos travaux antérieurs suggéraient que notre formulation liposomale de départ n'avait pas démontré l'effet bactéricide attendu en raison d'une stabilité ou rigidité trop importante. C'est la raison pour laquelle, nous avons cherché à modifier notre formulation pour la rendre moins rigide c'est-à-dire plus apte à libérer graduellement son contenu et/ou à favoriser une plus grande miscibilité avec les phospholipides bactériens.

Nous avons donc cherché à développer de nouvelles formulations liposomales que nous avons analysées à l'aide des tests suivants: 1) analyse de la température de transition de phase (T_c) à l'aide d'un calorimètre à balayage différentiel (DSC); 2) cinétique *in vitro* de libération de la tobramycine (37 °C); 3) étude de la persistance intrapulmonaire de l'antibiotique encapsulé 4) étude de l'effet bactéricide sur un modèle animal d'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa*.

Parallèlement, nous avons adapté à nos analyses les techniques suivantes: le dosage des phospholipides et le dosage des antibiotiques par HPLC dans les tissus animaux.

MATERIEL ET METHODES

III MATERIEL ET METHODES

3.1 MATERIEL

3.1.1 Les phospholipides

Les liposomes ont été fabriqués à partir de phospholipides (PL) synthétiques selon la méthode de déshydratation - réhydratation développée par Kirby et Gregoriadis (1984) et modifiée par Winterhalter *et al.* (1993). Pour notre part, nous avons optimisé les paramètres suivants: 1) la déshydratation ou lyophilisation a été effectuée en absence de l'antibiotique qui a été remplacé par du tampon PBS. 2) l'antibiotique à encapsuler a été utilisé à une concentration de 40 mg/ml au moment de la réhydratation.

Nos études ont été effectuées à partir de 5 PL synthétiques possédant les propriétés décrites au tableau 1.

La composition des différentes formulations liposomales analysées au cours du présent travail est présentée ci-dessous (Tableau 2)

Tableau 1: Caractéristiques des phospholipides utilisés

PHOSPHOLIPIDE	POIDS MOLECULAIRE	^fT_c	CHARGE
^a DSPC	790,15	55 °C	nulle
^b DMPG	688,85	23 °C	négative
^c DMPC	677,94	23 °C	nulle
^d DPPC	734,05	42 °C	nulle
^e CHOL	386,70	pas de T _c	nulle

^aDSPC: Disteroyl phosphatidylcholine

^bDMPG: Dimyristoyl phosphatidylglycerol

^cDMPC: Dimyristoyl phosphatidylcholine

^dDPPC: Dipalmitoyl phosphatidylcholine

^eCHOL: Cholesterol

^fT_c: Température de transition de phase

TABLEAU 2: Description des différentes formulations liposomales analysées.

	COMPOSITION EN PL^f	RAPPORT MOLAIRE
1-	DSPC ^a / DMPG ^b	15 - 1
2-	DSPC / DMPC ^c	15 - 1
3-	DSPC / DPPC ^d	15 - 1
4-	DPPC / DMPG	15 - 1
5-	DPPC / DMPC	10 - 1
6-	DSPC / DMPG	10 - 1
7-	DPPC / DMPG	10 - 1
8-	DSPC / DMPC	10 - 1
9-	DSPC / DPPC	10 - 1
10-	DPPC / DMPC	15 - 1
11-	DSPC / DMPG / CHOL ^e	15 - 1 - 1
12-	DSPC / DMPG / CHOL	10 - 1 - 1
13-	DSPC / DMPC / CHOL	15 - 1 - 1
14-	DSPC / DMPC / CHOL	10 - 1 - 1
15-	DPPC / DMPG / CHOL	15 - 1 - 1

16-	DPPC / DMPG / CHOL	10 - 1 - 1
17-	DPPC / DMPC / CHOL	15 - 1 - 1
18-	DPPC / DMPC / CHOL	10 - 1 - 1
19-	DSPC / DPPC / CHOL	15 - 1 - 1
20-	DSPC / DPPC / CHOL	10 - 1 - 1

Description:

^aDSPC: Disteroyl phosphatidylcholine

^bDMPG: Dimyristoyl phosphatidylglycerol

^cDMPC: Dimyristoyl phosphatidylcholine

^dDPPC: Dipalmitoyl phosphatidylcholine

^eCHOL: Cholesterol

^fPL: Phospholipides. Tous les phospholipides utilisés étaient synthétiques (Avanti Polar Lipids, Birmingham, Alabama) à l'exception du cholestérol extrait de jaune d'oeuf (Sigma). Ces PL possèdent une pureté de plus de 99 % et sont conservés à - 70 °C.

La quantification des lipides était effectuée par dosage sur microplaque selon la méthode de Fiske et Subbarow (1925) modifiée (section 3.2.3).

3.1.2 Le Tampon

Toutes les expérimentations ont été effectuées avec du tampon phosphate salin (PBS), pH 7,2 (2,5 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl et 8 mM Na₂HPO₄·7H₂O). Ce tampon a été préparé en solution mère de 10 X, filtré sur une membrane de 0,22 µm (MSI Westboro via Fisher, Montreal, Québec) et conservé à la température de la pièce. Au moment de son utilisation, le tampon a été ramené à 1X et son pH a été vérifié et réajusté à 7,2 si une variation était observée.

3.1.3 Les Antibiotiques

L'antibiotique utilisé pour la fabrication des chémoliposomes était la tobramycine, C₁₈H₃₇N₅O₉, dont le nom commercial est *NEBCIN* (Ely Lili, Scarborough, Ontario). Il s'agit d'un aminoglycoside dont le PM est de 467,54 . Au besoin, les dilutions de la tobramycine ont été effectuées dans de l'eau distillée stérile.

3.1.4 Bactéries et conservation des souches

Les souches retenues pour cette études (à l'exception des souches identifiées ATCC) ont été isolées à partir d'expectorations de patients atteints de FK (Hopital Ste Justine , Montréal, Québec, Canada) et isolées sur géloses C-390: 0,003 % de phénanthroline (Fisher Scientific, Nepean, Ontario), 0,003 % de C-390 (Norwich Eaton Pharmaceuticals inc., Montréal, Québec, Canada) et 3,9 % de

Columbia agar base (BBL Becton Dickinson and Co, Mississauga, Ontario, Canada). Les isolats ont été conservés à - 70 °C dans une infusion coeur-cerveau (BHI) contenant 20 % de glycérol (Difco, montréal, Québec) ou dans du lait de vache 10 % (lait en poudre Carnation). Les souches ont subi un minimum de passages (2 à 3) et ont été congelées en aliquotes de 0,5 ml. D'une expérience à l'autre, les souches étaient donc identiques.

3.1.5 Animaux

3.1.5.1 Modèle murin

Des souris BALB/c (Charles River, Saint-Constant, Québec , Canada) âgées de deux mois ont été utilisées lors des expériences de cinétique *in vivo*. Des souris normales ont été anesthésiées à l'aide d'un mélange de 80 mg de kétamine hydrochlorique par kg (Rogar\STB Inc., Montréal, Québec, Canada) et 1 mg de xylazine par kg (BAYVET Division, Chemagro Limited, Etobicoke, Ontario, Canada) à l'aide d'une injection intramusculaire de 50 µl, dans une des pattes postérieures. Par la suite, on leur a administré une suspension liposomale ou encore des suspensions témoins pour mesurer la persistance intrapulmonaire de l'antibiotique.

3.1.5.2 Modèle animal d'infection chronique

Des rats mâles Sprague-Dawley de 175 - 225 gr (Charles River, Saint-Constant, Québec , Canada) ont été infectés à l'aide d'une souche muqueuse de *P. aeruginosa* , PA 508 isolée à partir d'une expectoration d'un patient atteints de FK. Les bactéries ont été enrobées dans des billes d'agar selon la méthode préalablement décrite par Cash *et al.* (1979) et modifiée par notre équipe (annexe 1)(section 3.2.10.1).

Avant l'infection ou le traitement, les rats ont été anesthésiés avec un mélange de 70 mg de kétamine hydrochlorique par kg (Rogar/STB Inc., Montréal, Québec, Canada) et 7 mg de xylazine par kg (BAYVET Division, Chemagro Limited, Etobicoke, Ontario, Canada) par une injection intramusculaire de 100 µl, dans une des pattes postérieures.

3.2 METHODES

3.2.1 Détermination de la CMI

La CMI se définit comme la concentration minimale inhibitrice, c'est à dire la plus faible concentration d'antibiotique (ATB) capable d'inhiber la croissance bactérienne. La CMI a été effectuée comme suit: une culture bactérienne de 18 hrs a été incubée dans un milieu liquide *Protéose peptone* #2 (Gibco-BRL, Montréal, Québec) 37 °C, avec une agitation de 250 rpm. Cette culture a été par la suite diluée (1/100) dans ce même milieu et une lecture D.O. à 650 nm a été effectuée.

La solution standard d'antibiotique a été diluée dans 4 ml de protéose peptone #2 liquide de façon à obtenir des concentrations variant entre 0 et 100 µg/ml avec des intervalles de 0,5 µg/ml. On déposait alors un volume de 50 µl de chacune des dilutions de culture bactérienne par tube. Ces échantillons ont été incubés 18 hrs à 37 °C avec agitation à 250 rpm. La CMI était déterminée visuellement en prenant note de la concentration la plus faible où il y avait inhibition de la croissance. On confirmait cette observation par une lecture de D.O. à 650 nm.

Des études préliminaires avaient démontré l'absence de résistance à la tobramycine chez les souches de *P. aeruginosa* utilisées:

Tableau 3: Résistance des souches bactériennes utilisées.

SOUCHE	CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (µg/ml)	
508	sensible	(< 10 µg/ml)
ATCC 25619	sensible	(< 10 µg/ml)

N.B.: La sensibilité aux antibiotiques a été mesurée en fonction de la dose quotidienne de tobramycine normalement administrée chez l'humain, soit: 7 mg / Kg / jour.

3.2.2 Production des chémoliposomes

3.2.2.1 Méthode de déshydratation - réhydratation

Les liposomes ont été préparés en grande quantité. Notre recette standard (Omri *et al.*, 1994) comportait 5 lots, ce qui correspond à une quantité moyenne totale de phospholipides d'environ 350 mg. Les phospholipides ont été dissouts dans 100 ml de chloroforme dans un ballon à fond rond, d'une capacité de 250 ml, relié à un roto-évaporateur (Buchi rotovapor-R KRvr 65\45, Brinkman, Toronto, Ontario). Ce dernier était relié à un refroidisseur (Super MT Laura, Brinkman, Toronto, Ontario) réglé à 4 °C. Le ballon était placé dans un bain marie (Buchi 461 Water Bath, Brinkman, Toronto, Ontario) maintenu à une température de 65 °C. La vitesse de rotation du ballon était ajustée à 500 tours/min. et la pression était réglée (Buchi 168, Vacuum\distillation controller, Brinkman, Toronto, Ontario) à 650 mbar pour une période de 15 min ou jusqu'à la fin de la période d'évaporation. Ensuite, le vide était abaissé au minimum pendant au moins 15 min afin de faire disparaître les dernières traces de chloroforme.

Par la suite, le ballon était soulevé au dessus du bain-marie et on le laissait tourner sous vide pendant environ 5 minutes afin de solidifier le film lipidique. Le vide était brisé en fermant le régulateur de pression et en ouvrant la valve située sur l'évaporateur. Le ballon était retiré de l'évaporateur et on y déposait 3,75 ml de PBS 1/20. Par la suite, le ballon était de nouveau relié à l'évaporateur afin de le faire tourner à une vitesse de 700 tours/min. à une température de 65 °C, jusqu'à ce que le film lipidique

soit complètement détaché du ballon. A ce moment, le ballon était retiré du bain-marie, la rotation était arrêtée et 25 ml de PBS étaient ajoutés. On agitait alors vigoureusement la suspension au vortex. Des aliquotes de 5.05 ml étaient placées dans des bouteilles à sérum d'une capacité de 100 ml.

Les aliquotes étaient alors placées dans un bain d'éthanol - glace sèche et un mouvement de rotation permettait de maximiser la congélation sur les parois des bouteilles (congélation sous forme de coquilles). Quand les échantillons atteignaient -70°C , ils étaient placés dans un lyophilisateur (Virtis, GENESIS 12 EL) préalablement refroidi aux températures et normes indiquées par le fabricant. La lyophilisation était effectuée sur une période de 16 à 24 Heures.

Après la lyophilisation, la procédure de fermeture de l'appareil était adaptée pour préserver le vide à l'intérieur de nos bouteilles-échantillons, ce qui permettait une meilleure encapsulation de l'antibiotique lors de la réhydratation. Les bouteilles de liposomes ont été conservées à -70°C avant leur utilisation.

Au moment de l'utilisation, les liposomes étaient réhydratés selon la technique suivante. Avant la réhydratation, les bouteilles contenant les liposomes étaient placées à la température de la pièce pendant environ 30 minutes. Un volume de 3,75 ml d'une solution commerciale de tobramycine (40 mg/ml) était ajouté en maintenant le vide dans chacune des bouteilles échantillons. Elles étaient incubées à 65°C durant une période de 60 min en assurant une agitation vigoureuse à toutes les 10 min. Après ce temps, le vide était brisé et un maximum de 1,5 ml de PBS était ajouté dans chacune des bouteilles.

3.2.2.2 Filtrations et lavages

La solution de liposomes était transférée dans un appareil à filtration pressurisée (*extruder*) (Lipex Biomembranes Inc) en utilisant un filtre de 1.0 μm . Suite à cette filtration la solution était récupérée et passée sur un filtre de 0,6 μm et sur un troisième filtre de 0,4 μm . Après ces trois filtrations consécutives, la solution de liposomes était placée dans un tube à centrifuger et on ajoutait 20 ml de PBS. Une centrifugation à 7610 rpm (5000 g) (rotor SS-34, Sorval model RC 28 S), 30 min. était effectuée. Après cette étape, le surnageant était décanté et un autre lavage avec 20 ml de PBS était effectué. A la fin de ce lavage, le surnageant était de nouveau décanté et le culot de liposomes était resuspendu dans 1 ml de PBS.

3.2.3 Dosage des phospholipides

Le dosage de la teneur en lipides (nombre de mmoles) de chacune de nos préparations de chémoliposomes était effectué par le dosage du phosphate inorganique libéré après minéralisation des phospholipides constitutifs par la méthode de Fiske et Subbarow (1925) et modifiée par Bangham *et al.*, (1974). Brièvement, un échantillon de phospholipides contenu dans 900 μl d'eau distillée était minéralisé à 440 °F (240 °C) pendant une heure en présence de 100 μl d'acide perchlorique. Au résidu, on ajoutait 4 ml d'eau distillée. On ajoutait alors à 63 μl de réactif de molybdate $(\text{NH}_4)_6$

$\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,02 M et 13,6 % v/v de H_2SO_4) et 113 μl du réactif de Fiske & Subbarow, 1 ml de phospholipides déminéralisés. Cette solution était incubée à la température ambiante durant 30 minutes. La quantité de PO_4 était estimée au spectrophotomètre (Miltron Spectronic 1001 plus), par mesure de la densité optique à 660 nm, par référence à une courbe standard qui était préparée avec du KH_2PO_4 (0 - 0,25 mmole).

3.2.4 Préparation de solutions de référence McFarland

Nous avons préparé une solution de chlorure de baryum (BaCl_2) (fisher Scientific, Nepean, Ontario) à 1,175 % dans une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) 0,1 %. Nous avons effectué les préparations suivantes dans des tubes de verre selon le tableau 4 . Les tubes McFarland sont utilisés à titre de références puisque chacun d'eux possède une densité optique propre correspondant à une concentration définie de bactéries. L'utilisation d'un McFarland de 0,5 était représentatif d'une concentration de $1,5 \times 10^8$ bactéries ou ufc (unité formant des colonies) par ml.

3.2.5 Dosage des antibiotiques par méthode microbiologique

3.2.5.1 Souche indicatrice: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619

Afin de doser la quantité d'antibiotique contenue dans les liposomes, un dosage microbiologique a été effectué. Une courbe standard a été préparée dans du PBS 1X, pH 7,2. Les

Tableau 4: Description de la composition des tubes McFerland

VOLUME DE BaCl₂	VOLUME DE H₂SO₄	DO à 550 nm
(en ml)	(en ml)	
0.20	9.80	0.320
0.30	9.70	0.480
0.40	9.60	0.620
0.50	9.50	0.730
0.60	9.40	0.850

Tous les tubes ont été scellés avec un parafilm. Ils étaient stables pour plusieurs mois à l'obscurité.

standards de tobramycine ont été préparés avec les concentrations suivantes: 80 µg/ml jusqu'à 0,63 µg/ml. Les dilutions d'antibiotique ont été effectuées à l'avance de façon à ce que l'antibiotique soit conservé dans les mêmes conditions que les liposomes. 0,8 nmol (100 µl) de liposomes réhydratés, filtrés (filtres de polycarbonate) et lavés 3 X dans du PBS, 4 °C (5000 x g) ont été utilisés. Ces échantillons de liposomes, de même que notre courbe standard ont été incubés à 37 °C en présence de 100 µl de Triton X-100, 0,25 % (Mallinckrodt via Canlab, Montréal, Québec) durant une heure.

Pendant ce temps, un ruban adhésif d'un centimètre de large était placé autour d'une plaque de verre de 30,5 cm x 20,5 cm préalablement nettoyée à l'aide de Contrad (Canlab, Montréal, Québec) et d'alcool 70 %.

Un échantillon de 10 ml d'une culture de 17 hrs de *P. aeruginosa* ATCC 25619 (Américain Type culture collection, Rockville, Md) développée dans un bouillon de *proteose peptone* #2 (Gibco-BRL, Montréal, Québec) était récolté et centrifugé à 5000 xg, 20 min. Le culot était resuspendu dans un volume de 10 ml de PBS; un volume de 3,5 ml de cette solution bactérienne était ajouté à 9,5 ml de PBS de façon à égaler la transparence d'un McFerland 0,5 pour inoculer la gélose de l'antibiogramme.

Au total, un volume de 12,5 ml de culture bactérienne, équivalent à un McFerland 0,5 a été ajouté à 300 ml de gélose *Antibiotic Medium* #5 (Gibco-BRL, Montréal, Québec). Avant utilisation, la gélose a été autoclavée et maintenue à 56 °C dans un bain-marie. Après gélification, des puits ont

été percés à l'aide d'un poinçon de 5 mm de diamètre et les débris de gel ont été retirés à l'aide d'une trompe à vide. Les échantillons et les standards ont été placés dans les puits en duplicata à raison de 25 µl / puit. La plaque de verre a été par la suite incubée 17 Hrs à 37 °C, en présence de 5% de CO₂.

Après cette période d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition autour de chacun des puits ont été mesurés et le calcul de la régression linéaire a été effectué en utilisant le logarithme de la concentration des standards utilisés en X et de leur diamètre en Y. La concentration d'antibiotique de notre échantillon de liposomes a alors été déterminée à l'aide de l'équation de la droite.

3.2.6 Méthode de dosage HPLC

La méthode qui a été utilisée est basée sur la dérivation de la tobramycine (4,5,6) avec le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène. Tous nos échantillons (standarts et inconnus) ont été traités de la même manière afin de minimiser les marges d'erreurs. Une courbe standard s'échelonnant de 500 µg/ml à 1,95 µg/ml a été utilisée. Une aliquote de 100 µl de chacun des échantillons a été placée dans 1 ml de MeOH et a été incubée à 65 °C pour une période de 30 minutes. A ces échantillons, 0,9 ml de PBS a été ajouté. Chaque échantillon a été agité très vigoureusement au vortex, et par la suite, a été centrifugé dans des tubes de type Eppendorf, 5000 x g, 20 minutes, 4 °C. Cette première étape avait pour but d'extraire l'antibiotique. Des volumes de 500 µl de surnageant de chacun de nos échantillons ont été placés dans une bouteille échantillon contenant 2,0 ml de MeOH, 200 µl de tampon borate

(0,1 M, pH 9,3) et 270 µl de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene préparé dans du MeOH (180 gr/litre). Il était très important de pré-mélanger tous les constituants de la réaction afin de minimiser les variations entre les différentes bouteilles échantillons. Les ampoules ont par la suite été scellées et incubées dans un bain-marie à 82 °C pendant 30 min. Suite à cette incubation, les ampoules ont été retirées du bain-marie et placées dans de l'eau afin de ramener leur température à 25 °C.

Un volume de 10 µl de chacun de ces échantillons a été analysé par HPLC, à partir d'une boucle d'injection de 40 µl. La période d'analyse de chaque injection était d'une durée de 15 min. et le temps de rétention de la tobramycine de 7 min. Un temps de lavage d'une durée égale au temps de rétention de la substance à analyser était respecté.

Une partie de nos analyses a été effectuée sur un appareil HPLC composé d'une pompe HPLC (modèle 590, Milipore, Waters Chromatography Division, USA), d'un module de contrôle de température (modèle TCM, Milipore), d'un détecteur UV à longueur d'onde variable (modèle 490, Milipore), et d'un auto-injecteur type WISP avec boucle d'injection variable (modèle 710b, Milipore), propriété de L'Institut de Recherches en Biotechnologie. Les données et spectres de lecture ont été captés et analysés par un " Millenium 2010 chromatography system manager " (Milipore).

Le système HPLC, qui a été utilisé, propriété du département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal, comportait une pompe et un système de contrôle (Varian model 5000),

une boucle d'injection (Reodyne 7125), un détecteur à spectre UV (Varian 2550) et un enregistreur graphique (Spectra-Physics SP 4290).

La séparation de notre échantillon a été réalisée sur une colonne *Zorbax SB-C18* (Waters Chromatography) d'une dimension de 250 mm x 4,6 mm (diamètre interne). La taille des particules constituant la phase stationnaire était de 4 μm . Notre phase mobile était constituée d'un mélange d'acétonitrile - MeOH - tampon phosphate de potassium (65:10:25, vol/vol, pH 7.2) et présentait un débit de travail de 1,3 ml par minute. Les échantillons étaient lus à une longueur d'onde de 350 nm et avec une amplitude d'absorbance de 0,005 unités. Toutes nos analyses ont été effectuées à une température constante de 25 °C.

3.2.7 Calorimétrie à balayage différentiel (DSC)

La Calorimétrie à balayage différentiel (DSC) (Hart Scientific, Pleasant Grove, Utah) est une méthode d'analyse conçue pour capter les changements de structures imposés par des modifications calorimétriques. Cet appareil peut lire à l'intérieur d'une gamme de températures se situant entre 0 °C et 200 °C. Cependant les lectures aux deux extrémités sont beaucoup moins fiables puisqu'il s'agit des limites de détection de l'appareil. Nos spectres d'enregistrement ont été réalisés entre 22,5 °C et 92,5 °C, car les températures situées à l'extérieur de ces limites ne nous intéressaient pas puisqu'elles n'étaient pas pertinentes à une utilisation *in vivo*.

Pour réaliser cette étude, les liposomes ont été hydratés comme décrit précédemment et ont été conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Les échantillons de liposomes à analyser ont été préparés à une concentration d'un mg de phospholipides par ml. Un échantillon de PBS (placé en position #1) a servi à l'établissement et à la détermination de la ligne de base. Le balayage différentiel de 3 échantillons durait de 4 à 6 hrs. Il a été pratiqué sur des liposomes contenant de la tobramycine. La tobramycine était également analysée individuellement à titre de témoin puisque cette dernière était incorporée dans nos liposomes et que sa présence pouvait modifier la température globale de transition de phase de chacune de nos formulations. De plus chaque phospholipide utilisé dans la fabrication des différentes formulations liposomales a été analysé séparément.

3.2.8 Cinétique *in vitro*

Afin de réaliser les tests *in vitro*, 1 lot (environ 65 mg de PL) de chacune des formulations liposomales a été rehydraté. Ces chémoliposomes rehydratés avec des solutions de 40 mg/ml de tobramycine ont été filtrés de façon à obtenir des vésicules d'un diamètre de 0,4 µm sur des filtres de polycarbonate dans un volume total de 1,5 ml.

Avant de débiter l'expérience, une aliquote de 200 µl a été prélevée à partir de chacune des formulations. Cette dernière a été placée dans un tube de type Eppendorf et a été centrifugée à 5000 g, 20 min.

Par la suite, un volume de 150 μl du surnageant a été prélevé et placé dans un autre tube Eppendorf, puis le culot a été décanté vigoureusement. Le culot a été resuspendu dans 200 μl de PBS. Ces échantillons ont représenté le temps zéro et ont été analysés par HPLC en même temps que tous les autres échantillons de cette expérience afin d'assurer une plus grande reproductibilité.

Chacune des solutions mères de liposomes a été placée dans un tube nalgène à fond rond (Canlab, Canada) de 50 ml, dans un bain-marie à une température de 37,5 °C avec une agitation constante de 80 rpm. Après des incubations de 1 hr, 8 hrs, 24 hrs, 32 hrs et 48 hrs, une aliquote de 200 μl de solution a été prélevée et traitée de la même façon que les échantillons au temps zéro.

La quantité de tobramycine qui a été détectée dans le culot représente l'antibiotique qui est demeuré encapsulé à l'intérieur des liposomes tandis que celle qui a été retrouvée dans le surnageant, représente la tobramycine libérée à partir des liposomes. Toutes ces expériences ont été effectuées indépendamment deux fois.

3.2.9 Cinétique *in vivo*

Préalablement à cette expérience, des liposomes ont été réhydratés, analysés par HPLC et leur concentration a été ajustée à 800 μg / 50 μl (chaque dose correspond à 50 μl).

Des souris BALB/c de deux mois ont été réparties en groupes de trois pour chacun des temps suivants: 0 hr (soit 5 min après le traitement), 1 hr, 8 hrs, 24 hrs, 32 hrs et 48 hrs. De plus deux autres groupes de souris ont été utilisés: un témoin négatif qui n'a reçu aucun traitement et un autre témoin

qui lui a reçu un dose de PBS. A chacun de ces temps, l'animal a été anesthésié, son sang et ses poumons ont été prélevés. Ces derniers ont été homogénéisés dans 40 % p/v de PBS froid. Par la suite, ces échantillons de même que le sérum ont été dosés par HPLC.

3.2.10 Modèle animal d'infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.10.1 Enrobage des bactéries dans des billes d'agar

De l'huile minérale (Sigma) était stérilisée au four Pasteur à 210°C, 48 hrs. L'huile minérale doit être redevenue translucide à la fin de la période de stérilisation. Un volume de 200 ml d'huile minérale stérile était porté à 56°C. Un ml de la suspension bactérienne préparée à partir d'une culture bactérienne de 17 hrs dans un bouillon de culture protéose peptone #2 (BBL Microbiology System, Cockeysville, Md), était ajouté à du PBS de façon à obtenir une D.O. de 0,1, à une longueur d'onde de 650 nm. Un ml de cette suspension bactérienne était ajouté à un volume de 9 ml de Trypticase Soy Agar (BBL Microbiology System, Cockeysville, Md) pré-réchauffé à 56°C. On ajoutait la suspension de 10 ml de bactéries-agar dans l'huile minérale qui avait été conservée à 56°C et on plaçait immédiatement l'huile dans un bain de glace en maintenant une agitation constante à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 min. La suspension était alors transférée dans des tubes nalgene de 250 ml et centrifugée à 5000 g pendant 20 min. L'huile était aspirée et trois lavages consécutifs dans 20 ml de PBS étaient effectués. Un volume de 500 µl de cette solution de billes était placé dans 50 ml de PBS. Cette solution était homogénéisée à l'aide d'un homogénéisateur de type Polytron, en 3

séances de 30 sec pour briser les billes d'agar et permettre le décompte bactérien. Les décomptes bactériens étaient réalisés en effectuant des dilutions sériées dans du PBS et ces dernières étaient placées en triplicata sur des géloses protéose peptone #2 (BBL Microbiology System, Cockeysville, Md). Le nombre d'unités formant des colonies (UFC) était compté sur les géloses où on dénombrait un nombre de colonies se situant entre 30 et 300 dans le but d'obtenir des valeurs statistiquement valables (Gerhardt, 1981).

3.2.10.2 Infection

Pour effectuer l'infection, l'animal anesthésié était placé sur le dos, la tête maintenue en place par une bande élastique accrochée à ses incisives (Blouin *et al.*, 1987). A l'aide d'un laryngoscope et d'une lame pédiatrique modifiée (Wisconsin pediatric blade no. 0) pour s'adapter à l'ouverture orale du rat, un cathétère de type "gelco" de calibre 18, était introduit directement dans la trachée à environ 20 mm de profondeur, en passant entre les deux cordes vocales. La formation de condensation sur un miroir froid lors de l'expiration confirmait l'intubation dans les voies respiratoires. Egalement, le déplacement d'une petite quantité de liquide à l'intérieur du cathéter, placé au préalable dans un bécher de PBS stérile, pouvait confirmer l'intubation dans les voies respiratoires. Une seringue Hamilton de 250 µl était utilisée pour introduire 100 µl (5×10^5 UFC) d'une suspension de PA 508 incorporée dans des billes d'agar. Très rapidement après avoir introduit le 100 µl de bactéries, on injectait à l'aide d'une seringue de 5 ml, un bon volume d'air afin de disperser le plus rapidement possible les billes dans les poumons, afin de diminuer au maximum le risque d'asphyxie. Après avoir reçu ce traitement,

l'animal demeurait dans une position longitudinale avec la tête surélevée d'au moins 30 ° afin de minimiser le plus possible le risque de retour externe. L'animal restait ainsi jusqu'à son réveil. Soixante douze heures après l'infection, un contrôle était effectué sur un nombre restreint d'animaux pour vérifier si l'infection était bien implantée.

3.2.10.3 Traitements

Les antibiothérapies à l'aide de chémoliposomes ou d'antibiotique libre ont été administrées directement au niveau pulmonaire tel que décrit dans le paragraphe précédent (paragraphe 3.2.10.2)

3.2.10.4 Préparation et analyse des suspensions de tissus

Tous les tissus ont été prélevés stérilement sous une hotte à flux laminaire, homogénéisés dans 40 % p/v de tampon PBS et maintenus à 4 °C. Des aliquotes de 100 et de 500 µl ont été analysés par méthode de dosage HPLC afin de connaître leur teneur en tobramycine.

De ces mêmes homogénats de tissus, une aliquote de 500 µl a été prélevée et placée dans des dilutions en séries afin de pouvoir déterminer la quantité de bactéries présente dans chacun des échantillons.

RESULTATS

IV RESULTATS

4.1 Dosage microbiologique de la tobramycine sur une souche indicatrice de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619

Les premières quantifications d'antibiotique dans les liposomes ainsi que dans les tissus animaux ont été réalisées par l'utilisation d'une méthode de dosage microbiologique. La figure no 1 permet de constater qu'une variation de 8 mm sépare les zones d'inhibition d'une courbe standard pour des concentrations se situant à 0,78 µg/ml. Les échantillons analysés en duplicata étaient déposés dans des puits de 5 mm, ce qui ne laissait que 3 mm pour effectuer la lecture, dans le cas des concentrations de 0,78 µg/ml. Par contre pour les valeurs supérieures à 3 µg/ml, la lecture des concentrations était satisfaisante.

4.2 Analyse quantitative de la tobramycine par HPLC.

Lors de nos études antérieures, la quantification de la tobramycine présente dans les chémoliposomes avait été effectuée par HPLC alors que celle présente dans les tissus avait été effectuée par méthode microbiologique (annexe 1).

Au cours de ce travail, nous avons adapté la méthode HPLC au dosage de la tobramycine dans les échantillons de tissus animaux. Nous devons travailler avec des échantillons de tissus extrêmement

dilués donc les distorsions devaient être minimisées de façon maximale. C'est pourquoi, nous avons cherché à vérifier si la longueur d'onde de 340 nm utilisée jusqu'à maintenant (Bangham *et al.*, 1974; Barend *et al.*, 1980 et 1981; Nev, 1983) permettait une détection optimale de la tobramycine.

Les analyses par HPLC de deux concentrations de tobramycine se situant aux deux extrémités de lecture de l'appareil soit 15,56 µg/ml et 1000 µg/ml indiquent une sensibilité de lecture supérieure aux longueurs d'onde de 350 et 355 nm (figure 2 et 3).

De plus, lorsque l'on calcule le pourcentage d'écart, pour une même concentration, entre les différents échantillons analysés, on note un écart type proche de zéro pour les concentrations lues à une longueur d'onde de 350 nm (figure 4 et 5).

4.3 Reproductibilité des analyses HPLC sur deux appareils différents.

Les études cinétiques que nous avons effectuées pour analyser la libération des antibiotiques à partir des liposomes et la durée de persistance "in vivo" de nos chémoliposomes ont nécessité l'analyse de plusieurs centaines d'échantillons. Afin de rendre matériellement possible ce genre d'expérience, nous avons obtenu la collaboration du Dr J. Awari de l'Institut de Recherche en Biotechnologie, qui nous a donné accès à un HPLC possédant un autoinjecteur. La méthode mise au point sur le HPLC de notre Département se devait d'être standardisée et contrôlée afin de s'assurer de la reproductibilité de nos résultats, que les tests soient effectués sur l'un ou l'autre des 2 appareils. Les résultats identiques présentés à la figure 6 montrent l'étroite corrélation existant entre les résultats des dosages effectués sur les deux appareils HPLC.

Fig 1: Représentation graphique du diamètre moyen des zones d'inhibition d'une courbe standard en fonction de la concentration de la tobramycine présente. Cette représentation a été obtenue à partir des résultats d'un test microbiologique effectué sur des échantillons provenant de dilutions d'une courbe standard fabriquée à partir d'une solution commerciale de tobramycine (40 mg/ml)

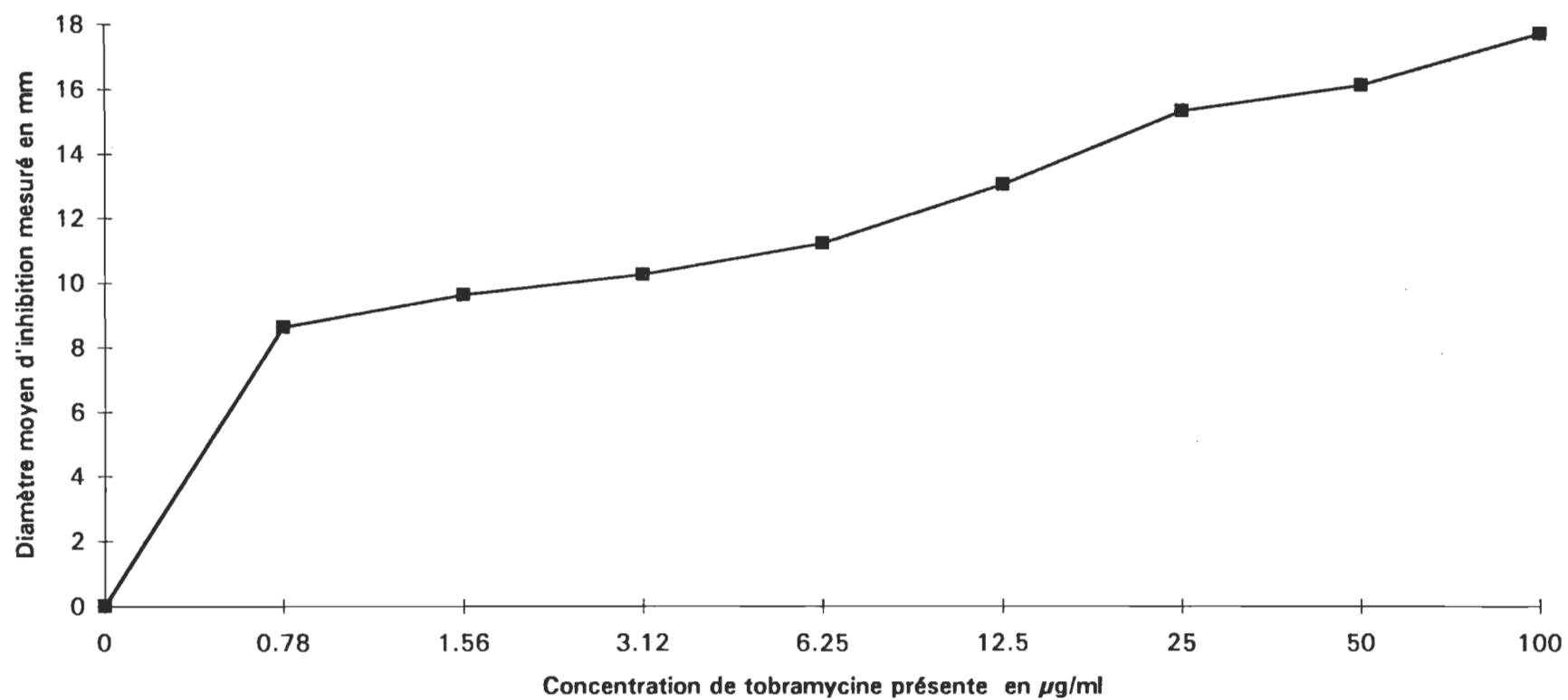


Fig 2: % d'écart entre les valeurs dosées en triplicata en fonction de la longueur d'onde pour une concentration de tobramycine de 15,56 µg/ml. Cette représentation a été obtenue suite au dosage par méthode HPLC et ce en faisant varier la longueur d'onde de lecture de détection (UV).

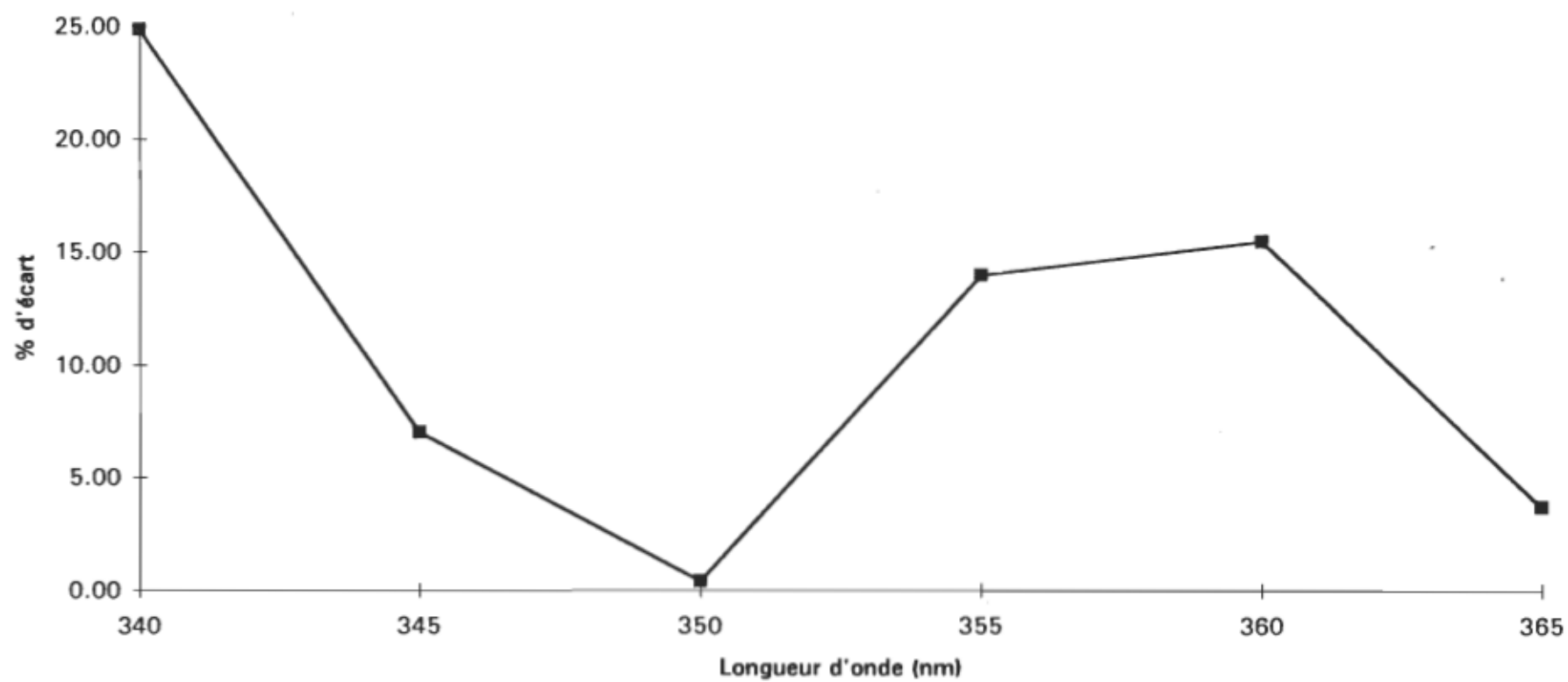


Fig 3: % d'écart entre les valeurs dosées en triplicata en fonction de la longueur d'onde pour une concentration de tobramycine de 1000 µg/ml. Cette représentation a été obtenue suite au dosage par méthode HPLC et ce en faisant varier la longueur d'onde de lecture de détection (UV).

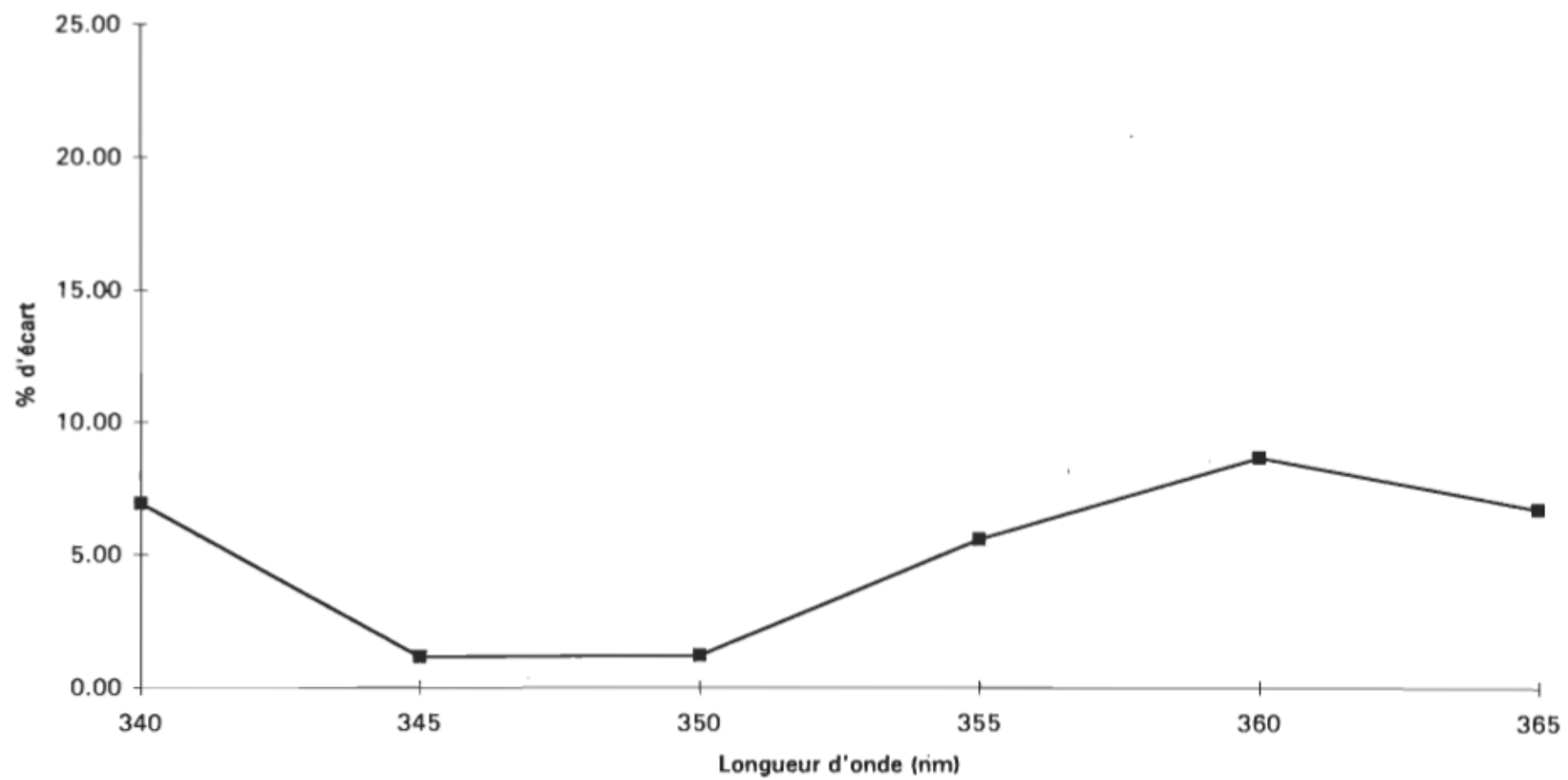


Fig 4: Surface intégrée par HPLC en fonction de la variation de la longueur d'onde pour une concentration de tobramycine de 15,56 $\mu\text{g/ml}$. Cette représentation a été obtenue suite au dosage en triplicata par méthode HPLC d'une solution de tobramycine à une concentration de 15,56 $\mu\text{g/ml}$ (à partir d'une solution commerciale de 40 mg/ml) et ce en faisant varier la longueur d'onde de lecture du détecteur UV entre 340 et 365 nm, dans le but d'assurer la reproductibilité de notre méthode de dosage.

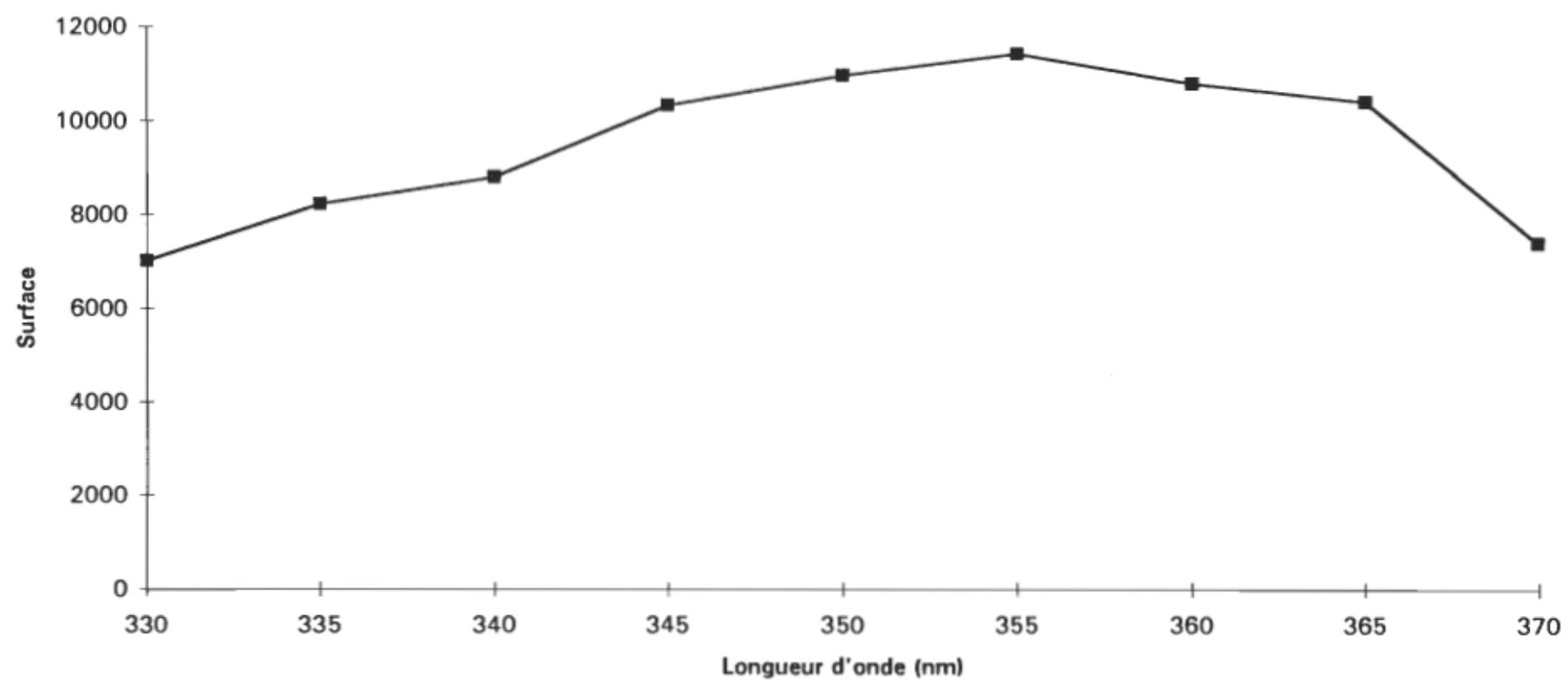
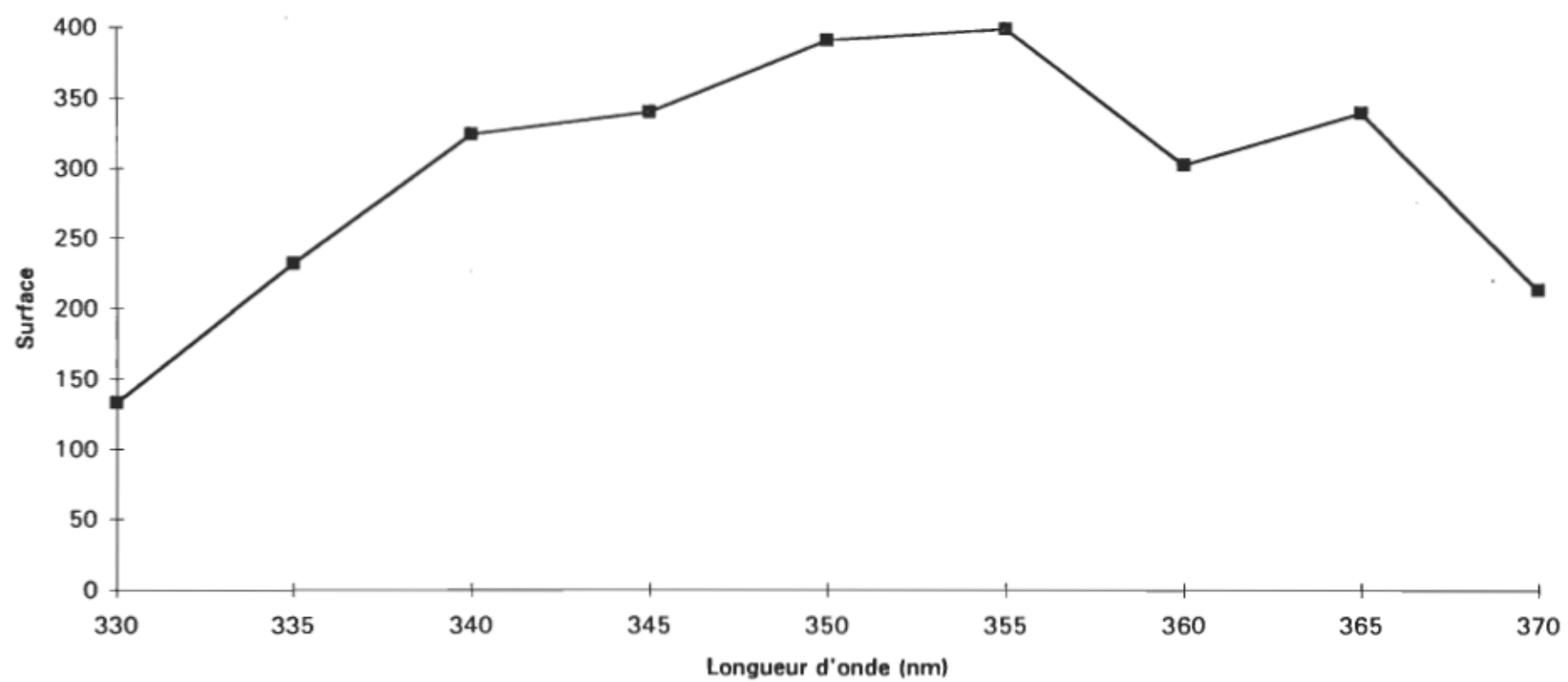


Fig 5: Surface intégrée par HPLC en fonction de la variation de la longueur d'onde pour une concentration de tobramycine de 1000 µg/ml. Cette représentation a été obtenue suite au dosage en triplicata par méthode HPLC d'une solution de tobramycine à une concentration de 1000 µg/ml (à partir d'une solution commerciale de 40 mg/ml) et ce en faisant varier la longueur d'onde de lecture du détecteur UV entre 340 et 365 nm, dans le but d'assurer la reproductibilité de notre méthode de dosage.



4.4 Analyse des paramètres affectant la quantité d'antibiotique encapsulée.

Antérieurement, notre méthodologie d'encapsulation consistait à incorporer de l'antibiotique juste avant la lyophilisation ainsi qu'au moment de la réhydratation. Lors de cette étude, nous avons vérifié les paramètres suivants: 1) l'effet de l'addition de concentrations variables de tobramycine uniquement au moment de la réhydratation. 2) l'effet de l'addition de concentrations variables de tobramycine avant la lyophilisation ainsi qu'au moment de la réhydratation et cela selon les concentrations suivantes: 0, 10, 40, 200, et 400 mg/ml.

Nos résultats indiquent que la quantité d'antibiotique encapsulée est maximale lorsque la tobramycine est ajoutée uniquement lors de la réhydratation aux concentrations de 10 à 200 mg/ml. (figure 7). Les taux d'encapsulation obtenus dans ces conditions sont augmentés de près de 100 %.

4.5 Influence du gradient de porosité des filtres sur la perte d'antibiotique encapsulé

La littérature dans le domaine de la filtration des liposomes rapporte que plus on effectue de filtrations plus le taux d'encapsulation de l'antibiotique à incorporer est grand. Comme nos chémoliposomes doivent être administrés ultérieurement par aérosols, il est nécessaire de maximiser la quantité d'antibiotique encapsulée et de standardiser le diamètre des liposomes à une valeur correspondant à un diamètre d'environ 0,4 μm .

Nos études montrent que le fait d'effectuer 5 passages successifs sur un filtre de 0,4 μm peut provoquer des pertes de matériel d'environ 75 % de l'échantillon de départ selon la formulation liposomale utilisée (figure 8).

Notre étude montre également que pour un nombre de 6 passages (soit 2 passages par filtre) sur des filtres dont le gradient de porosité s'échelonnait de 1 μm à 0,4 μm , la perte encourue était de 57,14 % (figure 9). Cette perte était moins élevée de 17,86 % comparativement aux pertes encourues lors de l'expérience illustrée à la figure 8 où 5 passages sur un filtre de 0,4 μm avaient entraîné des pertes de 75,0 %.

Finalement notre étude indique que l'utilisation d'un gradient de porosité de filtres (1,0 μm , 0,6 μm , 0,4 μm) sur lesquels un seul passage par filtre était effectué, pour un nombre total de 3 filtrations, donnait un rendement d'environ 3500 $\mu\text{g/ml}$ (figure 10). Ce rendement baissait à 2000 $\mu\text{g/ml}$ lorsque 6 passages (2 passages par filtre) étaient effectués sur le même gradient de filtres (1,0 μm , 0,6 μm , 0,4 μm) (figure 9). Le rendement diminuait ensuite à 1600 $\mu\text{g/ml}$ lorsque 5 passages consécutifs étaient effectués sur des filtres de porosité uniquement de 0,4 μm (figure 8).

Fig 6: Comparaison entre le dosage effectué à Université de Mtl et celui effectué à l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB) pour les mêmes inconnus analysés par HPLC. Les dosage ont été effectués en triplicata par méthode HPLC sur deux appareils différents. Six inconnus représentant respectivement des concentrations en tobramycine de 1,33 (inc 1); 2,0 (inc 2); 2,86 (inc 3); 4,0 (inc 4); 20,0 (inc 5) et 100,0 (inc 6) µg/ml ont été utilisés. Les lectures ont été effectuées à 350 nm.

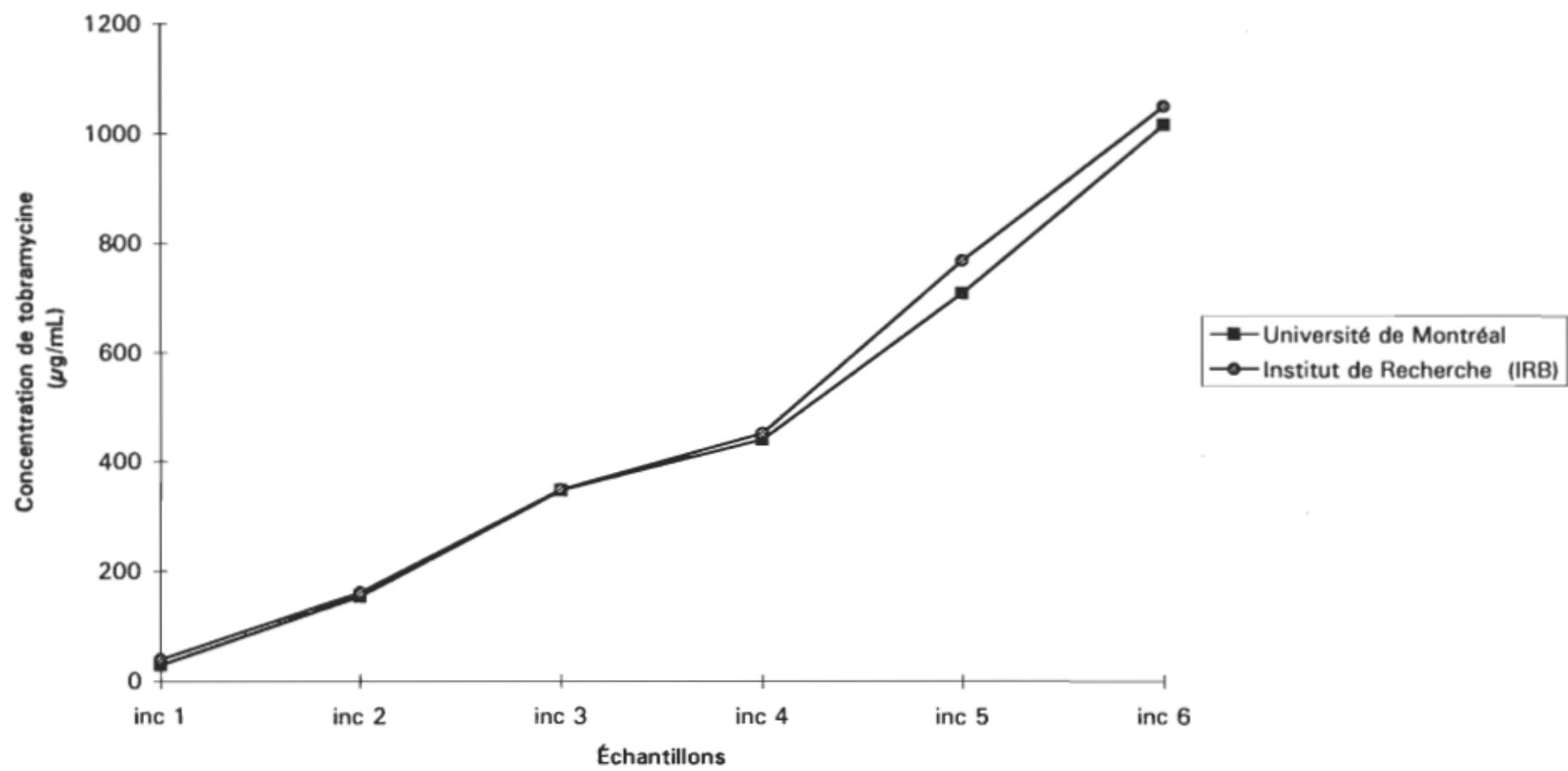


Fig 7: Concentration de tobramycine encapsulée suite à l'utilisation de quantités variables d'antibiotique lors de la fabrication et de la réhydratation des liposomes. Le dosage a été effectué en triplicata par méthode HPLC . Les liposomes (lipo) ont été fabriqués avec des concentrations variables de tobramycine (0; 10; 40; 200 et 400 mg/ml) et réhydratés avec les mêmes concentrations. Les lectures ont été effectuées à 350 nm.

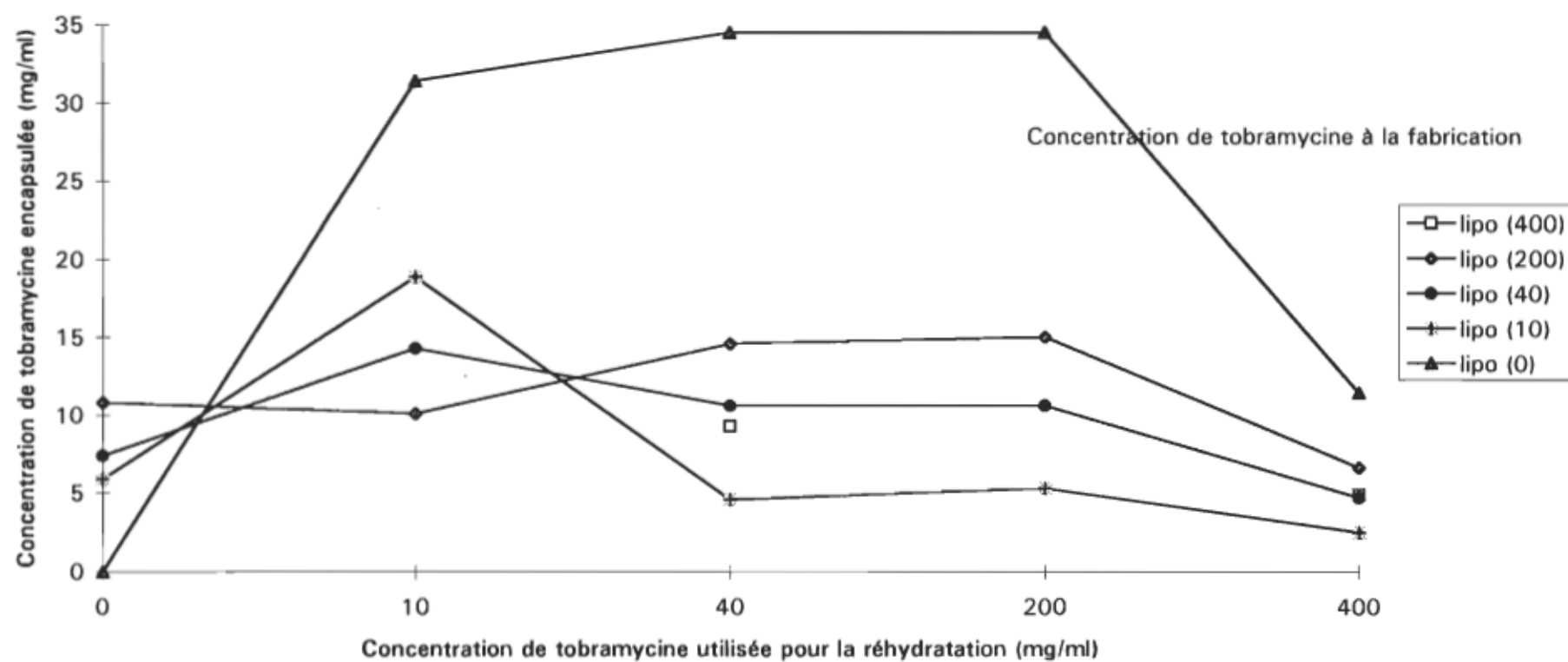


Fig 8: Courbe du pourcentage de pertes en fonction du nombre de filtrations sous filtre pressurisé. Les analyses ont été effectuées en triplicata par méthode HPLC à partir de solutions liposomales soumises à un nombre variable de filtrations sur filtres de 0,4 μm . Ces expériences ont été effectuées avec deux type différents de liposomes: DPPC/DMPC (dipalmitoyl phosphatidylcholine/dimyristoyl phosphatidylcholine)(10:1) (recette no 5) et DSPC/DPPC (distearoyl phosphatidylcholine/ dipalmitoyl phosphatidylcholine) (10:1) (recette no 9). Les lectures ont été effectuées à 350 nm.

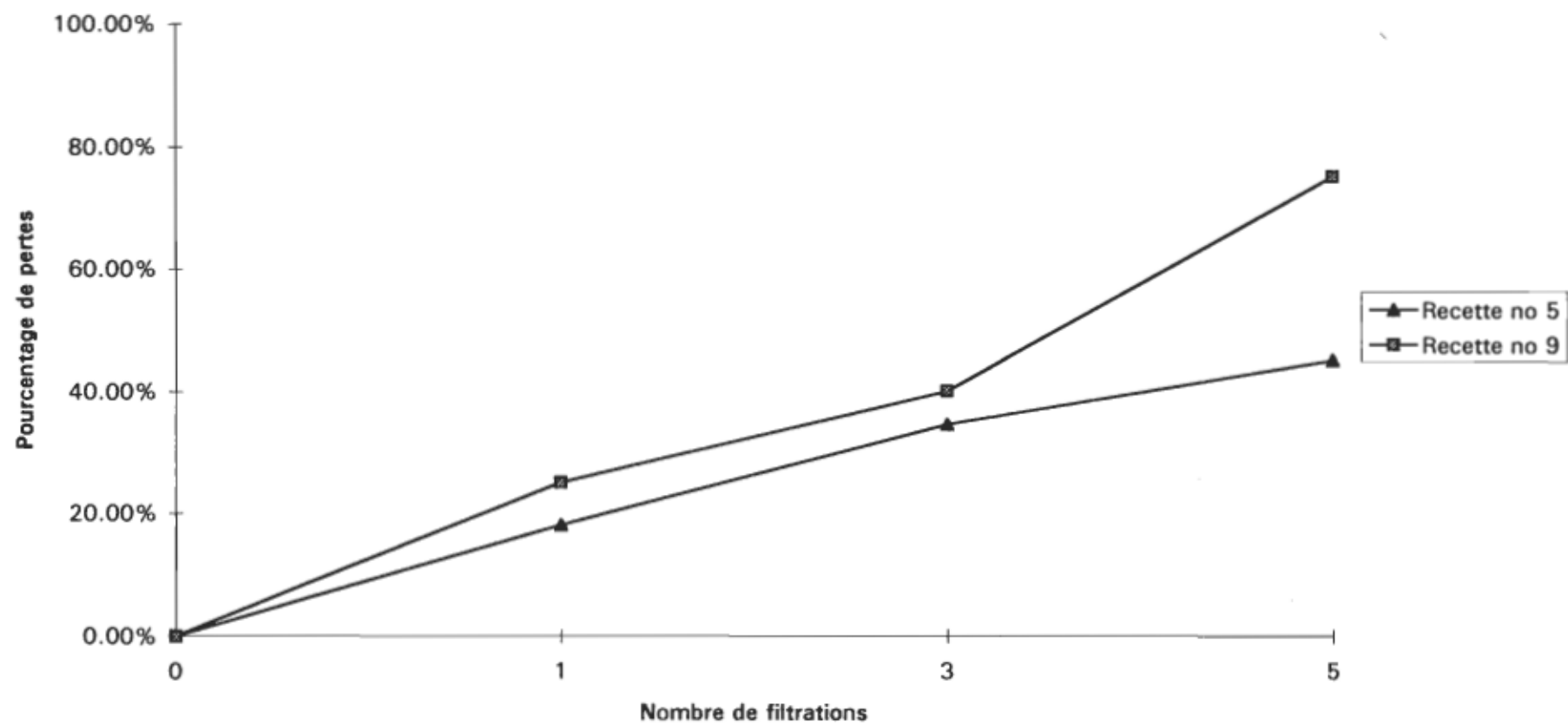


Fig 9: Courbe du pourcentage de pertes en fonction du gradient de porosité des filtres. Les analyses ont été effectuées en triplicata par méthode HPLC à partir de solutions liposomales soumises à 1, 2, 3 ou 4 passages sur des membranes de filtration dont les pores avaient un diamètre de 1; 0,6; 0,4; et 0,2 μm . Ces expériences ont été effectuées avec deux type différents de liposomes: DPPC/DMPC (dipalmitoyl phosphatidylcholine/dimyristoyl phosphatidylcholine)(10:1) (recette no 5) et DSPC/DPPC (disteroyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylcholine) (10:1) (recette no 9). Les lectures ont été effectuées à 350 nm.

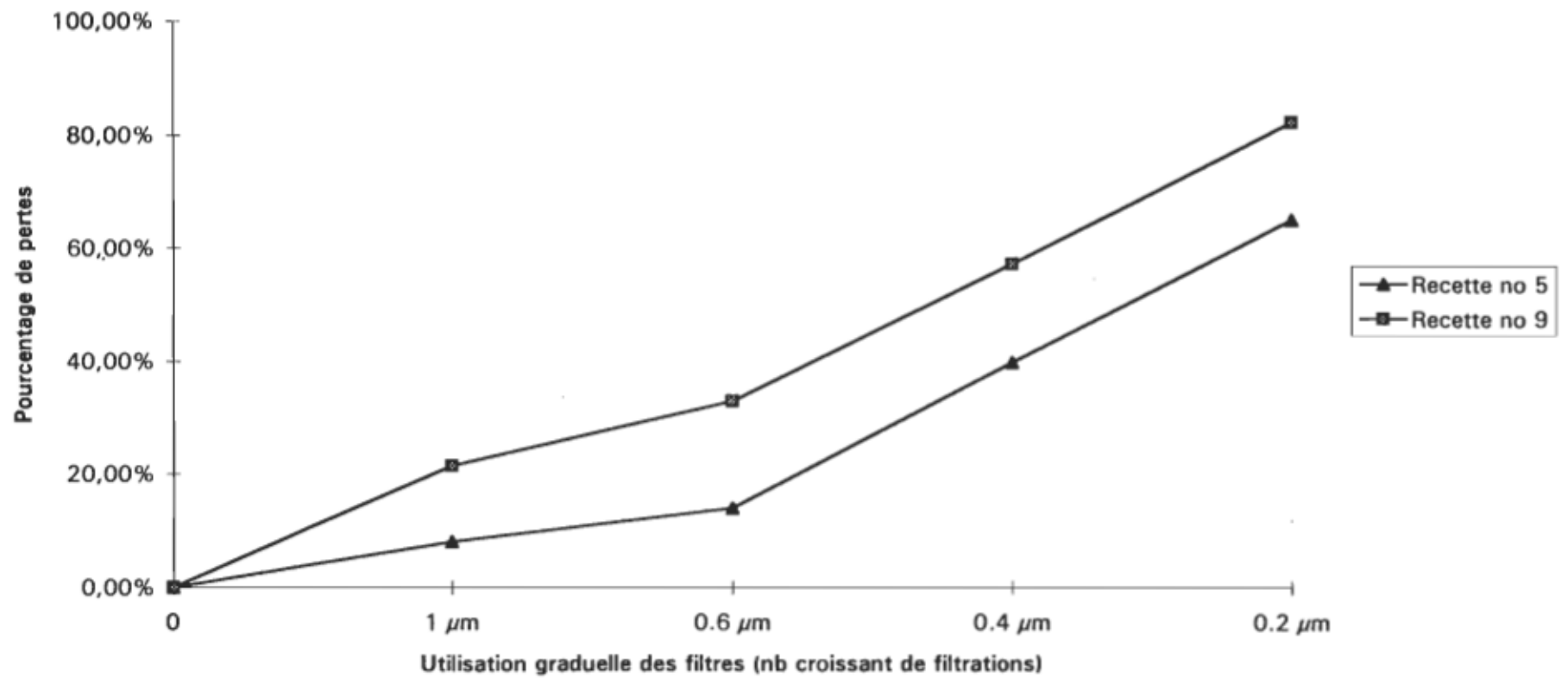
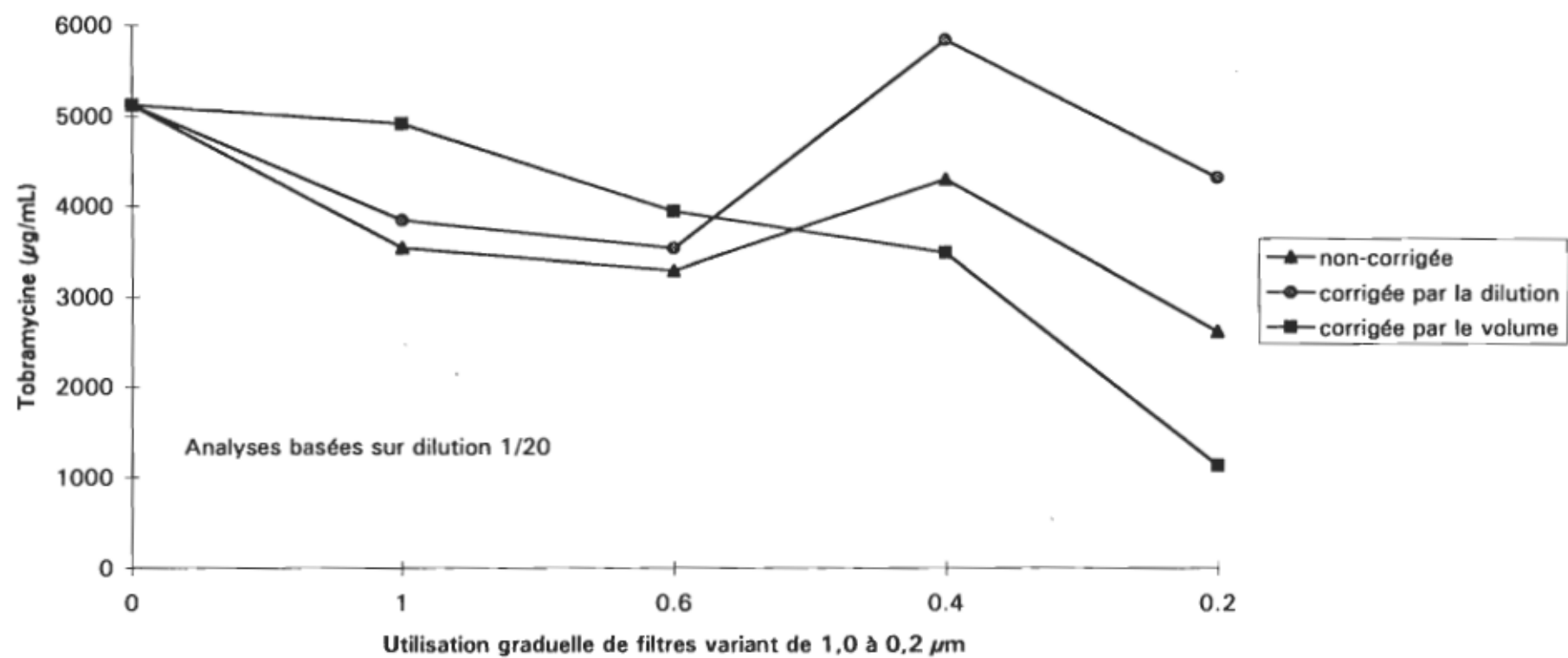


Fig 10: Courbe de la tobramycine détectée en fonction du gradient de porosité des filtres pour la formulation liposomale DPPC/DMPC (10:1). Les analyses ont été effectuées en triplicata par méthode HPLC . Les solutions liposomales étaient diluées 1/20 et ont été soumises successivement à une filtration sur filtres dont les pores mesuraient 1; 0,6; 0,4; et 0,2 μm . Ces expériences ont été effectuées avec la formulation liposomale: DPPC/DMPC (dipalmitoyl phosphatidylcholine/dimyristoyl phosphatidylcholine) (10:1) (recette no 5). Les lectures HPLC ont été effectuées à 350 nm. La courbe représentée par un triangle noir nous renseigne sur la quantité de tobramycine détectée directement dans l'échantillon analysé. Celle représentée par un cercle, nous présente les valeurs corrigées par le facteur de dilution (1/20) et la troisième (carré) permet de visualiser la quantité réelle de chacun des échantillons à la suite des différentes filtrations.



4,6 Détermination de la température de transition de phase (T_c) de différentes formulations liposomales après incorporation de l'antibiotique.

Nos travaux antérieurs semblaient suggérer que notre formulation liposomale initiale présentait une trop forte stabilité. Après avoir sélectionné 5 phospholipides présentant différentes caractéristiques aux points de vue T_c et charge électrique, de nombreuses constructions théoriques ont été élaborées. A partir de celles-ci, dix ont été analysées sur un calorimètre à balayage différentiel (DSC) qui nous a permis de déterminer la température de transition de phase de chacune de ces formulations. Lorsqu'une formulation liposomale atteint une température correspondant à sa T_c, il se produit une modification de la conformation membranaire des vésicules.

Des échantillons de tobramycine libre et de chacun des phospholipides entrant dans la formation de nos liposomes ont été analysés parallèlement à des échantillons de liposomes contenant du PBS ou de l'antibiotique. Le tableau 5 présente un résumé des résultats obtenus suite à l'interprétation des thermogrammes.

Chacun des constituants analysés séparément présentait un tracé caractéristique de sa propre transition de phase. Les résultats présentés dans le tableau 5 ont été obtenus à partir de liposomes incorporant la tobramycine et constitués de deux phospholipides différents comportant de la phosphatidylcholine à l'exception du DMPG. Ce lipide est caractérisé par la présence d'une phase distincte entre l'état de gel et l'état liquide-cristaux. Cette phase est appelée "rippled phase" ou phase d'ondulation (Gennis, 1989). La phase d'ondulation favorise la formation de domaines qui

représentent des zones de fragilisation susceptibles d'entraîner des pertes de la substance encapsulée. La largeur de ces zones ou pores dans des liposomes multilamellaires de DMPC, atteindrait jusqu'à 18 Å de diamètre (van Hoogevest *et al.*, 1984). Alors que la T_c correspond à la température qui marque le début de la transition, la température de transition intermédiaire (T_m) correspond à la phase où 50% de la transition est complétée. Le point intermédiaire de la transition thermique est souvent associé à la température de dissolution. Tel que nous pouvons le constater sur les figures 10 à 13, les thermogrammes sont constitués de deux pics. Le pic principal indique le comportement thermodynamique du constituant principal alors que le pic de moindre importance correspondrait à la T_c , soit au passage de la phase gel à la phase liquide liquide-cristaux ce qui entraîne un changement drastique de la conformation de la membrane phospholipidique. Il est important de noter que la présence de la tobramycine n'a causé qu'une modification négligeable du comportement des vésicules analysées.

Ces analyses ont été rendues possible grâce à la collaboration du Dr Claude Gicquaud de Département de Chimie-Biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

Tableau: 5 Analyses des formulations liposomales par calorimétrie à balayage différentiel

IDENTIFICATION	FORMULATION	RAPPORT MOLAIRE	T _c ^e
NO 3	DSPC ^a /DPPC ^b	16.77 / 1	46.0 °C
NO 2	DSPC/DMPC ^c	15.48 / 1	44.0 °C
NO 1	DSPC/DMPG ^d	15.73 / 1	46.0 °C
NO 8	DSPC/DMPC	10.00 / 1	42.0 °C
NO 6	DSPC/DMPG	10.00 / 1	40.0 °C
NO 9	DSPC/DPPC	10.00 / 1	45.0 °C
NO 4	DPPC/DMPG	16.94 / 1	33.0 °C
NO 5	DPPC/DMPC	10.00 / 1	29.5 °C
NO 10	DPPC/DMPC	16.67 / 1	35.0 °C
NO 7	DPPC/DMPG	10.00 / 1	29.5 °C

^a DSPC: Distearoyl phosphatidylcholine
^b DPPC: Dipalmitoyl phosphatidylcholine
^c DMPC: Dimyristoyl phosphatidylcholine
^d DMPG: Dimyristoyl phosphatidylglycerol
^e T_c: Température de transition de phase

Fig 11: Calorimétrie à balayage différentiel: représentation des températures de transition de phase des liposomes constitués majoritairement de DSPC à un rapport molaire de 10:1. Cette représentation graphique nous permet de visualiser le flux calorifique obtenu par la variation de la température des échantillons entre 22,5 ° et 92,5 °C. Toutes les solutions liposomales ont été préparées avec des quantités similaires de tobramycine et étaient constituées de concentrations équivalentes en phospholipides.

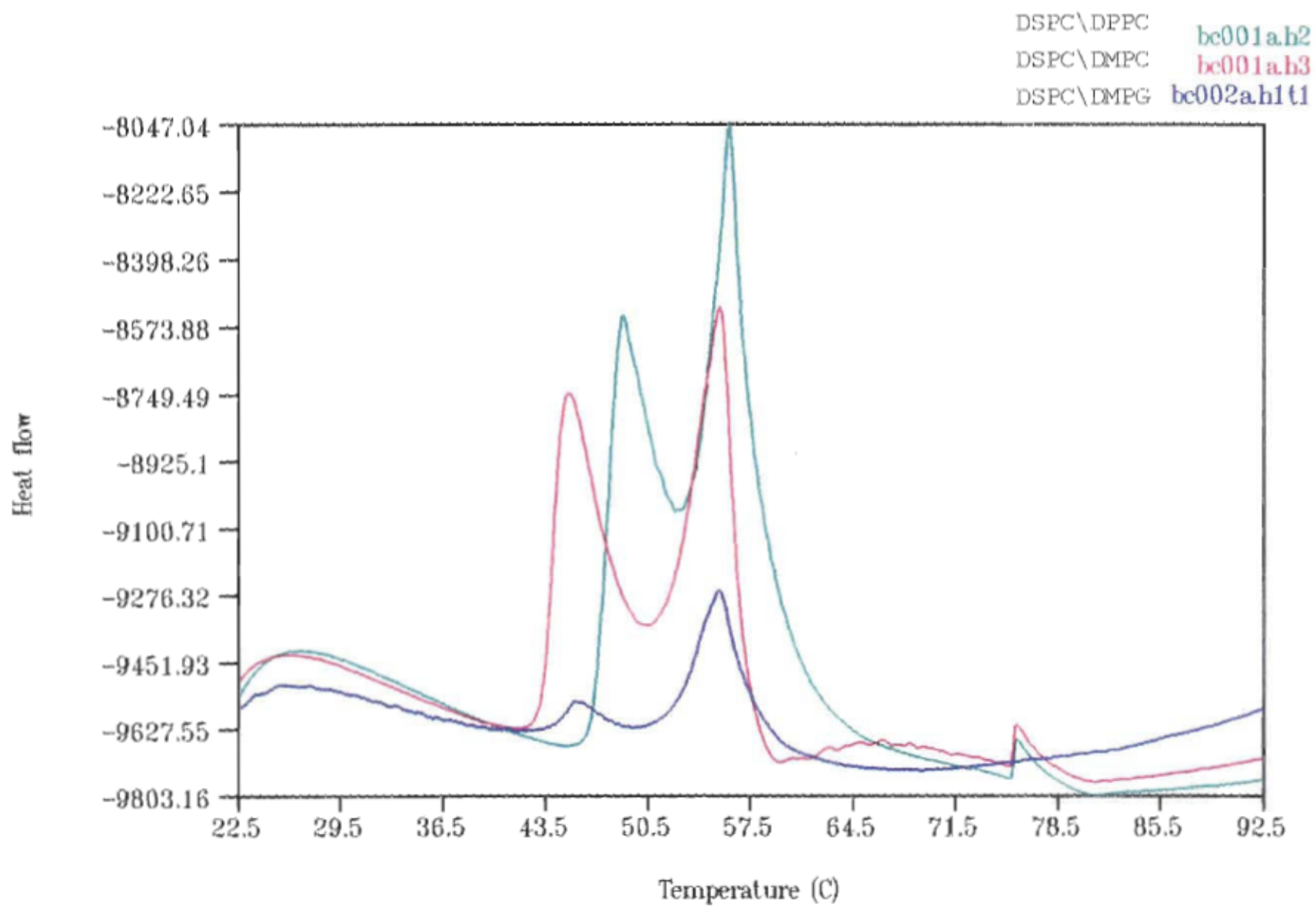


Fig 12: Calorimétrie à balayage différentiel: représentation des températures de transition de phase des liposomes constitués majoritairement de DSPC à un rapport molaire de 15:1. Cette représentation graphique nous permet de visualiser le flux calorifique obtenu par la variation de la température des échantillons entre 22,5 ° et 92,5 °C. Toutes les solutions liposomales ont été préparées avec des quantités similaires de tobramycine et étaient constituées de concentrations équivalentes en phospholipides.

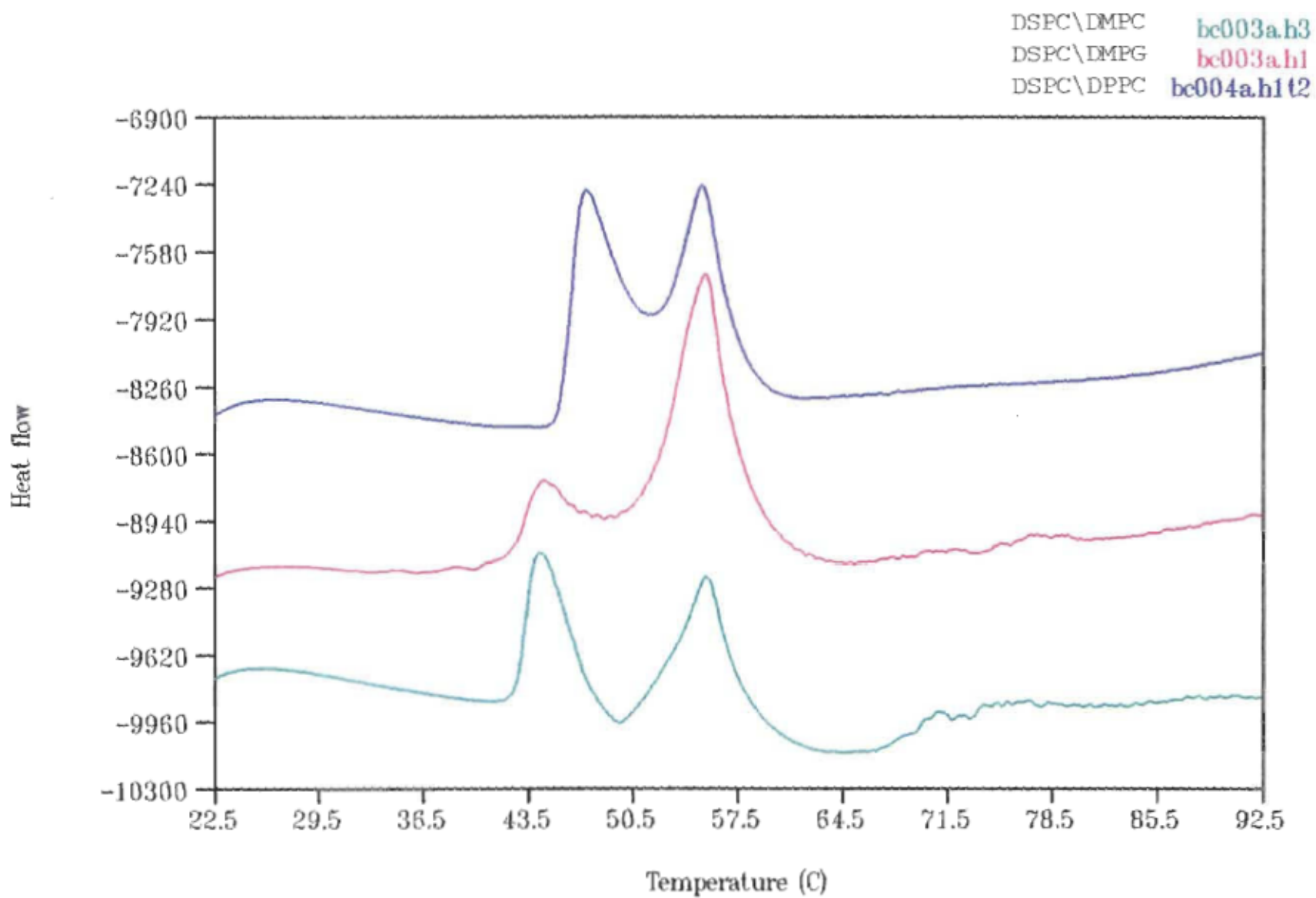
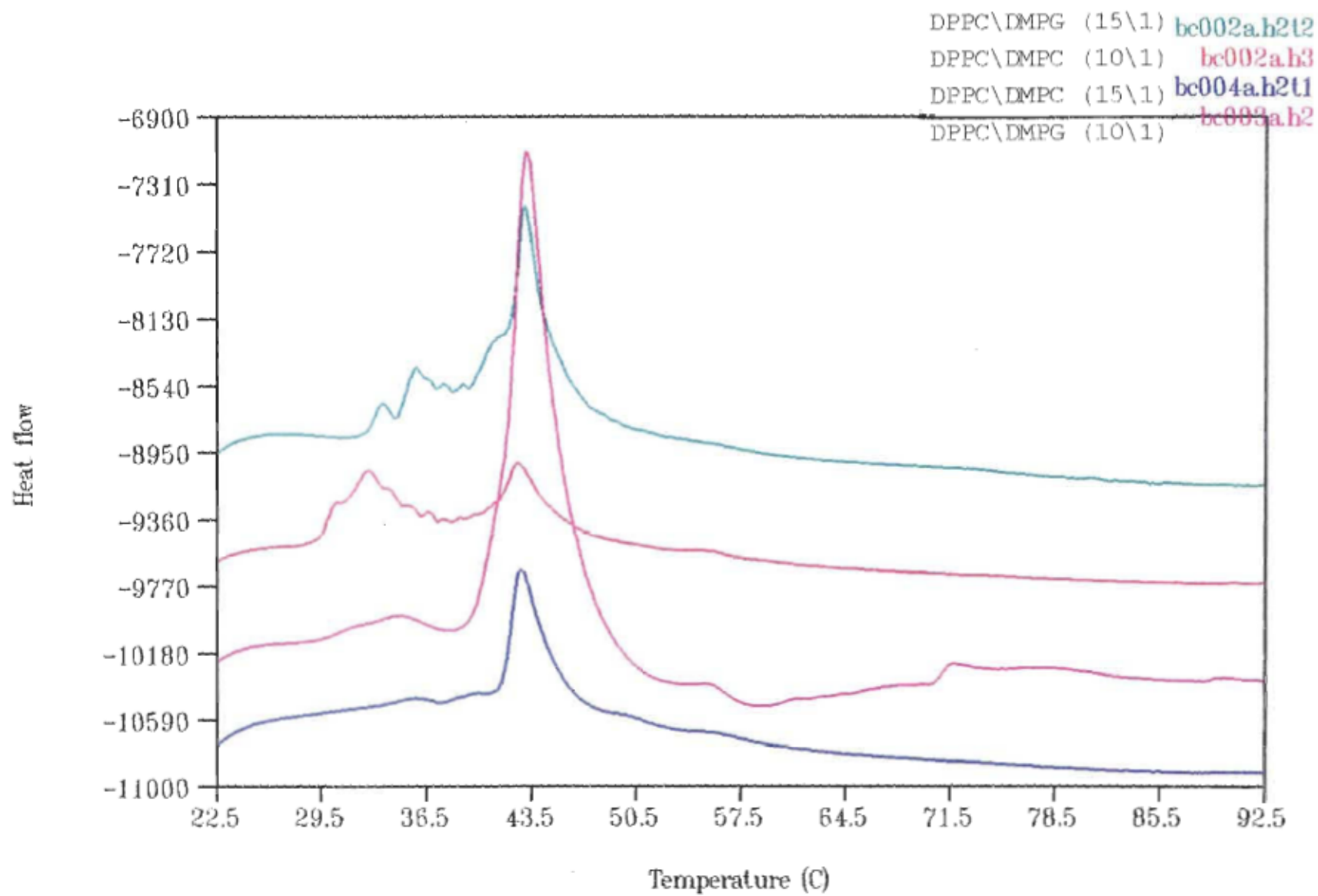


Fig 13: Calorimétrie à balayage différentiel: représentation des températures de transition de phase des liposomes constitués majoritairement de DPPC à des rapport molaires de 10:1 et 15:1. Cette représentation graphique nous permet de visualiser le flux calorifique obtenu par la variation de la température des échantillons entre 22,5° et 92,5 °C. Toutes les solutions liposomales ont été préparées avec des quantités similaires de tobramycine et étaient constituées de concentrations équivalentes en phospholipides.



4.7 Cinétique *in vitro* de libération de l'antibiotique à partir de différentes formulations liposomales.

Suite aux analyses effectuées à l'aide du calorimètre à balayage différentiel (tableau 5), deux catégories majeures de formulations liposomales ont pu être départagées en ce qui concerne leur Tc. Ces deux principaux groupes liposomaux comportaient soit du DSPC ou du DPPC, des phospholipides non chargés utilisés comme constituant principal. Les phospholipides secondaires étaient soit chargés négativement ou neutres. Les analyses de cinétique *in vitro* ont porté sur ces formulations à l'exception de celle constituée de DSPC/DMPG dans un ratio molaire de 10:1 testée antérieurement (Omri *et al.*, 1994). Les 5 formulations ayant le DSPC comme constituant principal ont démontré un fort taux de rétention de l'antibiotique encapsulé et par opposition, une libération très faible de la tobramycine dans le milieu (Fig 14: A, B et C). Plus précisément, au cours de ces études de cinétique, la tobramycine n'a pu être décelée dans le surnageant des formulations composées de DSPC/DMPC (ratio molaire de 10:1) et de DSPC/DPPC (ratio molaire de 15:1) (Fig 14: B et C). Avec les formulations DSPC/DMPC (ratio molaire de 15:1) et DSPC/DPPC (ratio molaire de 10:1), la détection de la tobramycine n'est devenue évidente que 36 hrs après le début de l'expérience (Fig14: B et C). En fait, seule la formulation composée de DSPC/DMPG (ratio molaire de 10:1) a démontré un certain niveau de libération de l'antibiotique ne représentant toutefois qu'un maximum de 14% du total de la tobramycine encapsulée dans ce type de vésicule (Fig14: A).

Fig 14A: Cinétique *in vitro* de libération de l'antibiotique à partir de la formulation DSPC / DMPG.

Cette représentation graphique permet de visualiser et de comparer la quantité de tobramycine libérée ($\mu\text{g/ml}$) dans le milieu environnant comparativement à la quantité d'antibiotique toujours encapsulée dans la formulation liposomale DSPC/DMPG (disteroyl phosphattdylcholine / dimyristoyl phosphatidyl-glycerol) (ratio molaire 10:1) en fonction du temps de prélèvement. Toutes les préparations liposomales contenaient des quantités similaires de phospholipides. Tous les dosages ont été effectués par méthode HPLC à une longueur d'onde de 350 nm.

FIG 14A: DSPC / DMPG

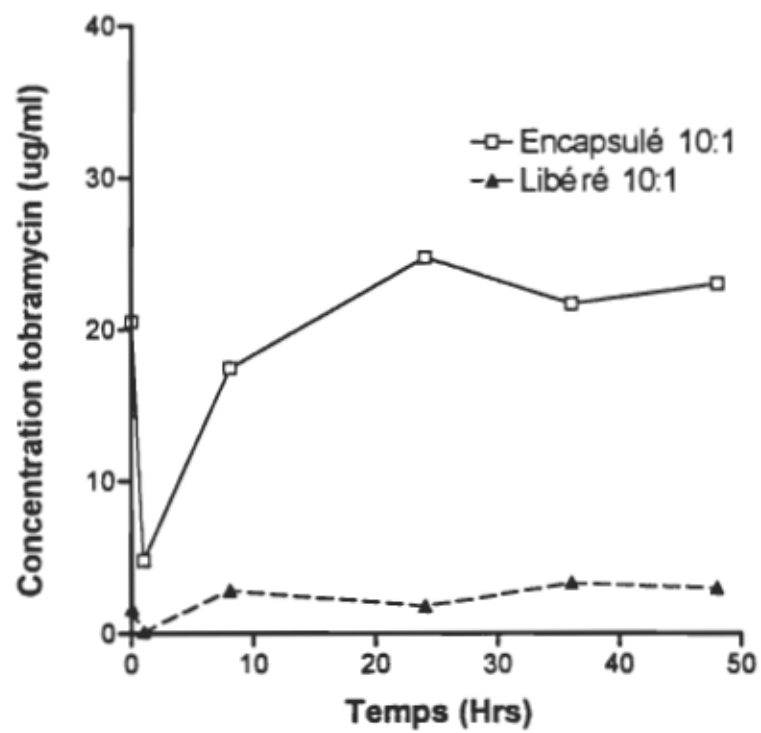


Fig 14 B: Cinétique *in vitro* de libération de l'antibiotique à partir de la formulation DSPC / DMPC.

Cette représentation graphique permet de visualiser et de comparer la quantité de tobramycine libérée ($\mu\text{g/ml}$) dans le milieu environnant comparativement à la quantité d'antibiotique toujours encapsulée dans la formulation liposomale DSPC/DMPC (disteoyl phosphatidylcholine / dimyristoyl phosphatidylcholine) (ratios molaires 10:1 et 15:1) en fonction du temps de prélèvement. Toutes les préparations liposomales contenaient des quantités similaires de phospholipides. Tous les dosages ont été effectués par méthode HPLC à une longueur d'onde de 350 nm.

FIG 14B: DSPC / DMPC

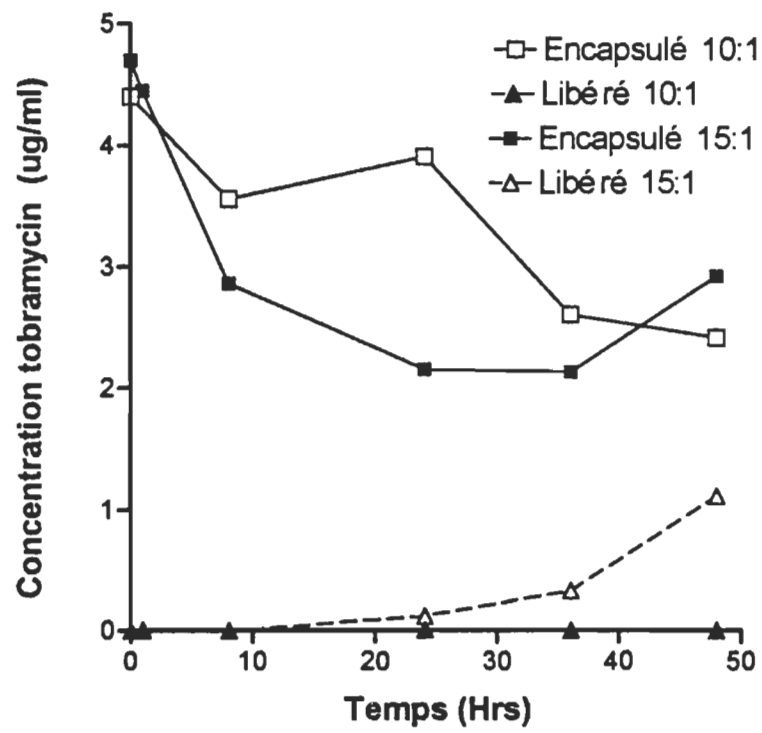


Fig 14 C: Cinétique *in vitro* de libération de l'antibiotique à partir de la formulation DSPC / DPPC.

Cette représentation graphique permet de visualiser et de comparer la quantité de tobramycine libérée ($\mu\text{g/ml}$) dans le milieu environnant comparativement à la quantité d'antibiotique toujours encapsulée dans la formulation liposomale DSPC/DPPC (distearyl phosphatidylcholine / dipalmitoyl phosphatidylcholine) (ratios molaires 10:1 et 15:1) en fonction du temps de prélèvement. Toutes les préparations liposomales contenaient des quantités similaires de phospholipides. Tous les dosages ont été effectués par méthode HPLC à une longueur d'onde de 350 nm.

FIG 14C: DSPC / DPPC

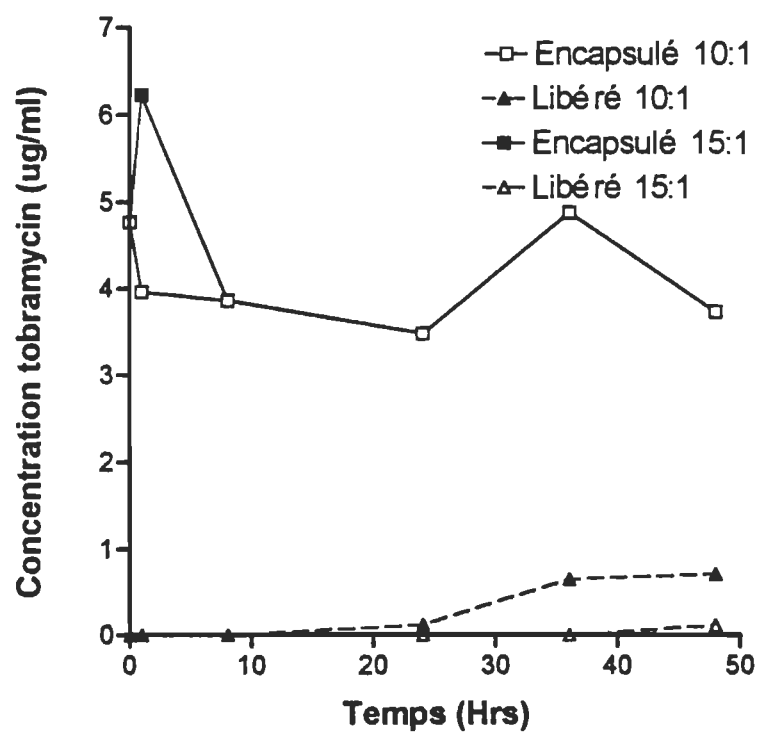


Fig 14 D: Cinétique *in vitro* de libération de l'antibiotique à partir de la formulation DPPC / DMPG.

Cette représentation graphique permet de visualiser et de comparer la quantité de tobramycine libérée ($\mu\text{g/ml}$) dans le milieu environnant comparativement à la quantité d'antibiotique toujours encapsulée dans la formulation liposomale DPPC/DMPG (dipalmytoyl phosphatidylcholine / dimyristoyl phosphatidyl-glycerol) (ratios molaires 10:1 et 15:1) en fonction du temps de prélèvement. Toutes les préparations liposomales contenaient des quantités similaires de phospholipides. Tous les dosages ont été effectués par méthode HPLC à une longueur d'onde de 350 nm.

FIG 14D: DPPC / DMPG

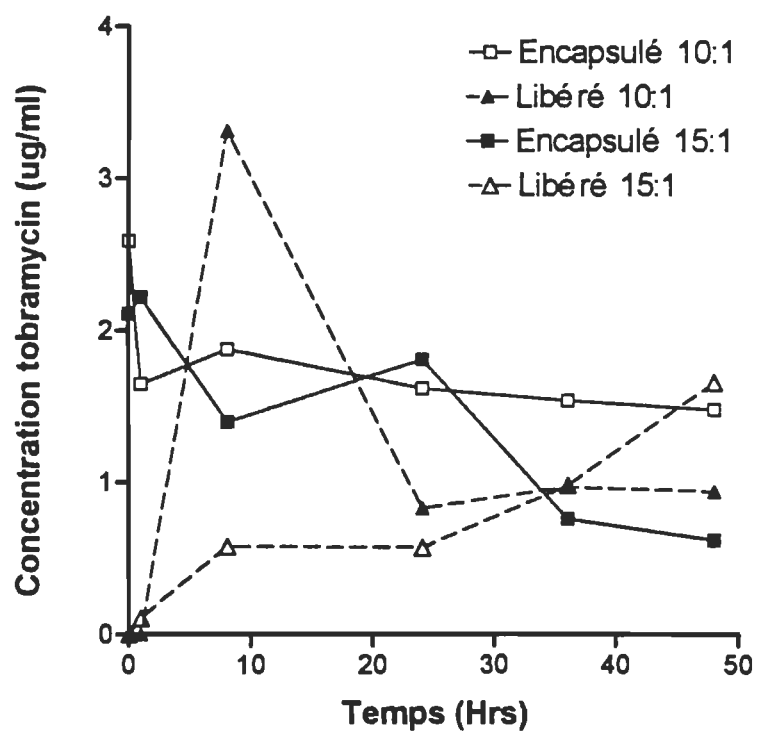
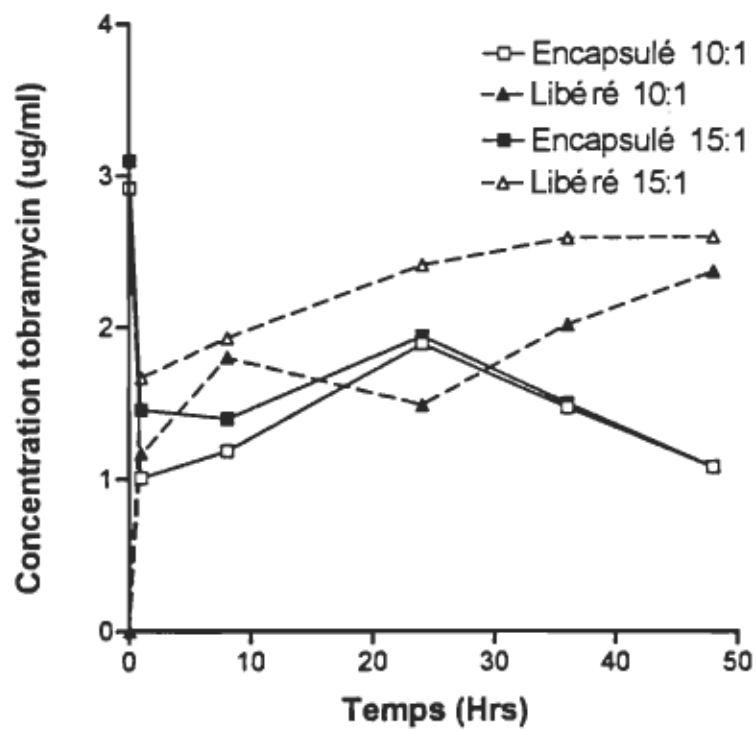


Fig 14 E: Cinétique *in vitro* de libération de l'antibiotique à partir de la formulation DPPC / DMPC.

Cette représentation graphique permet de visualiser et de comparer la quantité de tobramycine libérée ($\mu\text{g/ml}$) dans le milieu environnant comparativement à la quantité d'antibiotique toujours encapsulée dans la formulation liposomale DPPC/DMPC (dipalmytoyl phosphatidylcholine / dimyristoyl phosphatidylcholine) (ratios molaires 10:1 et 15:1) en fonction du temps de prélèvement. Toutes les préparations liposomales contenaient des quantités similaires de phospholipides. Tous les dosages ont été effectués par méthode HPLC à une longueur d'onde de 350 nm.

FIG 14E: DPPC / DMPC



D'autre part, les 4 formulations où le DPPC se retrouvait comme principal constituant des liposomes a permis de constater que la libération de la tobramycine était grandement favorisée. En effet, on observe une libération continue de la tobramycine en fonction du temps, et ce 1 hr après le début de l'étude de cinétique en ce qui concerne la formulation DPPC/DMPC (ratio molaire de 15:1 et de 10:1) (Fig 14: E). Dans le même ordre d'idée, une libération continue de l'antibiotique a été démontrée pour les formulations DPPC/DMPG. Cette libération a été observée à partir de 8 hrs après le début de l'expérience. La libération de la tobramycine était plus graduelle avec la formulation DPPC/DMPG à un ratio molaire de 15:1 (Fig 14: D).

4.8 Cinétique *in vivo* et persistance pulmonaire chez un modèle animal murin non infecté

Compte tenu des résultats précédents, les études de cinétique *in vivo* n'ont pas été effectuées sur les formulations composées principalement de DSPC, à l'exception de la formulation DSPC/DMPC à un ratio molaire de 15:1 utilisée en tant que témoin.

Lors des expériences *in vivo* avec les formulations à base de DPPC, la formulation DPPC/DMPC à un ratio molaire de 10:1 a présenté un très faible taux de rétention pulmonaire de la tobramycine (Fig 15: B); par contre cette même formulation à un ratio molaire de 15:1 a permis de détecter une quantité de tobramycine substantielle d'environ 40 µg d'antibiotique par paire de poumons (Fig 15: B). Cependant ces formulations composées de DPPC/DMPC ont présenté une quantité surprenante d'antibiotique au niveau rénal, soit environ 61 µg par paire de reins 1 hr après le début de l'expérience en ce qui concerne la formulation DPPC/DMPG (15:1) et

Fig 15A: Persistance pulmonaire de la tobramycine chez un modèle animal murin non infecté. La quantité de tobramycine ($\mu\text{g/ml}$) a été quantifiée suite à l'administration intratrachéale d'une dose de 800 μg non encapsulée et encapsulée incorporée dans la formulation liposomale DPPC/DMPG (dipalmytoyl phosphatidylcholine / dimyristoyl phosphatidyl-glycerol).

FIG 15A: DPPC/DMPG

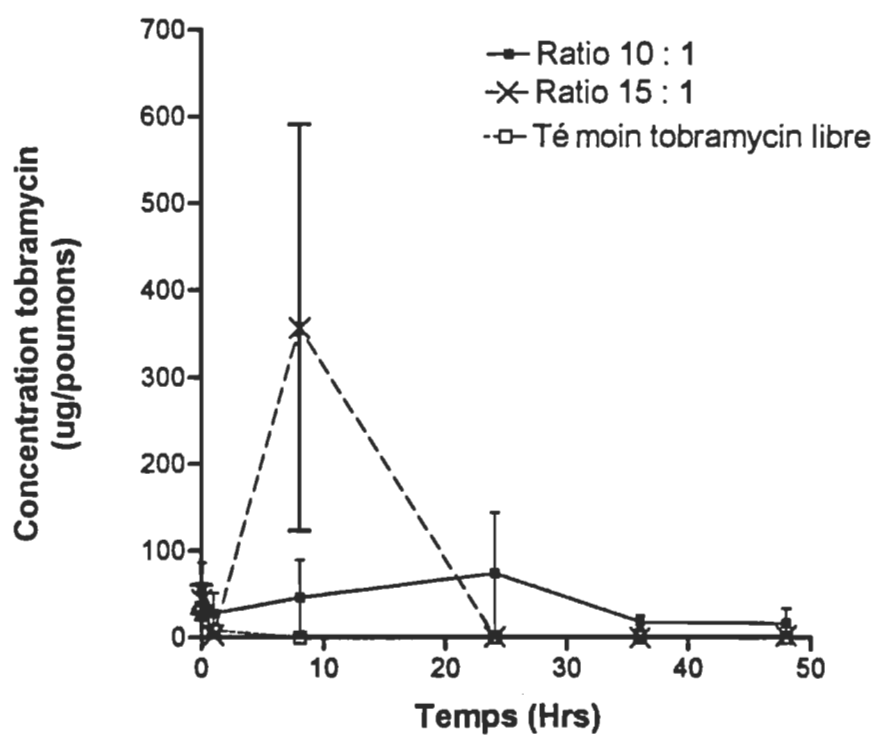


Fig 15 B: Persistance pulmonaire de la tobramycine chez un modèle animal murin non infecté. La quantité de tobramycine ($\mu\text{g/ml}$) a été quantifiée suite à l'administration intratrachéale d'une dose de 800 μg non encapsulée et encapsulée incorporée dans la formulation liposomale DPPC/DMPC (dipalmytoyl phosphatidylcholine / dimyristoyl phosphatidylcholine).

FIG 15B: DPPC/DMPC

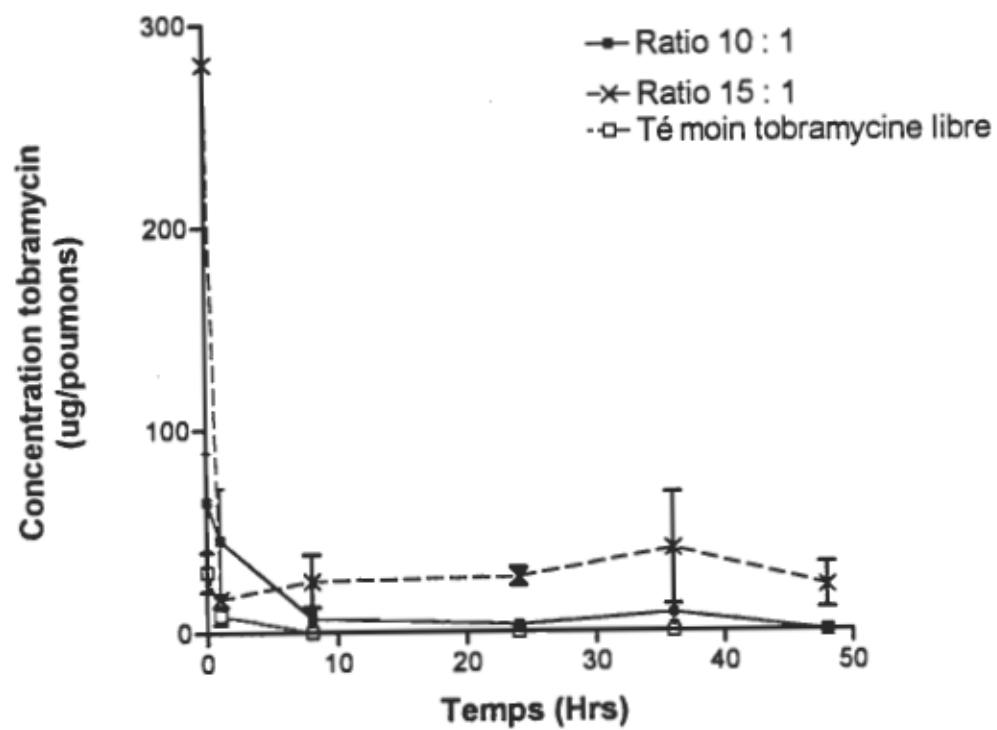


Fig 15C: Persistance pulmonaire de la tobramycine chez un modèle animal murin non infecté. La quantité de tobramycine ($\mu\text{g/ml}$) a été quantifiée suite à l'administration intratrachéale d'une dose de 800 μg non encapsulée et encapsulée incorporée dans la formulation liposomale DSPC/DMPC (disteroyl phosphatidylcholine / dimyristoyl phosphatidylcholine).

FIG 15C: DSPC/DMPC

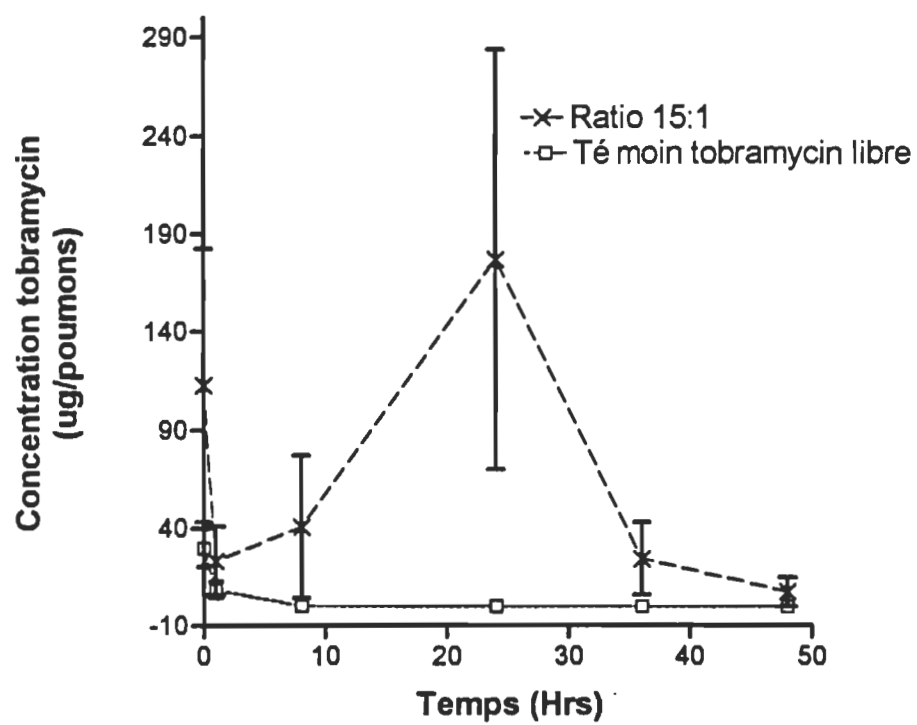


Tableau 6: Quantification de l'antibiotique ($\mu\text{g}/\text{reins}$) suivant l'administration de liposomes.

Formulations	<u>Rapport en Phospholipides 10 : 1</u>		<u>Rapport en Phospholipides 15 : 1</u>	
<u>DSPC¹/DMPC²</u>				
TEMPS (hrs)	μg/reins	SEM	μg/reins	SEM
1.00	N.D.		N.D.	
48.00	N.D.		12.72	3.83
<u>DPPC³/DMPC</u>				
TEMPS (hrs)	μg/reins	SEM	μg/reins	SEM
1.00	9.26	4.63	61.48	24.98
48.00	56.61	7.46	27.65	16.81
<u>DPPC/DMPG⁴</u>				
TEMPS (hrs)	μg/reins	SEM	μg/reins	SEM
1.00	19.27	3.82	30.05	5.44
48.00	8.86	4.64	10.80	0.98
<u>Tobramycine libre</u>				
TEMPS (hrs)	μg/reins	SEM		
1.00	30.23	20.86		
48.00	7.52	4.66		

¹DSPC: distearoyl phosphatidylcholine³DPPC: dipalmitoyl phosphatidylcholine²DMPC: dimyristoyl phosphatidylcholine⁴DMPG: dimyristoyl phosphatidyl-glycerol

56 µg par paire de reins, en ce qui concerne la formulation liposomale DPPC/DMPC (10:1) 48 hrs après le début de l'expérience (Fig 15 B). La quantité de tobramycine détectée dans les poumons des animaux traités avec la formulation DPPC/DMPG à un ratio molaire 15:1 atteignait une valeur moyenne de 356 µg d'antibiotique par paire de poumons 8 hrs après administration (Fig 15: A). Les quantités individuellement détectées pour chaque souris étaient de 799, 269 et de 2 µg par paire de poumons. Ces expériences ont été répétées indépendamment avec trois autres souris et les résultats obtenus sont demeurés similaires, soit 479, 183 et 58 µg d'antibiotique par paire de poumons. Les quantités de tobramycine retrouvées suite à l'administration de la formulation DPPC/DMPG (ratio molaire 10:1), ont été respectivement de 46 µg et de 73 µg par paire de poumons, 8 et 24 hrs après administration intratrachéale (Fig 15: A). Avec ce type de formulation, la quantité de tobramycine retrouvée dans les reins, a été extrêmement basse (< 20 µg) comparativement à la quantité retrouvée dans les poumons.

4.9 Analyse de l'effet bactéricide anti-*Pseudomonas aeruginosa* de chémoliposomes sur un modèle animal d'infection chronique

Les expériences de cinétiques avaient démontré que la formulation liposomale chargée négativement et composée de DPPC/DMPG libérait l'antibiotique de façon continue lors des expériences *in vitro* tout en permettant une rétention pulmonaire à long terme de l'antibiotique. Nous avons alors effectué des expériences dans le but de mesurer l'activité anti-*P. aeruginosa* de la

tobramycine encapsulée dans les formulations DPPC/DMPG caractérisées par leur forte fluidité. Lors de la première expérience, deux formulations ont été vérifiées, soit la formulation DPPC/DMPG à un ratio molaire 10:1 et la formulation DSPC/DMPC à un ratio molaire 15:1 en tant que formulation témoin. Cette dernière formulation ne comportait que des phospholipides neutres et sa fluidité était moindre que pour la première formulation. Lors de la seconde expérience, seule la formulation composée de DPPC/DMPG à un ratio molaire 15:1 a été testée. Lors de cette dernière expérience, deux traitements de 240 µg de tobramycine ont été administrés comparativement à trois traitements de 600 µg lors de la première expérience. Comme groupes témoins, des rats infectés ont reçu les traitements suivants: 1) 100 µl de PBS; 2) une quantité équivalente d'antibiotique libre ; 3) des liposomes DPPC/DMPG contenant du PBS; 4) des liposomes DSPC/DMPG contenant du PBS. Un effet bactéricide important contre *P. aeruginosa* a été observé chez les 5 rats traités avec de la tobramycine incorporée dans la formulation liposomale DPPC/DMPG à un ratio molaire 10:1 (tableau 7). Le nombre d'unités formant des colonies (ufc) dénombré sur les géloses ensemencées en triplicata avec l'homogénat de poumons non dilué provenant de rats infectés était inférieur au nombre minimal de 30 ufc, acceptable statistiquement (Gerhardt, 1981), ce nombre variant entre 0 et 7 ufc. D'autre part, la tobramycine encapsulée dans la formulation DSPC/DMPC n'a démontré aucun effet bactéricide, les décomptes bactériens étant comparables à ceux obtenus chez les groupes traités avec du PBS ou avec des liposomes sans antibiotique. Le nombre de cfu dénombré chez tous les groupes témoins et chez le groupe de rats traités avec la formulation DSPC/DMPC variait entre $1,4 \times 10^6$ et

$2,3 \times 10^7$ (tableau 7). Finalement, on pouvait observer que les traitements à l'aide de tobramycine libre a donné des résultats comparables à ceux observés avec les autres groupes témoins.

Lors de la seconde expérience, l'administration de doses plus faibles de tobramycine encapsulée dans la formulation liposomale DPPC/DPMG (à un ratio molaire 15:1) a démontré une efficacité bactéricide aussi prononcée que lors de la première expérience. Deux doses de 240 μg de tobramycine comparativement à trois doses de 600 μg ont provoqué l'éradication presque complète de la souche muqueuse de *P. aeruginosa* (tableau 8) alors que le nombre de cfu dénombré chez les groupes témoins était supérieur à 10^8 par paire de poumons. Finalement, comparativement à l'activité de la tobramycine encapsulée dans la formulation liposomale DPPC/DMPG, l'antibiotique libre a démontré peu d'efficacité contre la même souche de *P. aeruginosa*.

Tableau 7

Etude de l'effet bactéricide des chémoliposomes chez un modèle animal d'infection chronique à *P.aeruginosa*

<u>Traitement¹ de 3 doses de 600 µg</u>	<u>nombres de rats</u>	<u>ufc² / paire de poumons</u>	<u>log ufc / paire de poumons</u>
PBS ³ seul	2	1.40x10 ⁶	6.15
Liposome - PBS (DPPC/DMPG 10:1) ⁴	2	2.32x10 ⁷	7.36
Liposome - tobramycine (DPPC/DMPG 10:1)	5	< décompte significatif ⁵	< décompte significatif
Liposome - PBS (DSPC/DMPC 15:1)	3	2.11x10 ⁷	7.32
Liposome-tobramycine (DSPC/DMPC 10:1)	6	1.83x10 ⁶	6.26
Tobramycine libre	5	1.25x10 ⁷	7.10

1: Traitement avec de la tobramycine

2: Unités formant des colonies

3: Tampon phosphate salin

4: Dipalmitoyl phosphatidylcholine / dimyristoyl phosphatidyl-glycerol à un ratio molaire 10:1

5: Pas ou très peu de ufc (0 to 4) sont énumérées sur les géloses ensemencées en triplicata à partir d'homogénats de poumons.

Tableau 8

Etude de l'effet bactéricide des chémoliposomes chez un modèle animal d'infection chronique à *P.aeruginosa*

<u>Traitement¹ de 2 doses de 240 µg</u>	<u>nombres de rats</u>	<u>ufc² / paire de poumons</u>	<u>log ufc / paire de poumons</u>
PBS seul	3	1.05x10 ⁸	8.02
Liposome - PBS (DPPC/DMPG 15:1) ³	3	1.24x10 ⁸	8.93
Liposome - tobramycine (DPPC/DMPG 15:1)	3	< décompte significatif ⁴	< décompte significatif
Tobramycine libre	5	1.07x10 ⁶	6.03

1: Traitement avec de la tobramycine

2: Unités formant des colonies

3: Dipalmitoyl phosphatidylcholine / dimyristoyl phosphatidyl-glycerol à un ratio molaire 15:1

4: Pas ou très peu de ufc (0 to 6) sont énumérées sur les géloses ensemencées en triplicata à partir d'homogénats de poumons.

DISCUSSION ET CONCLUSION

V DISCUSSION ET CONCLUSION

Lors des essais antérieurs de chémoliposomes sur un modèle animal d'infection chronique à *P. aeruginosa*, nous avons démontré que l'administration intratrachéale de tobramycine incorporée dans des liposomes, lorsque comparée à l'administration de doses équivalentes prolongeait le temps de séjour de l'antibiotique dans les poumons, préservait son intégrité et diminuait sa néphrotoxicité (Omri *et al.*, 1994). La préparation liposomale utilisée alors, était composée de DSPC/DMPG à un ratio molaire 15:1. Il est important de souligner qu'au cours de ces expériences, l'antibiotique protégé par les liposomes demeurait dans les tissus pulmonaires à un taux relativement stable pour une période d'au moins 16 hrs. sans que soit mise en évidence une efficacité bactéricide. Nous avons donc émis l'hypothèse que la composition lipidique utilisée conférait aux vésicules une trop forte rigidité pour permettre une interaction efficace avec les bactéries. Dans la présente série d'expériences, nous avons étudié l'influence de la composition en phospholipides de 10 formulations liposomales en fonction de la fluidité et de la rigidité de leur paroi. Nous avons aussi évalué le comportement de nos formulations liposomales en fonction de la charge électrique portée par les différents constituants phospholipidiques des vésicules. Les études de cinétiques *in vitro* et *in vivo* ont permis d'analyser les facteurs influençant la libération de l'antibiotique ainsi que sa persistance. Nos études se sont poursuivies par des essais chez un modèle animal d'infection chronique en utilisant les formulations liposomales présentant les caractéristiques les plus intéressantes. Les différentes formulations liposomales ont été fabriquées à partir de phospholipides synthétiques, en raison de leur grande pureté et surtout parce qu'ils sont moins

sujets à l'oxydation en raison de la saturation de leurs chaînes grasses (Grit *et al.*, 1993; Konings, 1984). Ces études ont nécessité la mise au point de plusieurs techniques préalablement à l'exécution des protocoles touchant directement l'étude des chémoliposomes.

5.1 Analyse quantitative de la tobramycine.

Nous possédions déjà dans notre laboratoire une méthodologie HPLC capable de quantifier la tobramycine à partir de suspensions liposomales (annexe 1). Nous avons, au cours de ce travail, optimisé cette méthodologie afin de quantifier avec plus de sensibilité et de précision la tobramycine contenue dans des échantillons de tissus animaux.

Au départ, nous dosions la tobramycine dans les tissus animaux par une méthode microbiologique. Cette méthode manquait de sensibilité particulièrement lors de la mesure de faibles concentrations de tobramycine. Lorsque nous mesurions de faibles concentrations de tobramycine, les écarts types étaient trop importants. La méthodologie HPLC s'est avérée beaucoup plus précise et sensible, même à un seuil de sensibilité de 0,78 µg/ml en phase aqueuse.

Parce que nous devions travailler souvent à la limite de la sensibilité de détection de la méthode HPLC, nous avons vérifié la longueur d'onde optimale de lecture en UV, qui correspondait antérieurement à 340 nm (Barends *et al.*, 1980 et 1981). Ceci nous a permis de déterminer que la longueur d'onde idéale était de 350 nm au lieu de 340 nm (Figures 4 et 5). A cette longueur d'onde, la

performance de notre méthode était optimale, puisqu'on observait une reproductibilité totale des concentrations de tobramycine analysées et cela même aux limites extrêmes de la courbe de détection.

La méthodologie utilisée, bien que très performante, a aussi des inconvénients. L'analyse d'un seul échantillon de tobramycine nécessite un minimum de 14 min. : une période de 7 minutes d'injection suivie par une période de 7 minutes de lavage de la colonne à l'aide de la phase mobile. Ceci restreint énormément le nombre d'échantillons que l'on peut analyser dans une journée. De plus, les espaces temps entre les échantillons auraient pu introduire un facteur d'erreur dans nos résultats puisque tous les échantillons d'une expérience doivent être préparés en même temps afin d'assurer la reproductibilité de nos analyses.

Afin de contourner ce problème, nous avons utilisé un second appareil HPLC (Institut de Recherche en Biotechnologie) qui comportait un auto-injecteur. Ceci nous a permis d'uniformiser les conditions d'analyse de nos échantillons puisque ces derniers étaient alors analysés à l'intérieur de 24 à 36 hrs.

L'utilisation de deux appareils HPLC différents nous a obligés à contrôler les paramètres de reproductibilité et de sensibilité des deux appareils à partir de solutions standards de tobramycine. Six inconnus, à des concentrations variables de tobramycine (2,86; 4,00; 6,66; 10,00; 20,00 et 100 µg/ml), ont été analysés simultanément sur les deux appareils. La figure no 6 montre qu'il y a une très forte

corrélation entre les analyses effectuées par les deux appareils, pour des concentrations de tobramycine situées entre ces limites. Lorsque des concentrations d'antibiotique inférieures à 1,33 µg/ml sont analysées, on observe une diminution de la sensibilité de la méthode. Pour cette raison, nous avons effectué nos analyses uniquement dans les limites correspondant aux valeurs reproductibles sur les deux appareils.

5.2 Paramètres affectant l'encapsulation

L'efficacité des chémoliposomes réside en partie dans un pourcentage d'incorporation satisfaisant de l'agent bioactif et dans sa capacité de rétention de la drogue incorporée. Notre méthode de fabrication de liposomes a été basée sur la méthode de déshydratation-réhydratation préalablement développée par Kirby et Gregoriadis (1984). Antérieurement, nous incorporions l'antibiotique juste avant l'étape de déshydratation et au moment de la réhydratation, ce qui donnait un taux d'encapsulation variant entre 6 et 9 mg de tobramycine par ml de liposomes. Les résultats présentés dans cette étude suggèrent de limiter l'incorporation de l'antibiotique à l'étape de réhydratation. De plus il semble plus efficace de réhydrater nos liposomes avec des concentrations se situant entre 10 et 200 mg/ml de tobramycine. A ces concentrations, nous obtenons un taux d'encapsulation de 30 à 34 mg/ml. Pour des raisons d'ordre pratique, nous avons pris la décision de réhydrater nos liposomes avec une solution de 40 mg/ml de tobramycine, puisque l'antibiotique est vendu commercialement à cette concentration, ce qui nous permet une plus grande standardisation de la méthode de fabrication.

Notre étude vise également l'obtention de vésicules de même taille tout en conservant une quantité maximale de tobramycine incorporée. Pour ce faire, nous avons filtré nos vésicules afin d'uniformiser leur taille tout en maximisant la quantité d'antibiotique encapsulée. Le diamètre désiré était de 0,4 μm . En effectuant trois filtrations consécutives sur trois filtres possédant une porosité de 1 μm , 0,6 μm et finalement 0,4 μm , nous avons obtenu des vésicules de 0,4 μm tout en minimisant les pertes lors de la filtration. En effet, le principal problème dû à la filtration, découle du fait que cette dernière tout en favorisant le taux d'encapsulation, entraîne des pertes importantes. Plus le nombre de passage sur filtre est grand, plus la perte de liposomes est importante. Par contre, le fait d'utiliser au départ des filtres de porosité plus large limite les pertes. En utilisant la combinaison mentionnée plus haut nous avons minimisé les pertes de liposomes tout en maximisant la quantité d'antibiotique encapsulée pour une quantité déterminée de liposomes.

5.3 Influence de la Tc et des différents phospholipides sur le comportement des chémoliposomes

Les informations provenant des profils de calorimétrie à balayage différentiel ont été obtenues à partir de 10 formulations liposomales préalablement réhydratées avec de la tobramycine (tableau 5). La température globale de transition de phase des liposomes n'a été que très peu affectée par la présence de l'antibiotique lors de ces expériences. La température de transition de phase des 10 formulations variait entre 46 °C et 29,5 °C. C'est à partir de ces résultats que nous avons analysé le

comportement de nos liposomes synthétiques. Les analyses de calorimétrie ont montré que toutes les formulations utilisant le DSPC comme constituant principal présentaient une température de transition de phase entre 40 °C et 46 °C. Lors des expérimentations *in vitro*, la fluidité membranaire de ces formulations a permis de libérer des quantités négligeables d'antibiotique dans le milieu environnant en comparaison à la quantité totale encapsulée, et ce durant toute la durée de l'expérience soit durant 48 hrs (Fig 14: A, B et C). Plus précisément, aucune libération de tobramycine n'a été décelée avant 24 hrs pour les formulations DSPC/DMPC ET DSPC/DPPC. De plus, au total, seulement 14 % de l'antibiotique incorporé à l'intérieur de la formulation DSPC/DMPG a franchit la paroi des vésicules. Les expériences de cinétique de libération de la tobramycine impliquant le DPPC comme constituant phospholipidique majoritaire ont démontré une libération progressive et continue de l'antibiotique durant la durée de l'expérience soit 48 hrs (Fig 14: D et E). Une différence appréciable a été notée entre la formulation non chargée DPPC/DMPC et la formulation chargée négativement soit DPPC/DMPG. Pour les deux formulations constituées de DPPC/DMPC nous avons remarqué une libération similaire d'environ 50% de l'antibiotique encapsulé durant les 36 premières heures. La libération de la formulation chargée s'est avérée plus progressive. Dans le cas de cette dernière formulation, la tobramycine a été détectée après 8 hrs alors qu'avec les formulations DPPC/DMPC l'antibiotique libéré a été détectée dès 1 hr après le début de l'expérience. Apparemment une différence si importante entre deux groupes de formulations possédant une même température de transition de phase peut s'expliquer par la présence d'une charge négative dans la constitution de la formulation DPPC/DMPG. En effet, selon certains auteurs, l'utilisation de phospholipides chargés augmenterait la stabilité des liposomes en réduisant leur taux d'agrégation (Crommelin, 1984; Grit, 1993). De plus il a

été suggéré qu'en absence de phospholipides chargés, la vésicularisation se ferait de façon incomplète lors de la réhydratation du film lipidique durant le processus de fabrication des liposomes (Talsma *et al.*, 1992). En ce qui concerne la formulation DPPC/DMPG, à un ratio molaire de 10:1 nous avons remarqué une importante libération de tobramycine 8 hrs après le début de l'expérience alors que la formulation DPPC/DMPG 15:1 induisait une libération de l'antibiotique de façon plus lente et plus progressive. Cette observation peut s'expliquer par le fait que la température de transition de phase de la formulation DPPC/DMPG 10:1 est de 29,5 °C alors que celle de la formulation 15:1 est de 33 °C ce qui conférerait à cette dernière une plus grande rigidité.

5.4 Persistance pulmonaire de la tobramycine encapsulée chez un modèle animal murin non infecté

Prenant en considération le faible taux de libération *in vitro* de l'antibiotique à partir de liposomes formés principalement de DSPC et leur forte rigidité membranaire, la rétention pulmonaire de la tobramycine a été évaluée avec une seule de ces formulations à titre de témoin. Ces résultats venaient confirmer la forte stabilité observée *in vivo* chez notre modèle animal d'infection chronique suite à l'utilisation de la formulation DSPC/DMPG (Omri *et al.*, 1994). Les 4 formulations composées de DPPC ont été soumises à des études de cinétique *in vivo* dans un modèle animal murin non infecté. L'administration de la formulation DPPC/DMPG chargée négativement, à un ratio molaire 10:1, a permis le maintien d'une quantité élevée de tobramycine dans les poumons (en

moyenne 55 µg / paire de poumons) pendant 24 hrs après administration de l'antibiotique. D'un autre côté, les résultats obtenus suite à l'utilisation de la même formulation, mais à un ratio molaire 15:1 sont difficiles à expliquer. Une très grande quantité de tobramycine a été détectée 8 hrs après l'administration des chémoliposomes dans les poumons de 2 des 3 souris inoculées. Cette expérience a été répétée une deuxième fois, mais les résultats sont demeurés approximativement les mêmes. Cependant, il est possible qu'il soit préférable qu'un haut niveau d'antibiotique soit libéré 8 hrs après l'administration plutôt que des doses minimales sur une période de temps plus étendue en ce qui concerne l'efficacité de l'antibiotique. Les résultats obtenus avec la formulation DPPC/DMPC à un ratio molaire 10:1, ont démontré que cette formulation ne permet pas une persistance prolongée *in vivo* de l'antibiotique. La combinaison d'une température de transition de phase basse de 29,5 °C couplée à l'absence d'un phospholipide chargé peut expliquer la faible persistance pulmonaire de l'antibiotique encapsulé dans ce type de liposomes.

Une quantification de la tobramycine par HPLC a été effectuée sur des homogénats de reins de souris, 1 et 48 hrs après l'administration de l'antibiotique incorporé dans des liposomes. Le choix de ces périodes a été déterminé suite à des expériences préliminaires. L'administration de tobramycine dans des liposomes formés de DPPC/DMPG a permis de détecter des quantités réduites d'antibiotique au niveau rénal contrairement aux quantités détectées dans les poumons de ces mêmes animaux. Par contre, lorsque l'antibiotique était administré dans des liposomes formés de DPPC/DMPC, les quantités de tobramycine détectées dans les reins étaient plus élevées qu'avec les autres formulations. Cela suggère que l'absence de phospholipides chargés dans la composition des formulations liposomales tend à favoriser le taux d'agrégation des vésicules, donc la formation de

vésicules plus grosses, ce qui peut être un facteur susceptible d'influencer la rétention ultérieure de drogues au niveau rénal.

Ces résultats démontrent que l'incorporation de tobramycine dans des vésicules liposomales peu fluides composées principalement de DSPC, entraîne une libération de l'antibiotique beaucoup plus lente que lorsque l'on utilise des liposomes composés de DPPC. De plus, il serait tentant d'affirmer que la rigidité membranaire soit la cause directe de la non interaction observée entre les liposomes et les bactéries lors des études antérieures (Omri *et al.*, 1994). L'utilisation de liposomes à fluidité membranaire plus élevée, composés principalement de DPPC, couplée à l'addition d'un phospholipide chargé négativement, favoriseraient la libération continue de l'antibiotique ainsi que la persistance de la tobramycine dans les poumons. D'un autre côté, l'absence de phospholipides chargés dans la composition de la formulation liposomale DPPC/DMPC, ajoutée à la fluidité des membranes liposomales, entraîneraient une diminution de la persistance de l'antibiotique au niveau pulmonaire tout en augmentant considérablement la rétention de l'antibiotique au niveau rénal. En conclusion, la composition en phospholipides des liposomes semble influencer la libération, la persistance pulmonaire, et le risque de toxicité des antibiotiques encapsulés.

5.5 Formulation liposomale à effet bactéricide

Comme nous l'avons vu précédemment, les formulations liposomales utilisées dans cette dernière partie de notre étude ont été sélectionnées principalement en raison de leur capacité

d'encapsulation, de leur capacité à libérer de façon modulée l'antibiotique à cause de la fluidité de leur membrane, de leur persistance au niveau pulmonaire et de la présence de charges négatives. Nos investigations ont démontré que ces formulations liposomales composées de DPPC et DMPG à un ratio molaire 10:1 et 15:1, augmentaient fortement l'effet bactéricide de l'antibiotique contre une souche muqueuse de *P. aeruginosa*. La phase 1 des ces expériences (tableau 6), où trois doses de 600 µg de tobramycine encapsulée dans la formulation liposomale DPPC/DMPG (ratio molaire 10:1) ont été administrées, a induit l'éradication presque complète de l'infection au niveau pulmonaire. En effet, le décompte bactérien était pratiquement nul (entre 0 et 4) comparativement à 6,15 - 7,36 log cfu / paire de poumons pour les autres groupes. La formulation DSPC/DMPC (ratio molaire 15:1) qui a été utilisée comme témoin négatif lors de ces expériences, a permis de confirmer l'absence d'effet bactéricide obtenu avec les formulations présentant un taux de rigidité élevé. La supériorité de la formulation liposomale chargée négativement DPPC/DMPG sur la tobramycine libre est renforcée du fait que l'efficacité bactéricide est maintenue même après l'administration de seulement deux doses de 240 µg de tobramycine (tableau 7) au lieu de 3 doses de 600 µg (tableau 6). Les liposomes utilisés lors de cette seconde expérience étaient composés de DPPC/DMPG à un ratio molaire de 15:1.

Les résultats qui ont été obtenus au cours de cette étude, confirment des travaux antérieurs réalisés *in vitro* et indiquant que le fait d'encapsuler des antibiotiques anti-*P.aeruginosa* augmente leur activité bactéricide (Nacucchio *et al.*, 1988; Lagacé *et al.*, 1991).

Compte tenu de l'efficacité bactéricide marquée de notre formulation liposomale comparativement à l'antibiotique libre et du fait qu'il s'agisse d'une infection avant tout extracellulaire, le nombre

d'hypothèses susceptibles d'expliquer le phénomène est réduit. Il semble probable que l'éradication de l'infection chronique ait résulté d'un mécanisme favorisant la pénétration de l'antibiotique à travers la membrane de la bactérie, possiblement par un processus de fusion. D'autres groupes, dans le cadre d'études *in vitro*, ont également avancé cette hypothèse (Chowdhury *et al.*, 1981; Kotsifaki *et al.*, 1990). Le groupe de Kotsifaki *et al* (1990) suggère que les LPS rugueux favoriseraient la fusion entre la paroi de la bactérie et la membrane du liposome. De plus, deux groupes de chercheurs ont présenté des résultats d'études *in vivo* utilisant les liposomes comme vecteurs de médicaments anti-*P. aeruginosa*. Dans le premier cas, les chercheurs ont pratiqué des plaies chirurgicales qu'ils ont infectées avec *P. aeruginosa* et traitées de façon topique avec une antibiotique encapsulé (Price *et al.* (1990; 1994). Les formulations liposomales utilisées étaient chargées négativement et présentaient un diamètre de 0,34 μm . Les auteurs ne donnaient toutefois pas d'indication concernant la nature des phospholipides utilisés. Leurs vésicules ont permis de diminuer le nombre de bactéries infectieuses par un facteur d'environ 3 log (10^8 ufc à 10^5 après traitement). Deux autres études réalisées par un même groupe (Assil *et al.*, 1991; Frucht-Perry *et al.*, 1992) et portant sur des infections oculaires impliquant *P. aeruginosa*, ont démontré la persistance et la préservation de l'antibiotique encapsulé. Les résultats de nos travaux, tout en confirmant les résultats positifs obtenus par ces deux groupes de chercheurs, montrent une activité bactéricide fortement accrue. En effet, nos liposomes ont permis l'éradication presque totale d'une infection où l'on retrouvait plus de 10^6 ufc par paire de poumons. De plus, dans notre cas, il s'agissait d'une infection pulmonaire alors que les autres infections décrites ci-dessus, impliquaient des traitements topiques d'infections de surface, donc plus faciles à traiter.

Finalement, la souche que nous avons utilisée était de phénotype muqueux, ce qui compliquait davantage le traitement.

La supériorité bactéricide de notre formulation DPPC/DMPG comparativement à nos autres formulations ainsi qu'à celles des autres groupes, repose probablement sur la charge des phospholipides utilisés et plus particulièrement sur leur degré de fluidité qui est un facteur susceptible de favoriser le phénomène de fusion.

Il est également possible, en tant que phénomène secondaire, que l'efficacité de notre formulation soit due au fait que les liposomes, dépendamment de leur formulation puissent être phagocytés par les macrophages de façon plus ou moins importante. Comme il est possible que les macrophages puissent servir de réservoir au *P. aeruginosa*, les chémoliposomes pris en charge par ces derniers, pourraient permettre d'éliminer cette source de réinfection. Des études concernant des bactéries intra-cellulaires, telles *Staphylococcus* et *Mycobacterium* (Ashtekar *et al.*, 1991; Bermudes *et al.*, 1987; Swenson *et al.*, 1988), ont démontré l'éradication de bactéries à l'intérieur des macrophages. Actuellement, notre laboratoire étudie la possibilité que les macrophages alvéolaires puissent agir comme réservoir pour *P. aeruginosa*. Nous tentons également de mettre en évidence le phénomène de fusion de nos liposomes avec la paroi de *P. aeruginosa*.

5.6 Prospective

Notre étude démontre que les antibiotiques encapsulés dans certains types de liposomes facilitent la pénétration de l'antibiotique dans la cellule bactérienne ainsi qu'à travers les

exopolysaccharides muqueux de la bactérie. De plus, le fait d'encapsuler un antibiotique dans des liposomes permet d'augmenter leur persistance dans le poumon tout en diminuant leur toxicité.

Comme nos liposomes ont été administrés à notre modèle animal par voie intratrachéale, ce mode d'administration ne peut être utilisé chez l'humain pour des raisons aussi bien d'éthique que pratique. La prochaine étape consistera donc à mettre au point une méthode d'administration des liposomes par aérosols pour traiter les infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de fibrose kystique. Cette nouvelle approche thérapeutique devrait permettre d'améliorer de façon significative la qualité de vie et la longévité des patients atteints de fibrose kystique.

Des progrès importants ont été réalisés au cours des dernières années dans le domaine des aérosols. L'administration de différents médicaments solubles, incluant des antibiotiques, à l'aide de nébulisateurs à jets, est maintenant couramment utilisée pour traiter certains désordres pulmonaires. De plus, des préparations liposomales de médicaments telles l'enviroxime, la cyclosporine et l'amphotéricine B ont été administrées expérimentalement avec succès à l'aide de ce type de nébulisateur.

Finalement, il est possible que notre nouvelle formulation liposomale puisse être également efficace contre d'autres microorganismes résistants aux antibiotiques. Des test seront effectués sous peu pour vérifier cette hypothèse.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. **Angus B.L., Caron D., Kropinski A.M.B, Hancock R.E.W.,** 1984. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic supersusceptible mutant. J. Antimicrob. Agents. Chemother. **14**:349-357.
2. **Anwar H., Strap J.L., Chen K., Costerton J.W.,** 1992. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. J. Antimicrob. Agents. Chemother. **36**: 1208-1214.
3. **Ashtekar D., Duzgunes N., et Gangadharam P. R. J.** 1991. Activity of free and liposome encapsulated streptomycin against *Mycobacterium-avium* complex (MAC) inside peritoneal macrophages. J. Antimicrob. Agents. Chemother. **28**: 615-17
4. **Assil K.K., Frucht-Perry J., Ziegler E., Schanzlin D.J., Schneiderman T., Weinred R.N.** 1991. Tobramycin liposomes. Single subconjunctival therapy of pseudomonal keratitis. Investigative Ophthalmology & Visual Science. **32**(13): 3216-3220.
5. **Bangham A.D., Hill M.W., and Miller N.G.A.** 1974. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. Methods membranes Biology. **1**: 1-68.

6. **Barends, D.M., J.S.F. Van Der Sandt, and Hulshoff A.** 1980. Microdetermination of gentamycin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* **182**: 201-210.
7. **Barends, D.M., Zwaan C.L , and Hulshoff A.** 1981. Improved microdetermination of gentamycin and sisomicin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* **222**: 316-323.
8. **Barends, D.M., Zwaan C.L., and Hulshoff A.** 1981. Microdetermination of tobramycin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* **225**: 417-426.
9. **Bartlett G.R.,** 1958. Phosphorus assay in column chromatography. *Clin. and resh.* **234**: 466-468
10. **Bellon G., Chomarat M., and Doring G.,** 1991. Bacterial ecology in airways of cystic fibrosis patients. *Abrstr. 17 th Annu. Meet. E.W.G.C.F.*
11. **Bermudes L. E., Wu M., et Young L.S.** 1987. Intracellular killing of *Mycobacterium avium* complex by rifapentine and liposome-encapsulated amikasin. *J. Infect. Dis.* **156**:510-13
12. **Blouin A., Cormier Y.,** 1987. Endotracheal intubation in Guinea pigs by direct laryngoscopy. *Lab. animal Science*, **April 1987**: 244-245.

13. **Bodey G.P., Bovilar R., Fainstein V., Jadeja L., 1983.** Infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Review of Infect. Dis. **5(2)**: 279-313.
14. **Boucher R.C., Stutts M.J., Knowles M.R., Cantley L., Gatz J.T., 1986.** Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adnylate cyclase activation. J. Clin. Inves. **78**: 1245-1252.
15. **Busher B.D., Cullmannn W., Dick W., Wendt S., Ooferkuch W. 1987.** Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is due to dominised expression of outer membrane proteins. J. Infect. Dis. **156** (4): 681-684
16. **Cash, H.A., D.E. Woods, B. McCullough, W.G. Johanson, Jr., and J.A. Bass.** 1979. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Am. Rev. Respir. Dis. **119**: 453-459.
17. **Chapman D.** 1984. Physicochemical properties of phospholipid and lipid-water systems. In liposomes technology. vol 1 Ed par Gregoriadis G. Boca Raton: CRC Press Inc. 1-18
18. **Chowdhury MKR., Goswami R., Chakrabarti P., 1981.** Liposome trapped penicillin in growth inhibition of some penicillin-resistant bacteria. J. Appl. Bacteriol. **51**: 223-227.
19. **Cohen M.L.** 1986. Staphylococcus aureus: biology, mechanisms of virulence, epidemiology, J. Pediatr. **108**: 796-799

20. **Coune A.**, 1988. Liposomes as drug delivery system in the treatment of infectious diseases. Potential applications and clinical experience. *Infection*. **3**:141-147.
21. **Daikos G.L., Lolans V.T., Jackson G.G.** 1988. Alteration in outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* associated with selective resistance to quinones. *J. Antimicrob. Agents. Chemother.* **32** (5) 341-348.
22. **Di Sant'Agnese PA**, 1979. Cystic fibrosis. In Vaughan VC. McKay Rj, Behrman RE (eds) Textbook of pediatrics, 11 th edn. Wb Saunders Company. Philadelphia.:1988-2001.
23. **Fick R.B., and Squier S.U.**, 1989. Pathogenetic mechanisms in lung diseases caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*. **95** (3) supplement: 206s-213s.
24. **Fiel S.B.**, 1993. Clinical management of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Lancet*. **341**: 1070-1074.
25. **Fiske C.H., Subbarow Y.**, 1925. Colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**: 375
26. **Foucaud P., Bingen E., Lambert-Zechovsky N. et Navarro J.** 1990. Infection à pyocyannique dans la mucoviscidose, stratégies thérapeutiques, *La Presse Médicale*, **19**: 983-985.

27. **Frokjaer S., Hjorth E.L., Worts O.** 1984. Stability testing of liposomes during storage. In liposomes technology. Vol 1. Ed Gregoriadis G. Boca Raton: CRC Press Inc. 235-245
28. **Frucht-Perry J., Assil K.K., Ziegler E., Douglas H., Brown S.I., Schanzlin D.J., Weinred R.N.** 1992. Fibrin-embedded tobramycin liposomes: single application topical. *Cornea*. **11**(5): 393-397
29. **Gaillard D., Plotkowski C., Pucelle E.,** 1992. Mucus et protection de la muqueuse respiratoire. Edition et communication médicale, Paris. 238-267.
30. **Geddes D.M., Van der Laag J.** 1988. Discussion in Antimicrobial therapy against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *P. cepacia*. *Chest*. supplement. **94** (2) 145s
31. **Gennis R. B.,** 1989. Biomembranes: Molecular structure and function. Springer-Verlag, New York . P.65-72.
32. **Gerhardt, Philipp.** 1981. Manuel of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, 1913 I St., N.W., Washington, DC 20006
33. **Girod de Benlzmann S., Bajolet-Laudinat O., Dupuit F., Pierrot D., Fuchez C., Plotkowski MC., Puchelle E.,** 1994. Protection of the respiratory epithelium from *Pseudomonas aeruginosa* adherence by phosphatidylglycerol liposomes. *Infect. Immun.* **62**: 704-708

34. **Godfrey A.J., Bryan L.E.** 1987. Penetration of bêta-lactam through *Pseudomonas aeruginosa* porin channels. *J. Antimicrob. Agents. Chemother.* **31** (8): 1216-1221
35. **Godfrey A.J., Bryan L.E., Rabin H.R.,** 1981. Beta-lactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *J. Antimicrob. Agents. Chemother.* **19**: 705-711.
36. **Godfrey A.J., Hatlelid L., Bryan L.E.,** 1984. Correlation between lipopolysaccharide structure and permeability resistance in β -lactam resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Agents. Chemother.* **26**: 181-186.
37. **Gregoriadis G., Senior J., Wolff B., and Kirby C.** 1985. Targeting of liposomes to accessible cells IN VIVO. In *Macromolecules as drugs and as carriers for biologically active materials*. *Annal of the New York academy of science.* **446** : 319-340.
38. **Hamilton R.L., Guo L.S.S.** 1984. French pressure cell liposomes: preparation, properties, and potential. In *liposome technology*. Vol 1. Ed Gregoriadis G. Boca aton: CRC Press Inc. 37-45.
39. **Handcock R.E.W.** 1985. The *Pseudomonas aeruginasa*: outer membrane permeability barrier and how to overcome it. *Antibiot. Chemother.* **36**: 95-102.
40. **Handcock R.E.W., and Carey A.M.** 1979. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat-and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* **140** (3): 902-910.

41. **Handcock R.E.W.**, Intrinsic antibiotic resistance on *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Agents. Chemother. **18**: 653-659.
42. **Hoiby N.** 1975. Prevalence of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in bacteriological specimen from patient with cystic fibrosis. Chest. supplement **94**: 97s-102s.
43. **Hoiby N.** 1982. Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. Acta Pediatr Scand. Supplement **301**:33-54.
44. **Jallat, S.** 1991. Mucoviscidose : du gène à la protéine. Biofutur.
45. **KirbyC., Gregoriadis G.** 1984. A simple procedure for preparing liposomes capable of high encapsulation efficiency under mild conditions . Liposomes technology Gregoriadis, G vol 1 CRC Press Inc. 19-27.
46. **Konings A.W.T.** 1984. Lipid peroxydation in liposomes. In liposome technology vol 1. Ed Gregoriadis G. Boca RatonL CRC Press Inc. 139-161.
47. **Kotsifaki H, Tzouvelekis L.S., Panagiotidou G., Vatopoulos A.C., Economopoulos Chr., Legakis N.J.** 1990 . Enhanced *In-Vitro* Activity of Liposome-Trapped Penicillin-G against *Pseudomonas aeruginosa*. J. Chemother. **2**:82-86.
48. **Kreuter J.** 1991. Liposomes and nanoparticles as vehicules for antibiotics. Infection supplement. **19**: 224s-228s.

49. **Lagacé J., Dubreuil M., Montplaisir S.** 1991. Liposome-encapsulated antibiotics: preparation, drug release and antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microencapsulation* **8**: 53-61.
50. **Lethem M.L., James S.L., Marriott C.**, 1990. The role of mucous glycoproteins in the rheologic properties of cystic fibrosis sputum. *Am Rev Respir Dis* **142**: 1053-1058.
51. **Lietman P.S.** 1988. Pharmacokinetics of antimicrobial drugs in cystic fibrosis. *Bêta-lactam antibiotics. Chest. supplement.* **94** (2): 115s-119s.
52. **Lijana R.C., Mc Craken M.S., and Rudolph C.J.** 1986. The oxydation of cholesterol in vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **987**: 247-252.
53. **Marks M.I.**, 1981. The pathogenesis and treatment of pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J. Pediatr.* **98**: 173-179.
54. **Massari S., and Colona R.** 1986. Lipid miscibility and size increase of vesicles composed of two phosphatidylcholines. *Biochim. Biophysys. Acta.* **863**: 264-276.
55. **Myers M.G., Koontz F., and Weinberger M.**, 1983. Lower respiratory infections in patients with cystic fibrosis, in: *Textbook of Cystic Fibrosis*. Ed J.D. Lloyd-Still. John Wright, Boston: 91-107.
56. **Nayler J.H.C.**, 1987. Resistance the β -lactam in Gram-negative bacteria: relative contributions to β -lactamase and permeability limitations. *J. Antimicrob. Agents. Chemother.* **19**: 713-732.

57. **Nev H.**, 1983. The role of *Pseudomonas aeruginosa* in infection. J. Antimicrob. Agents. Chemother. **11** supplement B: 1-13.
58. **Norris S.A., Sciortino C.V.** 1989. Monoclonal antibody to an aminoglycoside-resistance factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Dis. **158** (6): 1324-1328.
59. **Omri A., Beaulac C., Bouhajib M., Montplaisir S., and Lagacé J.**, 1994. Pulmonary retention of free liposome-encapsulated tobramycin after intratracheal administration in uninfected rats and rats infected with *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Agents. Chemother. **38**:1090-1095.
60. **Padmanabhan, R. V., R. Gudapaty, I. E. Liener, B.A. Schwartz, and J. R. Hoidal.** 1985. Protection against pulmonary oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase or catalase. Am. Rev. Respir. Dis. **132**: 164-167.
61. **Parr T.R.Jr., Bayer A.S.** 1988. Mechanism of aminoglycoside resistance in variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated during treatment of experimental endocarditis in rabbits. J. Infect. Dis. **158** (5): 1003-1010.
62. **Parry M.F., Neu H.C.**, 1976. Ticarcillin for treatment of serious infections with gram-negative bacteria. J. Infect. Dis. **134**:476-480
63. **Pedersen, S. S., C. Koch, N. Hoiby, and K. Rosendal.** 1986. An epidemiologic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis center. J. Antimicrob. Agents. Chemother. **17**: 505-516.

64. **Pennacino-Savage M., Hulen C.** 1990. Implantation et persistance des souches mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* dans les poumons de malades atteints de mucoviscidose. *Médecine/Sciences*. **6**: 886-894.
65. **Pennington J.E., Wolff S.M., Puziss M.**, 1979. Summary of a workshop on infection in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **140**: 252-256.
66. **Perkins W.R., Minchey S.R., Ahi P.L., Janoff A.S.** 1993. The determination of liposome captured volume. *Chemistry and Physics of lipids* **64**: 197-217.
67. **Permin H., Koch C., Hoiby N., Christensen H.O., Friis-Moller A., Moller S.** 1983. Ceftazidime treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection in cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Agents. Chemother. supplement A*. **12**: 313-323.
68. **Petersen N.T., Hoiby N., Mordhorst C.H., Lind K., Flensburg E.W., Bruun B.**, 1981. Respiratory infections in cystic fibrosis patients caused by viruses, chlamydia and mycoplasma - possible synergism with *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta. Paediatr. Scand.* **70**: 623-628.
69. **Pier G.B.**, 1985. Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host bacterium interaction. *J. Infect. Dis.* **151**: 575-580.
70. **Price C.L., Horton J.W., Baxter C.R.** 1990. Topical liposomal delivery of antibiotics in soft tissue infection. *J. Sur. Res.* **49(2)**: 174-178

71. **Price C.L., Horton J.W., Baxter C.R.** 1994. Liposome encapsulation: a method for enhancing the effectiveness of local antibiotics. *Surgery*. **115**(4): 480-487.
72. **Puiseux F., Delattre J.** 1985. Les liposomes: applications thérapeutiques. technique et documentation Lavoisier, Paris.
73. **Quinton P.** 1994. Viscosity versus composition in airway pathology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**: 6-7.
74. **Quinton P.M.,** 1983. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, **301**: 421-422.
75. **Rabin H.R., Harley F.L., Bryan L.E., and Elfring G.,** 1980. Evaluation of high dose tobramycin and ticarcillin treatment protocol in cystic fibrosis based on improved susceptibility criteria and antibiotic pharmacokinetics, in: *Perspectives in Cystic Fibrosis* (J. Sturgess, Ed), Canadian Cystic Fibrosis Foundation, Toronto: 370-375.
76. **Rich D.P.,** 1991. Effect of deleting the R domain on CFTR chloride channels. *Science*. **253**: 205-207.
77. **Ristuccia A.M., and Cunha B.A.** 1992. The aminoglycosides. *Med. Clin. N. Am.* **66**:303-312.
78. **Rolinson G.N.,** 1986. Bêta-lactam antibiotics. *J. Antimicrobial. Agents. Chemother.* **17**: 5-36.
79. **Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B-S., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan**

- .R., Tsui L.-C.H., Collins F.S., 1989.** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1959-1065.
80. **Sawai T., Yamaguchi A., and Hiruma R.** 1988. Effect of interaction between outer membrane permeability and bêta-lactamase production on resistance to bêta-lactam agents in Gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.* **10** (4): 761-764.
81. **Senior J.H.,** 1987. Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. Critical review in therapeutic drug carrier system. **3** (2): 123-193.
82. **Smith A.L., Redding G., Doershuk C., Goldmann D., Gore E., Hilman B., Marks M., Moss R., Ramsey B., Rubio T., Schwartz R.H., Thomassen M.J., Williams-Warren J., Weber A., Wilmott R.E., Wilson H.D., Yogeve R.,** 1988. Sputum changes associated with therapy for endobronchial exacerbation in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* **112**: 547-554
83. **Stephens D., Garey N., and Isels A.E.,** 1983. Efficacy of inhaled tobramycin in the treatment of pulmonary exacerbations in children with cystic fibrosis. *Pediatr. Infect.* **2**: 209-211.
84. **Stratton C.W., Tausk F.,** 1987. Synergistic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Agents. Chemother.* **19**: 413-416.

85. **Studemeister A.E., Quinn J.P.** 1988. Selective imepenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* associated with diminished outer membrane permeability. J. Antimicrob. Agents. Chemother. **32** (8): 1267-1268.
86. **Swenson C.R., Popescu M.C., et Ginsberg R.S.** 1988. Preparation and use of liposomes in the treatment of microbial infections. Crit. Rev. Microbial. **15**:S1-S31
87. **Szoka F. Jr., Papahadjopoulos D.** 1981. Liposomes: preparation and characterization. In liposomes: from physical structure to therapeutic applications. Ed par Knight C.G. Elsevier North-Holland biomedical press. Amsterdam, New York, Oxford. 51-77
88. **Thomassen M.J., Klinger J.D., Badger S.J., Van Heeckeren D.W., Stern R.C.,** 1984. Culture of thoracotomy specimens confirm usefulness of sputum cultures in cystic fibrosis. J. Pediatr. **104**: 352-356
89. **Trias J., Dufresne J., Lévesque R.C., Hikoida H.,** 1989. Decrease outer membrane permeability imipenem resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Agents. Chemother. **33**: 1201-1206.
90. **Tsui L-C.,** 1991. Molecular genetics of cystic fibrosis and possible mechanisms of protein function. *World Health Organization*, Hereditary diseases program, Report of a joint WHO/ICF (M)A task force on cystic fibrosis, annexe 1: 21-30.

91. **Vakirtzi-Lemonias C., Sekeris-Pataryas K.** 1981. interaction of liposomes with cell: model studies. In targeting of drugs. Ed Gregoriadis G., Trouet A. Plenum Press, New York. 355-374.
92. **Van Hoogevest, P., de Gier J. et de Kruijff B.** 1984. Determination of the size of the packing defects in dimyristoylphosphatidylcholine bilayers present at the phase transition temperature. FEBS Lett. **171**: 160-164.
93. **Van Klingerren B.** 1988. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Hemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*. Chest. supplement. 94 (2): 103s-108s
94. **Wilschut J**1982. Preparation and properties of phospholipid vesicles. In liposome methodology. Ed Leserman L.D., Barbet J. Inserm. 10-24
95. **Winterhalter M., Lasic D.D.,** 1993. Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. Chemistry and Physics of Lipids **64**: 35-43.
96. **Wood R.E.,** 1989. Treatment of cystic fibrosis lung disease in the first years. Pediatr. Pulmonol. Supplement. **4**: 68-70.
97. **Yoshimura F., Nikaido H.,** 1982. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. J. Bacteriol. **152**: 636-642.

98. **Young L.S., Wenzel R.P., Sabath L.D., Pollack M., Pennigton J.E., and platt R.,**
1984. The outlook for prevention and treatment of infections due to *Pseudomonas*
aeruginosa. Rev. Infect. Dis. **6**:769s-774s.

ANNEXE 1

Pulmonary Retention of Free and Liposome-Encapsulated Tobramycin after Intratracheal Administration in Uninfected Rats and Rats Infected with *Pseudomonas aeruginosa*

A. OMRI,^{1,2} C. BEAULAC,¹ M. BOUHJIB,¹ S. MONTPLAISIR,¹ M. SHARKAWI,² AND J. LAGACÉ^{1*}

Départements de Microbiologie¹ et de Pharmacologie,² Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Received 22 October 1993/Returned for modification 17 January 1994/Accepted 7 March 1994

The pulmonary residence time of free and liposome-encapsulated tobramycin was studied with uninfected rats and rats infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Chronic infection in lungs was established by intratracheal administration of 10⁸ CFU of *P. aeruginosa* PA 508 prepared in agar beads. After 3 days, a single dose (300 µg) of free or liposome-encapsulated tobramycin was given intratracheally to both infected and uninfected rats. At various time intervals (0.25 to 16 h) after drug instillations, the remaining tobramycin was evaluated in blood, lungs, and kidneys by a microbiological assay. Intratracheal instillation of liposome-encapsulated tobramycin resulted in high and sustained levels of tobramycin in lungs of uninfected and infected rats over the 16-h period studied; however, the tobramycin levels were two times higher in uninfected rats. There was no tobramycin detected in the blood or kidneys from these animals. In contrast, the intratracheally instilled free tobramycin was cleared within 3 and 1 h from the lungs of uninfected and infected animals, respectively. These data suggest that the encapsulation of tobramycin in liposomes can result in a significant increase of its residence time within lungs. This study also shows that pulmonary infection was associated with a lowering of tobramycin levels in lungs.

Chronic lung infection due to *Pseudomonas aeruginosa* is the major cause of morbidity and mortality in patients with cystic fibrosis (CF) (20, 44, 45). *P. aeruginosa* is an adaptable opportunistic microorganism that has the capacity to respond to a variety of environmental changes and has usually high intrinsic resistance to numerous antimicrobial drugs (17, 19). This inherent bacterial resistance seems to be associated with the low permeability of the outer membrane of the cell to some antimicrobial agents (4, 17, 46).

Efficient therapy targeted against *P. aeruginosa* remains difficult and controversial (8, 29). Usually, an aminoglycoside or beta-lactam antibiotic alone or both in combination are used as standard therapy for CF patients colonized with this organism (28, 38). These antibacterial agents require frequent high-dose parenteral administration in order to achieve therapeutically effective concentrations in serum, particularly against old biofilm cells formed by the mucoid phenotype of this organism (25, 39). However, prolonged or repeated treatment has been associated with gradually decreasing susceptibility of *P. aeruginosa* (33) and with accelerated clearance of antibiotics in these patients (21).

A prerequisite for the efficacy of these antibiotics in lung infections is that these agents must pass into the bronchial tree to reach the infected foci in order to achieve an elevated and persistent bioactive concentration in the sputum (2).

Local administration of antibiotics into the bronchial tree has been shown to be an interesting approach in the management of human lower respiratory tract infections due to bacterial, fungal, viral, and protozoan agents (41). Endotracheally administered aminoglycosides (e.g., tobramycin) led to

significantly better bacteriological eradication than placebo in a double-blind study of pneumonia in humans due to gram-negative organisms (12). After endotracheal instillation and aerosolization of free tobramycin, Valcke and Pauwels (43) observed a sustained concentration of the antibiotic in normal rat lungs, concomitant with minimal systemic absorption. It was also demonstrated that nonpenetrable compounds can be introduced into the cells of *P. aeruginosa* by the use of liposomes (37), thereby facilitating the diffusion of the drug through bacterial external envelopes to its site of action. The main reasons for the use of liposomes include (i) sustained drug release, (ii) reduced dose requirement and/or possibility of administering a larger dose with reduced toxicity, and (iii) increased sensitivity of *P. aeruginosa* to the liposome-encapsulated antibiotic as previously reported (24, 31).

To our current knowledge, the persistence of liposome-encapsulated tobramycin instilled into animal lungs has not been assessed yet. The current study was undertaken to (i) determine the pulmonary residence of liposome-encapsulated tobramycin in experimental rat pseudomonal pneumonia and to (ii) investigate the effect of this infection on the concentration of antibiotics within lungs.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain. One clinical isolate of *P. aeruginosa* PA 508 was used in this study. *P. aeruginosa* PA 508 is a stable mucoid strain isolated from the sputum of a patient with CF (Saint-Justine Hospital, Montreal, Quebec, Canada). *P. aeruginosa* PA 508 was stored at –70°C in brain heart infusion broth supplemented with 10% glycerol. For the experimentation, an 18-h culture of this organism in Proteose Peptone broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) was prepared.

Rat model. Male, pathogen-free, Sprague-Dawley rats weighing 225 to 250 g (Charles River, Saint-Constant, Quebec, Canada) were used for this study. Sixty-five rats were infected

* Corresponding author. Mailing address: Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal. C.P. 6128, succ. A. Montréal, P.Q., Canada H3C 3J7. Phone: (514) 343-2180. Fax: (514) 343-5701.

with *P. aeruginosa* PA 508 in agar beads. Another group of 65 rats received the same volume of sterile agar beads and served as uninfected controls. Bacteria were coated in agar beads as previously described (14). The bacterial count was ascertained by 10-fold serial dilutions in phosphate-buffered saline (PBS) on Proteose Peptone agar plates as described below. Before infection, the rats were anesthetized with a mixture of 70 mg of ketamine hydrochloride per kg of body weight (Rogar/STB Inc., Montreal, Quebec, Canada) and 7 mg of xylazine per kg (BAYVET Division, Chemagro Limited, Etobicoke, Ontario, Canada) by intramuscular injection. Anesthetized rats were placed in the supine position, and the upper jaw was attached to the operating table by a rubber band brought over the incisor teeth. A laryngoscope with a modified (narrowed laterally near its extremities) Wisconsin pediatric blade no. 0 was used to visualize the larynx, and a catheter with a polished stylet was inserted between the vocal cords and pushed gently forward into the trachea (20-mm depth). The stylet and the laryngoscope were then withdrawn, and intubation was confirmed by the formation of water condensation on a cold mirror with each breath of the rat. A 250- μ l calibrated Hamilton syringe was used to introduce, at the bifurcation of the trachea, 10^8 CFU of *P. aeruginosa* PA 508 (0.1 ml) prepared in agar beads. Inoculation was followed by a bolus of air to disperse the beads into the lungs. Three days after the inoculation of agar beads, uninfected and infected animals received one dose of either 0.1 ml of free tobramycin (300 μ g) or 0.1 ml of liposome-encapsulated tobramycin (300 μ g) by intratracheal instillation (18-gauge, 20-mm catheter) by the same methodology as described for infection. Following instillation, the animals' heads were immediately elevated approximately 30° above the horizontal plane and maintained in that position until they recovered from the anesthesia. Ten uninfected and infected control animals were left without antibiotic treatment. Lung bacterial counts were performed in 30% of infected animals to control the persistence of the chronic pulmonary infection. Serial 10-fold dilutions of the homogenates in cold PBS were made, and 0.1 ml of each dilution was pipetted and spread on cetrimide agar (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.). CFU were counted after 24-h incubations at 37°C under 5% CO₂. Counts were expressed in log CFU per pair of lungs.

Preparation of liposomes. Liposomes were prepared with a 10:1 molar ratio of distearyl phosphatidylcholine and dimyristoyl phosphatidyl-glycerol (Avanti Polar Lipids Inc., Birmingham, Ala.) by a reverse-phase evaporation procedure previously described (24). Briefly, appropriate amounts of lipid mixture were dissolved in chloroform in a round-bottom flask and dried to a lipid film by rotoevaporation (Buchi Rotavapor-KRvr 65/45) at 65°C under vacuum (Buchi 168-Vacuum\Distillation controller). The lipids were then redissolved in tobramycin (Eli Lilly, Toronto, Ontario, Canada) and lyophilized in ampoules. Ampoules were kept at -70°C until use. After rehydration with the antibiotic, liposomes were filtered through an extruder (Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, British Columbia, Canada) charged with a polycarbonate membrane (0.4 μ m). Control liposomes were prepared similarly, but PBS was used instead of the antibiotic.

The procedure for the determination of tobramycin in liposomes was based on derivatization of the tobramycin with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. Liposome samples for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis were treated as follows: 100 μ l of liposomes was added to 5 ml of methanol (MeOH) at 65°C and vortexed for 1 min; 490 μ l of PBS was then added and vortexed for 1 min after centrifugation at 4,000 \times g for 20 min, at 4°C. A total of 100 μ l of the supernatant was

diluted with 0.9 ml of PBS, and 100 μ l was transferred in an ampoule containing 54 μ l of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene prepared in MeOH (180 g/liter), 40 μ l of 0.1 M borate buffer (pH 9.3), and 400 μ l of MeOH. Ampoules were sealed, vortexed, and heated for 30 min at 80°C and then cooled at room temperature. For the standards, tobramycin solutions were prepared in PBS with known amounts of tobramycin and processed as described above for encapsulated tobramycin.

HPLC with UV detection as previously described (5-7) was used. The HPLC system was composed of a pump and a system controller (Varian model 5000), a simple loop injector (Reodyne 7125), a UV spectrophotometric detector (Varian 2550), and a recorder (Spectra-Physics SP 4290). The separation was carried out on a Nova-Pak C18 cartridge column (inside diameter, 10 by 0.8 mm; particle size, 4 μ m [Waters Chromatography]). The mobile phase was acetonitrile-MeOH-potassium phosphate buffer (10 mM) (65:10:25, vol/vol [pH 7.2]), and the flow rate was 1.3 ml/min. The column effluent was monitored at 340 nm and at 0.005 absorbance units full-scale. Chromatography was performed at room temperature. Following HPLC analysis, the stock preparation of liposome-encapsulated tobramycin was diluted in PBS to administer 300 μ g of encapsulated tobramycin in a volume of 100 μ l. Liposome-encapsulated PBS was used as a control and was carried through the entire procedure to assess the specificity of the test. The quantifiable limit for tobramycin was 0.5 μ g/ml. At concentrations from 0.5 to 10 μ g/ml, the coefficients of variation ranged between 1.2 and 2.9%. Over the same concentrations, the interday coefficients of variation ranged between 2.2 and 3.5%. For seven samples of spiked tobramycin, the standard curve linearity extended over the range 0.5 to 10 μ g/ml gave a correlation coefficient greater than 0.999.

Tissue preparations. At 0.25, 1, 2, 3, 4, 6, 8, and 16 h after tobramycin instillations, a minimal number of three rats were reanesthetized, and blood was withdrawn by cardiac puncture. The animals were then sacrificed, and the entire lungs and both kidneys were removed aseptically, weighed, and then homogenized in cold sterile PBS (20% [wt/vol]) for 30 s with a Polytron homogenizer (Polytron: Kinematica, Lucerne, Switzerland). The homogenizer was rinsed and flamed between samples. Tobramycin levels in both homogenized tissues and sera were immediately measured as described below.

Antibiotic concentrations in tissues. The concentrations of tobramycin in serum and tissues were measured by a microbiological assay. *P. aeruginosa* ATCC 25619 (American Type Culture Collection, Rockville, Md.) was grown overnight in Proteose Peptone broth at 37°C, and bacterial suspension was adjusted with PBS to contain an equivalence to a McFarland standard of 0.5 to ensure dense confluent growth on the plates. A total of 12.5 ml of the diluted culture was added to 300 ml of autoclaved molten antibiotic medium 5 (Difco) which had been cooled to 56°C and mixed gently by inversion. The seeded agar was poured onto glass plates (425 by 310 mm) on a horizontal level surface and allowed to harden for 30 min at room temperature. The wells in the plates were made by a puncher device (5-mm diameter) in the agar and filled with 0.025-ml samples and standards, two wells each. The glass plates were covered and incubated overnight (24 h) at 37°C, under 5% CO₂. Duplicate zone inhibition diameters were averaged and compared with a series of standards. Standard curves were made with known quantities of free tobramycin added to homogenized lungs or kidneys or sera of normal rats depending on the sample to be assayed. The concentrations of unknown samples (serum, lung, and kidney homogenates) were obtained by extrapolation from the zones of inhibition of standards. Linear regression analysis of standard calibration

TABLE 1. Comparative concentrations of free and liposome-encapsulated tobramycin in lungs of uninfected and infected rats with *P. aeruginosa* in the lungs^a

Time (h)	Concn ($\mu\text{g}/\text{pair of lungs}$)			
	Infected		Uninfected	
	Free tobramycin	Liposomes	Free tobramycin	Liposomes
0.25	64.02 \pm 14.53 ^b	40.16 \pm 2.84	35.5 \pm 18.4 ^c	91.08 \pm 15.85 ^{d,e}
1	<3.75	37.43 \pm 21.81	84.4 \pm 22.4	103.67 \pm 18.54 ^d
2	<3.75	23.7 \pm 17.43	18.27 \pm 7.98	83.72 \pm 5.06 ^d
3	<3.75	17.48 \pm 8.74	<3.75	85.04 \pm 16.33 ^d
4	<3.75	39.04 \pm 2.71	<3.75	85.72 \pm 5.2 ^d
6	<3.75	33.58 \pm 3.57	<3.75	90.68 \pm 14.43 ^d
16	<3.75	38.54 \pm 25.03	<3.75	69.2 \pm 13.0 ^d

^a Groups of at least three rats each were infected intratracheally with 10^8 CFU of *P. aeruginosa* PA 508 prepared in agar beads or left uninfected by receiving sterile agar beads. These animals were sacrificed at fixed time intervals after receiving intratracheally a single dose (300 μg) of free or liposomal forms of tobramycin. Lungs were removed and homogenized in PBS (20% [wt/vol]), and antibiotic contents were measured microbiologically and expressed in micrograms per pair of lungs. Values are means \pm standard errors of the mean obtained from three rats.

^b $P \leq 0.05$ when comparing infected groups (liposomes versus free tobramycin).

^c $P \leq 0.05$ when comparing free tobramycin (infected versus uninfected groups).

^d $P \leq 0.05$ when comparing liposomes (infected versus uninfected groups).

^e $P \leq 0.05$ when comparing uninfected groups (liposomes versus free tobramycin).

lines was obtained by plotting log tobramycin concentrations versus zone diameters of inhibition. The range of linearity for tobramycin was from 0.75 to 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Final tobramycin concentrations in lung, kidney, and serum tissues were calculated by applying an appropriate dilution correction factor to the measured sample concentrations. The tobramycin concentrations were expressed in micrograms per pair of lungs, micrograms per pair of kidneys, and, for the serum, micrograms per milliliter. The sensitivity of the assay was 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The lower limit of detection in the lung, kidney, and serum tissues was fivefold that value of 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, that is, 3.75 μg per organ (20% homogenates).

Data analysis. The pulmonary retention time of free and encapsulated tobramycin in the lungs was calculated as follows. Time zero corresponded to the end of the administered dose for each animal. Therefore, the pulmonary retention time of tobramycin in the lungs corresponds exactly to 0.25, 1, 2, 3, 4, 6, and 16 h after the end of the administration of antibiotic in each animal. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean obtained from at least three animals, and comparisons were made by paired Student's *t* test. A probability of 0.05 or less was considered significant.

RESULTS

One hundred thirty rats weighing 225 to 250 g were used in this study. The animals were divided into the following five groups: group 1 ($n = 30$), infected animals treated with free tobramycin; group 2 ($n = 30$), infected animals treated with liposome-encapsulated tobramycin; group 3 ($n = 30$), uninfected animals treated with free tobramycin; group 4 ($n = 30$), uninfected animals treated with liposome-encapsulated tobramycin; and group 5 ($n = 10$), untreated uninfected and infected animals. Uninfected animals received sterile agar beads instead of *P. aeruginosa* in agar beads. The first four groups were subdivided into seven subgroups corresponding to the time of sacrifice following the antibiotic instillation. In spite of the mortality observed in the different groups following anesthesia and/or infection, the number of animals was sufficient in order to maintain a minimal number of three animals in each subgroup.

A comparison of the concentration of tobramycin in the lungs (micrograms per pair of lungs) after intratracheal instil-

lation of the free and liposome-encapsulated form in uninfected rats is given in Table 1. Table 1 indicates that significant levels of tobramycin were achieved in the lungs 15 min after instillation of liposome-encapsulated tobramycin and then remained nearly constant over the 16-h period of the study (103.67 \pm 18.54 to 69.2 \pm 13.0 μg per pair of lungs). In contrast, the concentration of the free tobramycin, 15 min after instillation, was 4.5 times lower than that of encapsulated tobramycin and was cleared within 3 h following administration.

In the infected groups (Table 1), lung antibiotic concentration 15 min after instillation of the free drug was significantly higher ($P \leq 0.05$) compared with the liposome-encapsulated tobramycin group (64.02 \pm 14.53 to 40.16 \pm 2.84 μg per pair of lungs). However, no tobramycin was detected 1 h after the administration of its free form. Meanwhile, tobramycin administered in its encapsulated form remained nearly constant in lungs over the 16-h period of the study following its administration.

When we compare the concentrations and the pulmonary retention times of tobramycin in uninfected and infected groups, it clearly shows that pulmonary infection has a significant lowering influence. The mean value of tobramycin level following the administration of the encapsulated drug was 87.00 μg per pair of lungs in uninfected rats compared with 32.84 μg per pair of lungs in infected animals, and the pulmonary retention time of the free drug was 2 h in uninfected rats and only 15 min in infected rats (Table 1).

No antibiotic was found in the kidneys in any of the animal groups. No antibiotic was detected in the serum of animals treated with liposome-encapsulated tobramycin. Nevertheless, traces of tobramycin inferior to the threshold of quantitative sensitivity of our microbiological assay were detected in serum of uninfected groups treated with free tobramycin at 15 min, 1 h, and 2 h after instillations.

Bacterial colony counts performed in lungs of about 30% of infected rats showed that infections were maintained in all animals tested. Regardless of whether free or liposomal tobramycin was given, we observed similar bacterial counts at each time point as shown in Table 2.

DISCUSSION

Many workers have previously described intratracheal administration of liposome-encapsulated drugs such as atropine

TABLE 2. Lung bacterial counts following intratracheal administration of free or liposome-encapsulated tobramycin in rats pulmonarily infected with *P. aeruginosa*^a

Time (h)	Lung bacterial counts (log CFU/pair of lungs) ^b	
	Free tobramycin	Liposomes
0.25	4.43 (1)	5.28 (2)
1	4.79 (2)	5.33 (2)
2	5.27 (1)	5.18 (1)
3	5.44 (2)	5.63 (2)
4	5.68 (2)	5.26 (2)
16	5.32 (2)	5.17 (2)

^a Twenty-two rats infected intratracheally with 10⁸ CFU of *P. aeruginosa* PA 508 were sacrificed at fixed time intervals after receiving intratracheally a single dose (300 µg) of free or liposomal tobramycin. Lungs were removed aseptically and homogenized in cold PBS (20% [wt/vol]). Serial 10-fold dilutions of the homogenates in cold PBS were made, and 0.1 ml of each dilution was pipetted and spread on cetrimide agar. CFU were counted after 24 h of incubation at 37°C under 5% CO₂.

^b Numbers in parentheses indicate the number of animals used for the determination of bacterial counts.

(30), gentamicin (15), insulin (26), and catalase (32) into the lungs of rodents and rabbits. This approach fulfills three therapeutically desirable goals in cases of lower respiratory tract infection: (i) direct targeting of the drug where it is most needed; (ii) ensuring a prolonged residence time of the drug through its slow and sustained release from liposomes; and (iii) the possibility of increasing antibiotic regimens with minimal or complete absence of toxicity.

Taking into consideration the accelerated elimination of antibiotics in CF patients (21), the poor antibiotic penetration of endobronchial secretions in conventional antibiotic therapy, the need to administer large intravenous doses with risk for nephrotoxic and ototoxic effects (1, 13), and the characteristics of *P. aeruginosa* pulmonary infection in CF (18), we hypothesized that in situ administration of encapsulated antibiotics was a promising alternative for the treatment of chronic *P. aeruginosa* pulmonary infections in CF.

To evaluate the pertinence of our hypothesis, we developed an animal model to compare the pulmonary retention times of free and liposomal tobramycin formulations administered in situ. The possible influence of pulmonary infection on tissue retention of liposome-encapsulated tobramycin was also examined.

Our results show that intratracheal administration of liposome-encapsulated tobramycin compared with that of free tobramycin resulted in a prolonged pulmonary retention time (15 min versus a minimal duration of 960 min) of the active antibiotic within the lungs of infected rats (Table 1); the measured antibiotic was still active, since it was detected by a microbiological assay (Table 1). The prolonged pulmonary retention time observed for encapsulated tobramycin is consistent with other studies that have demonstrated that liposome encapsulation of drugs markedly increased their residence times in the lungs after intratracheal instillation or aerosolization compared with that of the free drugs (16, 22, 23).

As a whole, the pulmonary retention time of the encapsulated form of tobramycin in lungs was apparently not shortened by the presence of infection; nevertheless, the infection significantly reduced the quantity of antibiotic detected in lungs. This may be explained in terms of enhanced passage of the antibiotics across the inflamed tissues due to vasodilation and increased vascular permeability, which are often associated with bacterially infected lung tissues (9, 34, 42). Other

factors, such as the inactivation of liberated tobramycin in situ by polymorphonuclear leukocytes, nucleic acids from purulent exudates (10), and decreased endobronchial pH, might also have played a role in this phenomenon (11).

In normal animals, it is not clear whether the liposomes are taken up by the lung tissue or whether the vesicles remain in the air spaces. It has been shown that the lipid composition of the carrier vesicle is an important determinant of the interaction of liposomes with cells and the rate of release of the entrapped agent (3, 35, 40). Recent work has shown that intratracheally instilled liposomes were largely cleared from cell-free bronchoalveolar lavage by 24 h and became associated with lung tissue (23); 16 to 35% of the administered drug was transported to pulmonary tissues within 72 h. Depending on the phospholipids used, extracellular release may play an important role in liposome-mediated drug delivery. Liposomes may also have been engulfed by alveolar macrophages, but the extent of phagocytosis by alveolar macrophages depends on the lipid composition of the liposomes and remains controversial. In a study following the intratracheal injection of the radiolabeled liposome dipalmitoyl phosphatidylcholine in the rabbit lung, it has been shown that >65% of the cell-associated radiolabeled dipalmitoyl phosphatidylcholines were recovered in type II pneumocytes, while the total contribution of alveolar macrophages to the dipalmitoyl phosphatidylcholine overall clearance was approximately 20% (36).

The very rapid elimination of free tobramycin in the infected rats in comparison with that in uninfected animals may also be explained in the same way as that for the encapsulated form of the drug; moreover, it seems that the residence time of tobramycin in lungs of rats is short, since its half-life has been reported to be 30 to 35 min (27).

We did not detect tobramycin in kidneys at any time, but when measuring tobramycin in sera, we found traces of this antibiotic in uninfected rats up to 2 h following administration of a single dose (300 µg) of free tobramycin. This phenomenon was not observed with the liposomal forms of tobramycin and may be an indication of their reduced systemic absorption and toxicity, which were well demonstrated in another study (15).

Animals treated with liposomes containing tobramycin remained infected despite the maintenance of about 35 µg of tobramycin in lungs of animals. This may be explained by different factors. (i) The lipid composition of the liposomes was principally composed of distearyl phosphatidylcholine with a phase transition temperature of 55°C; consequently, it is possible that the high stability of the vesicles did not allow the liberation, at the same time, of a quantity of tobramycin sufficient to kill bacteria. (ii) To induce chronic pulmonary infection in rats, bacteria were administered in agar beads: it is possible that only one injection of a small volume of 100 µl did not allow the liposome preparation to penetrate with sufficient efficacy the agar bead barrier protecting bacteria. (iii) Also, one part of the injection may have been retained in the bronchial tree.

In conclusion, these data suggest that tobramycin incorporated into liposomes and administered directly into the lung remains at the site of initial application, resulting in high local concentrations. This form of antibiotic therapy may be attractive for treatment with single daily dose and for infection that requires prolonged multiple-daily-dose therapy. Further studies that examine the therapeutic value of liposome-encapsulated drugs in the management of experimental pseudomonal pneumonia in animals are in progress.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to D. E. Woods (Department of Microbiology, University of Calgary) for his generous help and advice with regard to the animal model.

This study was partially supported by a grant from Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Abramowsky, C. R., and G. L. Swinehart. 1982. The nephrotoxicity of cystic fibrosis. A human model of chronic nephrotoxicity. *Hum. Pathol.* 13:934-939.
- Alexander, M. R., E. M. Berglund, J. E. Kasik, A. Fox, and W. M. Chinn. 1979. The concentration of tobramycin in bronchial secretions. *Chest* 75:675-678.
- Allen, T. M., G. A. Austin, A. Cohen, L. Lin, and K. C. Lee. 1991. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim. Biophys. Acta* 1061:56-64.
- Angus, B. L., A. M. Carey, D. A. Caron, A. M. B. Kropinski, and R. E. W. Hancock. 1982. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-susceptible mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21:299-309.
- Barends, D. M., J. S. F. Van Der Sandt, and A. Hulshoff. 1980. Microdetermination of gentamycin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* 182:201-210.
- Barends, D. M., C. L. Zwaan, and A. Hulshoff. 1981. Microdetermination of tobramycin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* 225:417-426.
- Barends, D. M., C. L. Zwaan, and A. Hulshoff. 1981. Improved microdetermination of gentamycin and sisomicin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* 222:316-323.
- Beaudry, P. H., M. I. Marks, D. McDougall, K. Desmond, and R. Rangel. 1980. Is anti-*Pseudomonas* therapy warranted in acute respiratory exacerbations in children with cystic fibrosis? *J. Pediatr.* 97:144-147.
- Bergeron, M. G. 1986. Tissue penetration of antibiotics. *Clin. Biochem.* 19:90-100.
- Bergogne-Berezin, E. 1988. Pharmacokinetics of antibiotics in respiratory secretions, p. 608-631. In J. E. Pennington (ed.), *Respiratory infections: diagnosis and management*, 2nd ed. Raven Press, New York.
- Bodem, C. R., L. M. Lampton, D. P. Miller, E. F. Tarka, and E. D. Everett. 1983. Endobronchial pH. Relevance of aminoglycoside activity in gram negative bacillary pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:39-41.
- Brown, R. B., J. A. Kruse, G. W. Counts, J. A. Russell, N. V. Christou, M. L. Sands, and the Endotracheal Tobramycin Study Group. 1990. Double-blind study of endotracheal tobramycin in the treatment of gram-negative bacterial pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:269-272.
- Brummett, R. E. 1980. Drug-induced ototoxicity. *Drugs* 19:412-428.
- Cash, H. A., D. E. Woods, B. McCullough, W. G. Johanson, Jr., and J. A. Bass. 1979. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119:453-459.
- Demayer, P., E. M. Akodad, E. Gravet, P. Schietecat, J. P. Van Vooren, A. Drowart, J. C. Yernault, and F. J. Legros. 1993. Disposition of liposomal gentamycin following intrabronchial administration in rabbits. *J. Microencapsulation* 10:77-78.
- Di Rocco, P. H., M. C. Nacucchio, D. O. Sordelli, F. Mancuso, and A. M. Hooke. 1992. The effect of liposomal cefoperazone against *Pseudomonas aeruginosa* in a granulocytopenic mouse model of acute lung infection. *Infection* 20:360-364.
- Franklin, T. J. 1992. Bacterial resistance to antibiotics, p. 208-230. In W. B. Hugo and A. D. Russell (ed.), *Pharmaceutical microbiology*, 5th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Govan, J. R., and J. W. Nelson. 1993. Microbiology of cystic fibrosis lung infections: themes and issues. *J. R. Soc. Med.* 86(Suppl. 20):11-18.
- Govan, J. R. W., and G. S. Harris. 1986. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiol. Sci.* 3:302-308.
- Hoiby, N. 1977. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. C* 262:1-96.
- Hustabarat, R. M., J. D. Unadkat, P. Kushmerick, M. L. Aitken, J. T. Slattery, and A. L. Smith. 1991. Disposition of drugs in cystic fibrosis. III. Acetaminophen. *Clin. Pharmacol. Ther.* 50:695-701.
- Juliano, R. L., and H. N. McCullough. 1980. Controlled delivery of an antitumor drug: localized action of liposome-encapsulated cytosine arabinoside administered via the respiratory system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214:381-387.
- Jurima-Romet, M., and P. M. Shek. 1991. Lung uptake of liposome-entrapped glutathione after intratracheal administration. *J. Pharm. Pharmacol.* 43:6-10.
- Lagacé, J., M. Dubreuil, and S. Montplaisir. 1991. Liposome-encapsulated antibiotics: preparation, drug release and antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microencapsulation* 8:53-61.
- Lam, J., R. Chan, K. Lam, and J. W. Costerton. 1980. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 28:546-556.
- Liu, F. Y., Z. Shao, D. Kildsig, and A. K. Mitra. 1993. Pulmonary delivery of free and liposomal insulin. *Pharm. Res.* 10:228-232.
- Luft, F. C., and S. A. Kleit. 1974. Renal parenchymal accumulation of aminoglycoside antibiotics in rats. *J. Infect. Dis.* 130:656-659.
- Lyon, M. D., K. R. Smith, M. S. Saag, G. A. Cloud, and C. G. Cobbs. 1986. In vitro activity of piperacillin, ticarcillin, and mezlocillin alone and in combination with aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:25-30.
- Marks, M. I. 1980. The pathogenesis and treatment of pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 98:173-179.
- Meisner, D., J. Pringle, and M. Mezei. 1989. Liposomal pulmonary drug delivery. I. In vivo disposition of atropine base in solution and liposomal form following endotracheal instillation to the rabbit lung. *J. Microencapsulation* 6:379-387.
- Nacucchio, M. C., M. J. Gatto Bellora, D. O. Sordelli, and M. D'Aquino. 1988. Enhanced liposome-mediated antibacterial activity of piperacillin and gentamicin against gram-negative bacilli *in vitro*. *J. Microencapsulation* 5:303-309.
- Padmanabhan, R. V., R. Gudapaty, I. E. Liener, B. A. Schwartz, and J. R. Hoidal. 1985. Protection against pulmonary oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase or catalase. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132:164-167.
- Pedersen, S. S., C. Koch, N. Hoiby, and K. Rosendal. 1986. An epidemiologic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. *J. Antimicrob. Chemother.* 17:505-516.
- Pennington, J. E. 1981. Penetration of antibiotics into respiratory secretions. *Rev. Infect. Dis.* 3:67-73.
- Poste, G., and D. Papahadjopoulos. 1978. The influence of vesicle membrane properties on the interaction of lipid vesicles with cultured cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 78:164-184.
- Rider, E. D., M. Ikegami, and A. H. Jobe. 1992. Localization of alveolar surfactant clearance in rabbit lung cells. *Am. J. Physiol.* 263(Lung Cell. Mol. Physiol. 8):L201-L209.
- Sekeri-Pataryas, K. H., C. Vakirtzi-Lemonias, H. A. Pataryas, and J. N. Legakis. 1985. Liposomes as carriers of ¹⁴C-labelled penicillin and ¹²⁵I-labelled albumin through the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Biol. Macromol.* 7:379-381.
- Siegenthaler, W. E., A. Bonetti, and R. Luthy. 1986. Aminoglycoside antibiotics in infectious diseases: an overview. *Am. J. Med.* 80(Suppl. 6B):2-14.
- Smith, B. R., and J. L. LeFrock. 1983. Bronchial tree penetration of antibiotics. *Chest* 83:904-908.
- Szoka, F., and D. Papahadjopoulos. 1980. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467-508.
- Thys, J. P., and J. Klustersky. 1988. Local antibiotic therapy for

- bronchopulmonary infections, p. 632-647. In J. E. Pennington (ed.), Respiratory infections: diagnosis and management. Raven Press, New York.
42. Valcke, Y., R. Pauwels, and M. Vander Straeten. 1990. The penetration of aminoglycosides into the alveolar lining fluid of rats. The effect of airway inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**:1099-1103.
43. Valcke, Y. J., and R. A. Pauwels. 1991. Pharmacokinetic evaluation of tobramycin in the alveolar lining fluid of the rat after endotracheal administration. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**:1199-1201.
44. Willmott, R. W., S. L. Tyson, and D. J. Matthews. 1985. Cystic fibrosis survival rates. The influences of allergy and *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Dis. Child.* **39**:669-671.
45. Wood, R. E., T. F. Boat, and C. F. Doershuk. 1976. Cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **113**:833-878.
46. Yoshimura, F., and H. Nikaido. 1982. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J. Bacteriol.* **152**:636-642.

