

Université de Montréal

Études des mécanismes d'action et des propriétés biologiques et physico-chimiques
des FluidosomesTM

Par

Sébastien Sachetelli

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Microbiologie et Immunologie

Mars, 1999

©Sébastien Sachetelli, 1999



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:
Études des mécanismes d'action et des propriétés biologiques et physico-chimiques
des FluidosomesTM

Présenté par
Sébastien Sachetelli

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury :	Dr Patrick C. Hallenbeck
Membre du jury:	Dr. Josée Harel
Examineur externe:	Dr. Hélène-Marië Thérien
Directrice de recherche:	Dr. Jacqueline Lagacé

Thèse acceptée le:

99.06.07

Sommaire

Les liposomes sont des vésicules lipidiques utilisées principalement comme véhicule pour différents agents thérapeutiques. On utilise notamment les liposomes dans le traitement des infections fongiques, des infections dues à des pathogènes intracellulaires et à des infections causées par des protozoaires. Les liposomes confèrent des avantages qui surpassent dans la plupart des cas l'action de l'agent à l'état libre. Il peut donc être avantageux d'utiliser les liposomes dans le cas d'infections difficiles à traiter par les méthodes conventionnelles. Par exemple, les problèmes d'infections chroniques, de résistance aux antibiotiques, ou encore de toxicités médicamenteuses constituent des indications pour ce type de thérapie.

Notre équipe s'intéresse depuis 1986 au problème des infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de fibrose kystique. En raison de la difficulté à combattre ce type d'infection, notre équipe a retenu les liposomes comme moyen potentiel susceptible d'accroître le passage des antibiotiques à travers la paroi bactérienne des bactéries résistantes aux antibiotiques. Après quelques années de recherche, une formulation liposomale fluide, appelée FluidosomesTM, a démontré sa capacité de faciliter le passage des antibiotiques à travers la paroi bactérienne. Cette formulation liposomale, caractérisée par sa fluidité, a démontré lors de tests *in vitro* et *in vivo* une efficacité bactéricide fortement amplifiée contre *Pseudomonas aeruginosa* et les autres bactéries testées comparativement à l'antibiotique libre.

Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour but d'élucider le ou les mécanisme(s) d'action des FluidosomesTM ainsi que leurs propriétés biologiques et physico-chimiques. Des études de microscopie électronique et de cytométrie en flux ont été réalisées pour tenter de comprendre les mécanismes d'interaction entre la paroi bactérienne et les FluidosomesTM. Les résultats suggèrent fortement que les FluidosomeTM fusionnent avec la bactérie, permettant ainsi l'augmentation de la pénétration de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie. Une autre partie du projet

consistait à évaluer l'immunogénicité des FluidosomesTM aux niveaux systémique et pulmonaire ainsi que leurs effets sur les macrophages. Les résultats ont démontré que les FluidosomesTM n'entraînent pas la production de quantités significatives d'anticorps contre les phospholipides et contre l'antibiotique encapsulé. Les FluidosomesTM n'entraînent pas non plus une baisse significative de la phagocytose lorsqu'utilisés à des concentrations conformes aux normes prévues. Un test ELISA utilisant l'Alcian bleu, a également été mis au point comme nouvelle méthode pour quantifier les aminoglycosides. Cet ELISA permet la détection de quantités de tobramycine aussi faibles que 0.025 µg/ml avec une fiabilité qui est comparable à la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

En collaboration avec un étudiant de l'équipe, l'efficacité *in vitro* et *in vivo* des FluidosomesTM sous forme de poudre sèche a été évaluée conformément aux travaux réalisés précédemment avec la forme liquide des FluidosomesTM. Ces derniers travaux ont démontré que les FluidosomesTM utilisés sous forme de poudre conservent leur pouvoir bactéricide accru contre les bactéries gram-négatives.

Finalement, des études physico-chimiques effectuées à l'aide de tests d'affinité et de la spectrométrie infrarouge ont été effectuées pour évaluer les interactions tobramycine- phospholipides des FluidosomesTM. Les tests d'affinité démontrent que la tobramycine interagit avec les phospholipides par des liens électrostatiques puisqu'elle a une affinité uniquement avec le phospholipide chargé négativement et non avec le phospholipide neutre des FluidosomesTM. Les études d'infrarouge ont permis de déterminer que cette interaction électrostatique s'effectuait au niveau des têtes polaires des phospholipides formant les FluidosomesTM. Cette interaction cause une déshydratation des lipides à l'interface, sans toutefois avoir une influence sur les chaînes acyles des phospholipides et par conséquent, leurs propriétés physico-chimiques.

Le traitement des infections bactériennes est un problème sans cesse grandissant. L'utilisation de liposomes fluides pour le traitement d'infections

persistantes ou difficiles à traiter pourrait être une solution à ce problème. Les FluidosomesTM possèdent une activité bactéricide unique contre des souches de bactéries très résistantes et peuvent être utilisés avec différentes drogues. Le présent travail suggère fortement qu'un mécanisme de fusion avec la paroi bactérienne est responsable de l'effet bactéricide supérieur observé avec les FluidosomesTM. La démonstration est d'autant plus frappante qu'elle a été effectuée avec *P. aeruginosa*, une bactérie qui possède une imperméabilité membranaire des plus marquée face aux antibiotiques. Les FluidosomesTM apparaissent donc comme un outil des plus prometteurs pour le traitement des infections résistantes aux antibiothérapies conventionnelles.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xvi
Dédicace	xvii
Remerciements	xviii
CHAPITRE 1- Revue de la littérature.....	1
1.1 Les liposomes.....	1
1.1.1 Historique	1
1.1.2 Propriétés des liposomes	2
1.1.2.1 Types	2
1.1.2.2 Raisons d'utilisation.....	2
1.1.2.3 Propriétés physico-chimiques	3
1.1.3 Les différents modes d'interaction des liposomes.....	7
1.1.3.1 Les interactions liposomes- bactéries.....	7
1.1.3.2 Les interactions liposomes- cellules eucaryotes.....	9
1.1.3.3 Les liposomes et le système immunitaire.....	11
1.1.4 La problématique de la résistance aux antibiotiques	15
1.2 Les FluidosomesTM.....	22
1.2.1 Caractéristiques	22
1.2.2 Bactéricidie <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	23
1.3 La pharmacologie et les propriétés physico-chimiques des FluidosomesTM.....	23
1.3.1 La tobramycine et son mécanisme d'action.....	23
1.3.2 Les méthodes de dosage de la tobramycine.....	24
1.3.3 Administration des Fluidosomes TM sous forme de poudre.....	25

1.3.4 L'étude des interactions entre les phospholipides des Fluidosomes™ et différents agents thérapeutiques.....	26
1.3.5 La spectrométrie infrarouge.....	28
1.4 Objectifs du présent travail et stratégie expérimentale	30
CHAPITRE 2- ARTICLE.....	33
Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells.....	33
Abstract.....	35
Introduction.....	36
Materials and Methods	37
Results	40
Discussion.....	42
Acknowledgements.....	47
References.....	47
CHAPITRE 3-ARTICLE.....	53
Evaluation of the pulmonary and systemic immunogenicity of Fluidosomes™, a liposomal-tobramycin formulation for the treatment of bacterial infections.....	53
Abstract.....	55
Introduction.....	56
Materials and Methods	57
Results	60
Discussion.....	61
Acknowledgment.....	63
References.....	63

CHAPITRE 4- ARTICLE.....	68
Aminoglycoside detection using a universal ELISA binding procedure onto polystyrene microtitre plates in comparison with HPLC analysis and microbiological agar-diffusion assay	68
Abstract.....	69
Introduction.....	69
Materials and Methods	70
Results	72
Discussion.....	73
Acknowledgements.....	74
References.....	74
CHAPITRE 5-ARTICLE.....	76
In vitro bactericidal evaluation of low phase transition temperature liposomal tobramycin formulation as a dry powder preparation against gram negative and gram positive bacteria	76
Abstract.....	78
Introduction.....	79
Materials and Methods	80
Results	83
Discussion.....	84
Acknowledgement	87
References.....	87

CHAPITRE 6-ARTICLE.....	97
Aerosolization of low phase transition temperature liposomal tobramycin as a dry powder in an animal model of chronic pulmonary infection caused by <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97
Abstract.....	99
Introduction.....	100
Materials and Methods	102
Results	106
Discussion.....	107
Acknowledgements.....	109
References.....	109
 CHAPITRE 7- DISCUSSION	 116
7.1 Interaction des Fluidosomes TM avec <i>P. aeruginosa</i>	117
7.2 L'immunogénicité des Fluidosomes TM	123
7.3 Développement d'un nouvel ELISA utilisant l'Alcian bleu pour la quantification de la tobramycine.....	124
7.4 L'efficacité bactéricide <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des Fluidosomes TM sous forme de poudre	126
7.5 L'interaction de la tobramycine avec les phospholipides des Fluidosomes TM	129
7.5.1 Expériences d'affinité.....	129
7.5.2 Études de spectrométrie infrarouge	130
 Bibliographie.....	 134

ANNEXE I- ARTICLE	xix
In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against Gram-negative and Gram-positive bacteria.....	xix
ANNEXE II- L'interaction de la tobramycine avec les phospholipides des FluidosomesTM	xxvii
2.1 Méthodologie et Résultats	xxvii
2.1.1 Expériences d'affinité.....	xxvii
2.1.2 Études de spectrométrie infrarouge	xxix

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 3:

Table I. Identification of the different groups of mice submitted to intra-tracheal and intra-peritoneal immunizations	65
Table II. Mouse sera tested by ELISA to detect antibodies against Fluidosomes TM and tobramycin following 6 intra-peritoneal immunizations	66
Table III. Mouse sera tested by ELISA to detect antibodies against Fluidosomes TM and tobramycin following 3 intra-tracheal immunizations	67

CHAPITRE 4:

Table I. Intra-assay variations of tobramycin standard curves using different concentrations of Alcian blue for pretreatment	71
Table II. Inter-assay variations of tobramycin standard curves using different concentrations of Alcian blue for pretreatment	72
Table III. Evaluation of cross reactivity of aminoglycoside analogs with the anti-tobramycin antibodies	73

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1:

- Figure 1. Transition de phase liquide à la phase solide et vice-versa 5
- Figure 2. Illustration simplifiée du mécanisme proposé du pouvoir adjuvant des liposomes 12
- Figure 3. Mécanisme d'action proposé pour la pénétration des aminoglycosides 18
- Figure 4. Modèle de pompe à reflux chez les bactéries gram-négative comme *P. aeruginosa* 19
- Figure 5. Structure moléculaire de la tobramycine 27
- Figure 6. Spectre atténué de DPPC 29

CHAPITRE 2:

- Figure 1. Detection of tobramycin inside bacterial cells by immunogold labeling. 50
(A) *Pseudomonas aeruginosa* 429 incubated six hours with Fluidosomes™
(B) *Pseudomonas aeruginosa* 429 incubated six hours with free tobramycin.
- Figure 2. Interaction of Fluidosomes™ with *Pseudomonas aeruginosa* 429 cells as observed by negative staining with PTA. 51

Figure 3. Flow cytometry histograms of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains ATCC 25619 (A) and 429 (B) incubated with Fluidosomes TM .	52
--	----

CHAPITRE 4:

Figure 1. Quantification of tobramycin unknowns by ELISA, HPLC and microbiological agar-diffusion assay.	73
--	----

CHAPITRE 5:

Figure 1. Killing curves of bacteria exposed to sub-MIC of free and encapsulated tobramycin respectively for : a) <i>P. aeruginosa</i> , 30 µg/ml ; b) <i>S. maltophilia</i> , 1 µg/ml ;c) <i>B. cepacia</i> , 3 µg/ml ; d) <i>E. coli</i> , 1.50 µg/ml and e) <i>S. aureus</i> , 1 µg/ml.	91
--	----

Figure 1a.	92
Figure 1b.	93
Figure 1c.	94
Figure 1d.	95
Figure 1e.	96

CHAPITRE 6:

Figure 1. CFU counts of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> # 508 in a rat model of pulmonary infection treated with 600 µg of free tobramycin or Fluidosomes TM - tobramycin in dry powder form.	114
--	-----

Figure 2. Tobramycin quantification in μg per pair of lungs and kidneys 115
following intratracheal administration of a 600 μg dose of free
tobramycin or FluidosomesTM- tobramycin in dry powder form.

ANNEXE 1:

Figure 1. Investigation of the stability of fluid liposomes containing antibiotic xxii
(888 μg) still encapsulated after incubation at 4°C, room temperature, or 37°C.
Antibiotic discharge from liposomes at 4°C, room temperature, or 37°C.

Figure 2. Killing curves of bacteria exposed to sub-MIC of free and xxiv
encapsulated tobramycin respectively for (a) *P. aeruginosa*, 30 and 29.4 mg/L,
(b) *S. maltophilia*, 1.00 and 1.00 mg/L, (c) *B. cepacia*, 3.00 and 2.95 mg/L, (d)
E. coli, 0.75 and 0.75 mg/L and (e) *S. aureus*, 1.57 and 1.55 mg/L

ANNEXE 2:

Figure 1. Interaction de la tobramycine avec le DPPC, FluidosomesTM xxviii
recettes 18-1 et 10-1 et le DMPG à un rapport molaire de 300 molécules de lipides
par molécule de tobramycine.

Figure 2. Spectres infrarouge de la région carbonyle du DMPG en phase gel xxx
(20 °C) et en phase fluide (50 °C) pour le lipide seul (traits pointillés) et
le lipide incubé avec de la tobramycine (traits pleins).

Figure 3. Spectres infrarouge de la région carbonyle du DPPC en phase gel xxxi
(20 °C) et en phase fluide (50 °C) pour le lipide seul (traits pointillés) et
le lipide incubé avec de la tobramycine (traits pleins).

Figure 4. Courbes de transition de phase du DMPG (carrés noirs) et du DMPG incubé avec de la tobramycine (cercles noirs).

xxxii

Figure 5. Courbes de transition de phase du DPPC (carrés noirs) et du DPPC incubé avec de la tobramycine (cercles noirs).

xxxiii

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å :	Angström
ADN :	acide déoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
CMI :	concentration minimale inhibitrice
DMPG :	dimiristoyl phosphatidylglycérol
DPM :	di-peptide muramyle
DPCC :	dipalmitoyl phosphatidylcholine
ELISA :	« enzyme linked immunosorbent assay »
HPLC :	chromatographie liquide à haute performance
IPS :	inhalateur de poudre sèche
LPS :	lipopolysaccharide
LUV :	« large unilamellar vesicles »
MLV:	« multilamellar vesicles »
nm :	nanomètre
PA :	acide phosphatidique
PBS :	tampon phosphate saline
PC :	phosphatidylcholine
PE :	phosphatidyléthanolamine
PG :	phosphatidylglycérol
PS :	phosphatidylsérine
RIA :	test immunologique radioactif
SPM :	système phagocytaire mononucléaire
SRE :	système réticulo-endothélial
SUV :	« small unilamellar vesicles »
T _C :	température de transition de phase
UFC :	unité formatrice de colonie
UV :	ultra-violet

À ma mère, Andrée, pour son support et son encouragement durant toutes ces années

REMERCIEMENTS

Les remerciements sont très peu de choses et ne peuvent réellement exprimer les sentiments que je ressens vis-à-vis des personnes qui m'ont appuyé tout au long de mon cheminement.

Au Dre Jacqueline Lagacé, j'exprime ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir consacré son temps, son soutien académique, matériel et moral au cours de la réalisation de mon travail. Elle a été pour moi une source constante de motivation et de stimulation intellectuelle dans la poursuite de mes études.

Je remercie également énormément M. Robert Alain de l'Institut Armand Frappier qui m'a initié aux différentes techniques de microscopie électronique et sans qui mon projet n'aurait pas été possible.

Je tiens à remercier également M. Serge Sénéchal pour ses judicieux conseils en matière de cytométrie et pour son implication dans mon projet.

Je voudrais également remercier le Dr. Christian Beaulac pour son aide et sa collaboration dans les divers projets sur lesquels nous avons travaillé ensemble.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire et plus particulièrement Mme Renée Riffon pour son aide technique précieuse. Je vous souhaite tous bonne chance dans vos carrières futures.

Je remercie également la fondation canadienne de la fibrose kystique d'avoir appuyée mes recherches et la faculté des études supérieures de m'avoir octroyé une bourse d'études durant une année.

Enfin, je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

CHAPITRE 1- Revue de la littérature

1.1 Les liposomes

1.1.1 Historique

Un liposome est une vésicule artificielle microscopique, à membrane lipidique, utilisé comme modèle d'étude des membranes biologiques et pour l'introduction de substances dans les cellules de l'organisme. Les liposomes ont été décrits pour la première fois en 1965 par A.D. Bangham et collaborateurs et furent initialement utilisés comme modèle pour l'étude des membranes biologiques. Au cours des trente dernières années, les liposomes ont été utilisés comme véhicules de transport (« drug delivery systems ») pour des agents thérapeutiques de toutes sortes. Les liposomes confèrent certains avantages par rapport à l'agent thérapeutique à l'état libre. Ils permettent une libération continue et prolongée de l'agent thérapeutique tout en ciblant l'agent à un site précis et en réduisant sa toxicité. Par exemple, l'encapsulation de l'amphotéricine B pour le traitement de l'aspergillose invasive chez les patients immunocompromis ou immunosupprimés, a augmenté drastiquement son efficacité, tout en diminuant sa toxicité (Strom et Crommelin, 1998; Strom et Van Etten, 1997). Les liposomes sont aussi utilisés expérimentalement dans des cas d'infections causées par des pathogènes intracellulaires et des cas d'infections suite à des brûlures de la peau (Majumdar *et al.*, 1992 ; Price *et al.*, 1992 ; Jones *et al.*, 1994 ; Onyeji *et al.*, 1994 ; Antos *et al.*, 1995 ; Sanderson et Jones, 1996). On utilise également les liposomes dans la thérapie génique ou pour la transfection de cellules lors de manipulations génétiques (Crystal *et al.*, 1994 ; Ledley, 1996; Griesenbach *et al.*, 1998).

1.1.2 Propriétés des liposomes

1.1.2.1 Types

Selon la méthode de fabrication utilisée, trois types de liposomes peuvent être obtenus : 1) des vésicules multilamellaires ou MLV (« multilamellar vesicles ») 2) des vésicules unilamellaires de grande taille ou LUV (« large unilamellar vesicles ») et 3) des vésicules unilamellaires de petite taille ou SUV (« small unilamellar vesicles »). Chacune de ces vésicules a des propriétés différentes. Les MLV peuvent être composées de plusieurs bicouches lipidiques organisées de façon concentrique. La taille des MLV est généralement comprise entre 100 nm et 1 µm et comporte cinq lamelles ou plus. La préparation de MLV est très simple et une multitude de composés peuvent y être encapsulés (Gregoriadis, 1976). Un grand désavantage des MLV est cependant leur petite capacité d'encapsulation (Betageri *et al.*, 1993a). Les LUV possèdent une haute capacité initiale d'encapsulation et ont un haut rapport de milieu aqueux par lipide (Betageri *et al.*, 1993a). En général, les LUV ont une taille supérieure à 100 nm. Les SUV sont des vésicules de très petite taille possédant un rayon minimal de 20 nm. L'avantage principal des SUV est qu'ils forment une petite population homogène de vésicules qui peuvent être facilement séparées des MLV contaminants (Barenholz *et al.*, 1977). Cependant, l'utilisation des SUV comme véhicule d'agent thérapeutique est limitée par leur faible taux d'encapsulation, leur bas rapport de volume capturé par mole de lipide et la possibilité d'une distribution hétérogène des lipides entre les feuillettes internes et externes de la monocouche (Betageri *et al.*, 1993a).

1.1.2.2 Raisons d'utilisation

Pour comprendre comment les liposomes peuvent être utilisés afin d'augmenter l'efficacité d'un agent encapsulé, il est important de comprendre les raisons élémentaires de l'utilisation de liposomes comme véhicules d'agents thérapeutiques. Il existe cinq grandes raisons : la direction, la durée, la protection, l'internalisation et l'amplification (Strom et Crommelin, 1998). La direction implique

le ciblage précis ou dirigé des liposomes au site d'action par des injections ou autres types administrations qui amèneront les liposomes au site d'intérêt, augmentant conséquemment leur efficacité thérapeutique. Les liposomes peuvent agir comme réservoir permettant à l'agent d'être libéré graduellement dans le temps afin de maintenir des niveaux thérapeutiques de la drogue dans le sang ou dans des tissus pendant une période prolongée. Les drogues qui sont encapsulées dans les liposomes sont protégées de l'action d'enzymes et d'autres facteurs du milieu externe présents chez l'hôte. D'un autre côté, le patient peut être protégé contre les effets néfastes de l'agent encapsulé.

Les liposomes peuvent interagir avec des cellules cibles (ex . : macrophages, cellules cancéreuses, cellules de Kuffer) d'une multitude de façons et, par conséquent, sont capables de promouvoir l'internalisation des drogues qui autrement n'ont pas accès au cytoplasme (Strom et Crommelin, 1998). Et finalement, l'effet d'amplification est surtout utilisé pour augmenter la réponse immunitaire contre une substance antigénique par l'entremise du liposome comme adjuvant en augmentant la prise en charge de la substance associée par les cellules de présentation.

Lors de la fabrication de liposomes, trois paramètres de base doivent être contrôlés à cause de leur impact majeur sur la longévité *in vitro* et sur les interactions des liposomes dans des systèmes biologiques ou autres : le diamètre des vésicules, leurs composition chimiques et leurs propriétés physico-chimiques (Abra et Hunt ; 1981 ; Strom et Crommelin, 1998). La taille des liposomes est déterminée par leur méthode de préparation, tandis que les propriétés physico-chimiques sont régies par le choix des phospholipides utilisés pour fabriquer les liposomes.

1.1.2.3 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques ont une incidence directe sur la pharmacocinétique des liposomes et leur comportement *in vitro* et *in vivo*. Il est donc important de bien connaître leurs effets pour développer une formulation qui possédera les qualités désirées. Les facteurs qui déterminent le comportement des

liposomes *in vitro* et *in vivo* sont la température de transition de phase, la fluidité, la charge, le pH, l'osmolarité et les interactions avec l'environnement (Strom et Crommelin, 1998 ; New, 1995). Tous ces facteurs découlent d'un facteur important, la composition chimique des liposomes. C'est la composition chimique des liposomes, et donc le choix des phospholipides utilisés pour les fabriquer, qui dictera les propriétés physico-chimiques de ceux-ci.

La température de transition de phase (T_C) des liposomes est particulièrement importante et elle est caractérisée par le changement de l'état gel à l'état cristallin de la ou des membranes liposomales (New, 1995). En phase gel, les phospholipides contenus dans les liposomes sont ordonnés et forment une structure rigide. Lorsque la température de transition est atteinte et dépassée, les phospholipides des liposomes deviennent plus désorganisés et par conséquent la ou les membranes sont plus fluides (Figure 1). En phase fluide, le contenu liposomal est libéré plus rapidement qu'en phase gel (Betageri *et al.*, 1993b). Conséquemment, la T_C a un rôle très important à jouer dans la libération du contenu liposomal *in vitro* et *in vivo*.

La fluidité de la membrane peut être contrôlée par l'ajout de cholestérol qui a pour effet d'augmenter ou diminuer la fluidité membranaire (New, 1995). Par exemple, plus on ajoute de cholestérol à une membrane fluide et plus celle-ci sera rigide. Ceci a donc un impact direct sur le relargage du contenu liposomal (Kirby *et al.*, 1980).

Les liposomes peuvent avoir une charge soit négative, neutre ou positive selon les phospholipides constituants. Des exemples de phospholipides chargés négativement sont le phosphatidylglycérol (PG) et la phosphatidylsérine (PS). La phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont des exemples de lipides neutres. Il n'existe cependant aucun phospholipide naturel chargé positivement.

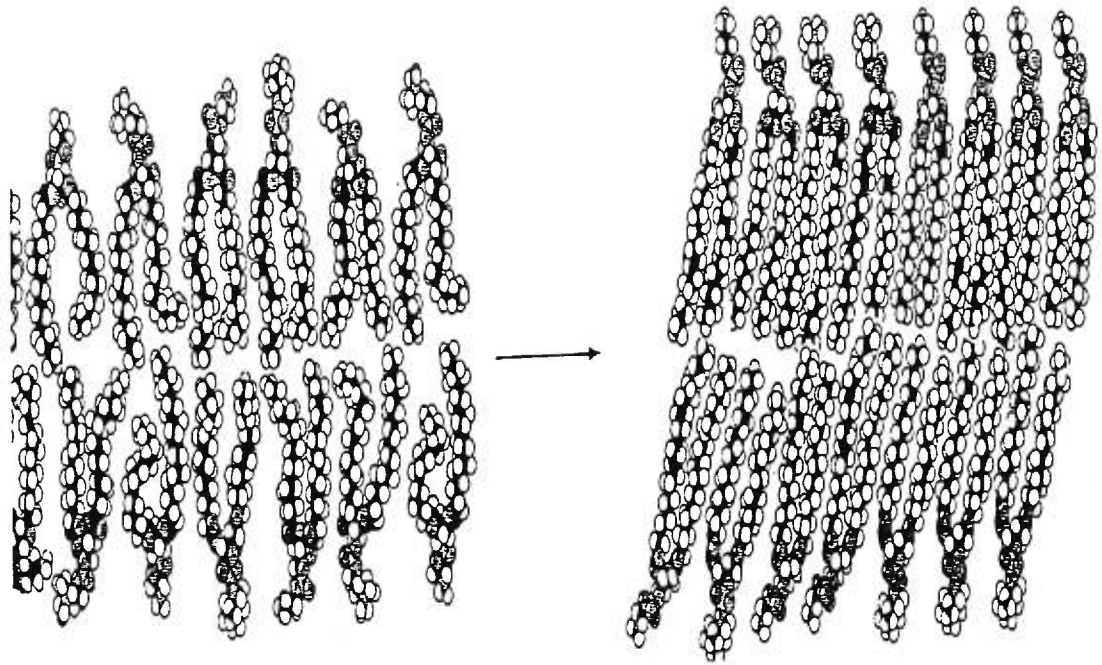


Figure 1. Transition de la phase liquide à la phase gel et vice-versa (Voet et Voet, 1990)

Néanmoins, des molécules amphiphiliques comme la stéarylamine ou le bromure de cétyle triméthyl ammonium peuvent être incorporées dans les liposomes pour leur donner une charge nette positive (New, 1995). La charge est un facteur important dans l'élaboration d'une formulation liposomale, car elle influence directement l'interaction des liposomes avec des membranes biologiques ou artificielles et avec l'agent thérapeutique encapsulé (New, 1995 ; Strom et Crommelin, 1998). Les lipides chargés incorporés dans des liposomes comportent différents avantages : 1) augmenter la densité de charges de surface de façon à prévenir l'agrégation et la fusion des liposomes ; 2) améliorer l'encapsulation d'un agent thérapeutique.

Le pH a une influence importante sur le comportement des liposomes. En effet, le pH influence l'ionisation des têtes polaires de lipides ionisables formant les liposomes. Aux pH extrêmes, on peut observer une instabilité membranaire qui peut se traduire par la fuite du contenu des liposomes, un phénomène de fusion ou la lyse des liposomes (New, 1995). On peut donc fabriquer des liposomes sensibles au pH en utilisant des phospholipides ionisables comme le PE. La sensibilité au pH a ses avantages et ses inconvénients. Des liposomes sensibles au pH sont souvent utilisés comme véhicules pour cibler le cytoplasme tandis que des liposomes résistants au pH sont utilisés pour cibler les lysosomes (Chu *et al.*, 1990).

L'osmolarité influence également les liposomes par rapport à leur contenu. Dépendamment de la pression osmotique, le contenu liposomal peut se désencapsuler ou s'encapsuler. Si un gradient de concentration est appliqué de l'extérieur vers l'intérieur, l'agent thérapeutique se dirigera vers l'intérieur et y restera (New, 1995). Cette situation est souvent observée lors de la fabrication des liposomes. Cependant, lors de l'administration des liposomes, soit *in vitro* ou *in vivo*, il est fréquent que le contenu liposomal diffuse vers l'extérieur et il faut donc prendre en considération l'osmolarité du milieu environnant lors de l'administration de liposomes pour éviter une désencapsulation prématurée.

Lors de la fabrication de liposomes comme véhicules d'agents thérapeutiques, il est donc critique de considérer tous les facteurs mentionnés ci-dessus pour obtenir l'effet désiré. Le facteur le plus critique demeure cependant les interactions *in vitro* et *in vivo* des liposomes avec différentes substances. Lorsqu'administrés *in vitro* ou *in vivo*, les liposomes vont interagir avec leur environnement et cette interaction est directement impliquée dans leur action thérapeutique. La façon dont ces interactions se dérouleront déterminera donc le comportement biologique des liposomes.

1.1.3 Les différents modes d'interaction des liposomes

1.1.3.1 Les interactions liposomes- bactéries

Plusieurs études ont été effectuées afin de développer une formulation liposomale efficace contre les infections bactériennes (Dees *et al.*, 1990; Majumbar *et al.*, 1992 ; Onyeji *et al.*, 1994 ; Antos *et al.*, 1995 ; Ravaoarinaro *et al.*, 1996). Ces études ont démontré que les liposomes étaient en général plus efficaces que l'agent bactéricide. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le mode d'action de ces liposomes. L'un d'eux est que l'antibiotique est dirigé directement à l'endroit où se trouvent les bactéries. Ceci a pour effet d'augmenter l'efficacité de l'antibiotique, puisqu'il a accès plus facilement à sa cible. Un autre mécanisme est que les liposomes interagissent directement avec la bactérie, résultant en un relargage du contenu aqueux des liposomes (Nicholov *et al.*, 1993 ; Antos *et al.*, 1996). Finalement, il peut y avoir de la reconnaissance spécifique de phospholipides par des récepteurs membranaires bactériens (New *et al.*, 1990). Les membranes liposomales peuvent également être considérées comme substrats pour des enzymes bactériennes comme la phospholipase C et l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* qui provoqueraient le relargage du contenu des liposomes (Antos *et al.*, 1996 ; Nordera *et al.*, 1997).

Il existe deux méthodes couramment utilisées pour étudier les interactions entre les liposomes et les cellules bactériennes: le marquage du milieu aqueux ou le

marquage des phospholipides des liposomes. Deux types de sondes sont utilisées pour marquer le milieu aqueux : 1) des sondes fluorescentes comme la carboxyfluorescéine et la calcéine et 2) des sondes radioactives comme l'inuline, la thymidine ou d'autres métabolites radioactifs (Sanderson *et al.*, 1996). Les sondes fluorescentes sont les plus fréquemment utilisées, car elles sont moins coûteuses, plus faciles à utiliser et sécuritaires par rapport aux sondes radioactives. D'un autre côté, les membranes des liposomes peuvent être marquées à l'aide de sondes radioactives ou fluorescentes. Les sondes radioactives sont souvent des phospholipides radioactifs incorporés dans un certain rapport aux liposomes lors de leur fabrication (Jones *et al.*, 1977a, b ; Fraley *et al.*, 1979 ; Nicolau *et al.*, 1982 ; Lelkes *et al.*, 1984 ; Tomlinson *et al.*, 1989 ; Sanderson *et al.*, 1996). Cependant, les sondes membranaires radioactives sont très coûteuses et c'est pourquoi les sondes fluorescentes sont de plus en plus utilisées.

Les sondes fluorescentes offrent plusieurs avantages face aux sondes radioactives : 1) elles peuvent être constituées de différents fluorophores, permettant une application diversifiée et 2) elles permettent de marquer les membranes avec une grande efficacité. La propriété commune aux différentes sondes est qu'elles sont toutes lipophiles à divers degrés. Elles s'insèrent donc dans la membrane, intercalées entre les phospholipides constituants. Des exemples de sondes fluorescentes sont le DiI (1,1' - dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate), le PKH[®], les BODIPY[®] et les rhodamines. Les sondes fluorescentes sont d'excellents indicateurs de fusion membranaire. Parce qu'elles sont lipophiles, la majorité de ces sondes sont très instables en milieu aqueux. Par conséquent, la sonde est prisonnière de la membrane une fois incorporée à celle-ci et il n'y a donc pas de possibilité de perte ou de fuite comme avec les sondes de milieu aqueux. Toute fluorescence retrouvée dans la membrane cible est donc due à un transfert du marqueur de la membrane liposomale à la membrane cible. Plusieurs études de fusions membranaires bactériennes, artificielles, virales et eucaryote ont été effectuées avec ce type de sondes (Hoekstra *et al.*, 1984 ; Silviu *et al.*, 1987 ; Tomlinson *et al.*, 1989 ; Spötl *et al.*, 1995).

1.1.3.2 Les interactions liposomes- cellules eucaryotes

Les interactions liposomes-cellules eucaryotes ont été très bien étudiées au fil des ans. Ceci est probablement dû à l'application médicale des liposomes. Très tôt dans ces études, il a été observé que les liposomes étaient vite éliminés par les cellules phagocytaires suite à une injection parentérale (Bally *et al.*, 1990). Cette fonction est largement effectuée par les cellules composant le système phagocytique mononucléaire (SPM), localisé dans plusieurs tissus, notamment le foie et la rate. Ce système était originalement appelé système reticulo-endothélial (SRE). L'absorption et la phagocytose est le mécanisme d'élimination des liposomes le plus important tel que démontré dans des études *in vitro* (Straubiner *et al.*, 1983; Weinstein *et al.*, 1984; Chin *et al.*, 1989; Weiner, 1990).

Suite à une administration parentérale, les liposomes se retrouvent dilués dans les fluides biologiques comme le sang, la lymphe et le fluide extracellulaire (Gregoriadis, 1988 ; Woodle et Lasic, 1992) . Le sort des liposomes *in vivo* dépend surtout de leur mode d'administration et de leur composition (Woodle et Lasic, 1992). Généralement, les liposomes de grande taille et chargés négativement par l'ajout de PS, AP ou PG sont éliminés plus rapidement par la rate, la moëlle osseuse et les monocytes que les liposomes neutres ou chargés positivement (Allen *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1992 ; 1993). Le taux d'élimination semble être négatif > neutre > positif (Patel et Ryman, 1981). Ceci provient du fait que les charges de surface négatives des liposomes peuvent être reconnues par des récepteurs retrouvés sur une variété de cellules comme les macrophages (Allen *et al.*, 1988 ; 1990 ; 1991; Lee *et al.*, 1992). Dans le foie, le taux d'élimination est plus grand pour les liposomes neutres que pour les liposomes positifs ou négatifs, où il semble être égal (Hwang *et al.*, 1987). Dans les poumons, cette élimination préférentielle semble être pour les liposomes chargés positivement et négativement (Patel et Ryman, 1981 ; Kellaway et Farr, 1990). Même si les facteurs impliqués dans l'élimination des liposomes par différents types cellulaires ne sont pas encore connus, il semble que l'attachement des liposomes aux cellules soit une étape importante (Lee *et al.*, 1992).

Les liposomes peuvent être administrés de plusieurs façons. Dans ce travail, nous allons nous concentrer sur l'administration intra-péritonéale (i.p.) et pulmonaire des liposomes. Le destin des liposomes suite à une administration i.p. est contrôlé principalement par la taille de ceux-ci (Betageri *et al.*, 1993c). Les vésicules SUV passent rapidement par le système lymphatique pour être relâchées dans la circulation sanguine. Une fois dans le sang, elles sont sujettes à l'élimination par le SPM. Les vésicules MLV sont par contre trop grosses pour entrer dans le système lymphatique et sont conséquemment retenues dans la cavité péritonéale. En général, le pourcentage de l'agent retrouvé dans le SPM après injection i.p. est de 2 à 3 fois moindre que la même dose injectée de façon i.v. (Poste *et al.*, 1984). Le mécanisme exact d'élimination après une administration i.p. n'est pas encore compris (Patel *et al.*, 1981).

Au niveau pulmonaire, la grande surface des alvéoles pulmonaires combinée au bas niveau d'enzymes extracellulaires présentes dans les poumons, par rapport au système gastro-intestinal, en fait un organe de choix pour l'administration d'agents actifs systémiques. L'administration topique des liposomes, comme dans les poumons, est utilisée pour livrer directement ceux-ci à un site précis, sans les inconvénients d'une administration plus systémique. Ceci a donc pour conséquence d'augmenter la durée thérapeutique de l'agent administré, tout en réduisant ou éliminant les effets systémiques indésirables (Betageri *et al.*, 1993c). Pour administrer les liposomes au niveau pulmonaire, la nébulisation est utilisée. Lors de l'administration pulmonaire de liposomes, le dépôt et l'élimination des MLV et SUV semblent dépendre uniquement de la taille des gouttelettes d'aérosols générées, plutôt que de la taille des liposomes (Kellaway et Farr, 1990). Ceci est dû au fait que l'élimination des liposomes dans les poumons dépend de la distribution de l'aérosol à l'intérieur de l'arbre pulmonaire. Une fois les liposomes administrés dans les poumons, ceux-ci ne peuvent s'échapper du tissu pour accéder à la circulation puisque même le plus petit des liposomes ne peut passer au travers des fenestrations des capillaires du poumon (Betageri *et al.*, 1993d). Ces fenestrations ont une taille moyenne de 20-60 Å, tandis que le plus petit liposome fait 20 nm. Par conséquent, les

liposomes sont éliminés des poumons par phagocytose des macrophages alvéolaires (Gonzales-Rothi *et al.*, 1991) et des cellules alvéolaires de type I et II (Geiger *et al.*, 1975 ; Kellaway et Farr, 1990).

1.1.3.3 Les liposomes et le système immunitaire

Les liposomes peuvent interagir avec plusieurs types de cellules, dont les cellules du système immunitaire. En 1974, Allison et Gregoriadis démontrèrent que l'association d'une protéine avec les liposomes augmentait l'immunogénicité de la protéine. À partir de ce moment, l'utilisation de liposomes comme stimulant du système immunitaire pour des vaccins était une réalité (Gregoriadis, 1990a, 1990b). Une des premières observations de l'interaction des liposomes avec le système immunitaire est que, suite à une injection parentérale de liposomes, ceux-ci sont rapidement phagocytés par les macrophages du foie et de la rate (Hwang, 1987) . Des études *in vitro* ont démontré que les liposomes étaient phagocytés soit par une endocytose ne faisant pas appel à des récepteurs, par une phagocytose par l'entremise des récepteurs Fc ou par phagocytose impliquant ou non le complément (Wassef *et al.*, 1987). On sait également que les liposomes peuvent interagir avec les protéines du sérum et être opsonisés (Szenbeni *et al.*, 1998). Le caractère adjuvant des liposomes a été démontré au niveau de la production d'anticorps, de la prolifération des lymphocytes, de la lymphocytotoxicité, de la production de médiateurs solubles et de réponses auto-immunes induites chimiquement (Chen *et al.*, 1977 ; Dabrowski *et al.*, 1980 ; Philips *et al.*, 1987 ; Mansour *et al.*, 1988 ; Thérien et Shahum, 1988 ; Krzystyniak *et al.*, 1994).

Le principe physiologique du pouvoir adjuvant des liposomes pour les antigènes protéiques est basé sur le fait que les liposomes sont rapidement phagocytés par les macrophages. Puisque les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), l'antigène porté par les liposomes est plus facilement livré à ceux-ci, ce qui entraîne la présentation de l'antigène et une réponse immunitaire.

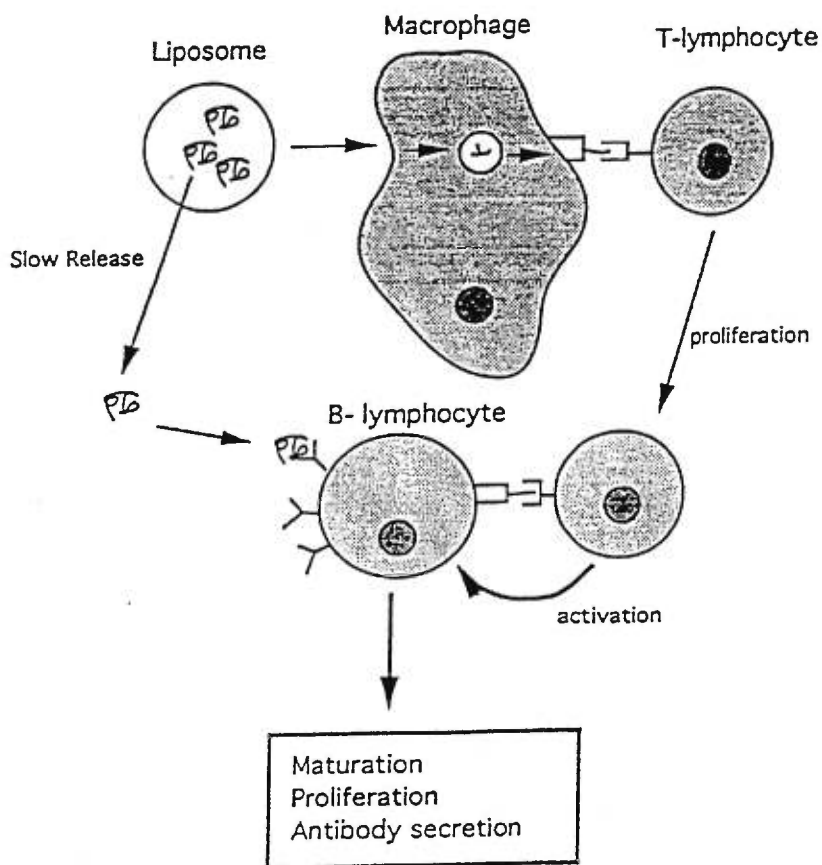


Figure 2. Illustration simplifiée du mécanisme proposé du pouvoir adjuvant des liposomes (Fried, 1994).

De nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les macrophages étaient les responsables du pouvoir immunogénique des liposomes (Figure 2) (Dal Monte *et al.*, 1989 ; Su *et al.*, 1989 ; Szoka, 1992; Van Rooijen, 1992).

Deux mécanismes de l'immunogénicité des liposomes sont proposés dans ces cas : un antigène soluble, transformé en antigène colloïdal soit par l'encapsulation ou par la liaison avec des liposomes, est plus efficacement pris en charge et traité par les macrophages que l'antigène libre. Ceci résulte dans le recrutement efficace des cellules T qui sont ensuite capables de stimuler les lymphocytes B à reconnaître l'antigène (Figure 2). Plusieurs études supportent cette hypothèse (Francis *et al.*, 1985; Gregoriadis *et al.*, 1987 ; Davis et Gregoriadis, 1989). L'effet adjuvant des liposomes peut également être augmenté par l'ajout d'immuno-modulateurs comme le lipide A, les lipopolysaccharides (LPS) ou le di-peptide muramyle (DPM) (Richards *et al.*, 1988 ; Phillips et Emili, 1992). Un autre mécanisme propose que les liposomes bloquent l'activité phagocytaire des macrophages en les occupant. Ces macrophages étant occupés, ils ne peuvent exercer leur activité régulatrice sur certains aspects de la réponse immunitaire. L'antigène est donc libre d'interagir avec d'autres cellules du système immunitaire, comme les cellules B par exemple, et ainsi induire une réponse (Van Rooijen, 1993). Cette dernière hypothèse n'a jamais été clairement mise en évidence cependant.

En 1979, Schuster et collaborateurs ont pu démontrer que l'injection parentérale de liposomes contenant du lipide A comme adjuvant chez des lapins induisait la production d'IgM. Des immunisations subséquentes ont conduit à la production d'IgG anti-liposomes, démontrant ainsi qu'une immunité primaire et secondaire contre les phospholipides était possible chez un hôte (Cevc et Seddon, 1993). Cette observation ouvrit la porte aux études immunologiques avec les liposomes en tant qu'adjuvant et autres applications immunologiques. Les phospholipides ont été démontrés comme non immunogéniques dans certaines conditions (Schuster *et al.*, 1979 ; Van Rooijen *et al.*, 1983), mais il arrive cependant, comme dans le cas de maladies auto-immunes, qu'une réponse immunitaire soit

montée contre des lipides (Alving, 1984 ; 1990). Des anticorps contre la phosphatidylcholine peuvent d'ailleurs être retrouvés dans le sérum de souris normales (Briles *et al.*, 1981 ; Banerji *et al.*, 1982 ; Cecv et Seddon, 1993).

Plusieurs facteurs influencent le caractère adjuvant des liposomes. Ces facteurs sont la composition en lipides qui inclus la charge à la surface du liposome et la transition de phase et la taille (Gregoriadis et Panagiotidi, 1989 ; Gregoriadis, 1990 ; Allen, 1994). Par exemple, une toxicité *in vivo* accrue a été observée avec des liposomes chargés positivement comparativement à des liposomes neutres ou chargés négativement (Mayhew *et al.*, 1987). Cependant, une controverse demeure sur l'influence de la charge sur le caractère adjuvant. Certaines études démontrent qu'une charge négative ou neutre pouduit une meilleure réponse immunitaire (Allison et Gregoriadis, 1974), tandis que d'autres démontrent qu'une charge positive fonctionne mieux (Heath *et al.*, 1976 ; Van Rooijen et Van Nieuwmegen, 1980 ; Latif *et al.*, 1987).

La composition en phospholipides et donc chimique des liposomes influence également leur caractère adjuvant. Par exemple, il a été rapporté que la faible immunogénicité de certains liposomes était reliée aux faibles propriétés antigéniques de la phosphatidylcholine, à l'instar d'autres phospholipides comme la cardiolipine, le PI, le PG ou l'AP (Schuster *et al.*, 1979). Finalement, la taille et la température de transition de phase ont également un rôle à jouer dans le caractère adjuvant des liposomes. Il a été démontré que des liposomes de grande taille sont incapables d'intégrer la circulation sanguine parce qu'ils sont pris en charge au site de l'injection par les macrophages ou bien dirigés vers la lymphe (Allen *et al.*, 1993). D'un autre côté, des liposomes de petite taille (< 110 nm) ont démontré une habileté à pénétrer la circulation sanguine (Allen *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent donc que plus le liposome est de grande taille, plus il risque d'induire une réponse immunitaire (Allen *et al.*, 1993 ; Desjardins *et al.*, 1995). La température de transition de phase (T_C) des liposomes joue aussi un rôle dans leur caractère adjuvant. Des liposomes possédant une haute T_C (53 °C) sont plus immunoactivateurs que des liposomes ayant une

basse T_C (23 °C) (Desjardins *et al.*, 1995). Avec tous ces facteurs modulant le caractère adjuvant des liposomes, il est donc important d'évaluer le potentiel immunogénique des liposomes avant de les considérer comme traitement potentiel.

1.1.4 La problématique de la résistance aux antibiotiques

L'utilisation massive et parfois inappropriée des antibiotiques a favorisé l'émergence de pathogènes de plus en plus résistants aux antibiotiques conventionnels. Ces microorganismes ont développé des résistances multiples grâce à plusieurs mécanismes : A) l'inactivation de l'antibiotique par des enzymes, B) l'imperméabilité de la membrane externe aux antibiotiques, C) le pompage actif de l'antibiotique à l'extérieur de la cellule et D) l'altération de la cible (Hancock, 1998). La résistance aux antibiotiques peut être divisée en trois catégories : la résistance intrinsèque, la résistance transitoire et la résistance acquise ou génétique. La résistance intrinsèque se définit par les mécanismes qui existent dans une souche d'une espèce donnée et ce, sans égard à l'exposition à des antibiotiques. Elle comprend les mécanismes de résistance cités précédemment. La résistance transitoire est un mécanisme indépendant qui implique l'induction d'une résistance, sans changement observable dans le génotype de la bactérie, et ce suite à une exposition de la souche à des conditions stimulantes comme l'exposition aux antibiotiques. Une telle résistance est réversible et la souche qui l'exprime retrouvera son caractère sensible lorsque les conditions stimulantes ne seront plus présentes. La résistance génétique implique l'acquisition de nouvelles informations génétiques, soit par la mutation d'un gène existant ou d'un mécanisme contrôlé ou par l'acquisition d'un plasmide de résistance. Dans ce présent travail, l'emphasis sera mise sur *P. aeruginosa*, une bactérie gram-négative impliquée dans plusieurs infections nosocomiales et pouvant exprimer ces divers mécanismes de résistance.

Commençons par les mécanismes intrinsèques. Chez *P. aeruginosa*, il existe trois types d'enzymes modifiant les aminoglycosides : les N-acétyltransférases, les adényltransférases et les phosphotransférases et chacun de ces groupes comporte

plusieurs membres (Shaw *et al.*, 1993). Ces enzymes modifient l'antibiotique de façon à lui faire perdre toute affinité avec sa cible, le ribosome. Elles sont particulièrement importantes chez *P. aeruginosa*, contrairement aux autres espèces chez qui les β -lactamases sont plus répandues (Davies, 1994).

Un autre mécanisme de résistance intrinsèque chez *P. aeruginosa* est l'imperméabilité membranaire. Ordinairement, la membrane externe de bactéries gram-négatives constitue une barrière semi-perméable pour la pénétration d'antibiotiques et de substrats (Hancock et Bell, 1988 ; Hancock et Speert, 1996). Parce que la pénétration de petites molécules hydrophiles, comme les β -lactames, est restreinte par la présence de porines étroites dans la membrane externe, il y a donc une limitation dans le mouvement de telles molécules à l'intérieur de la cellule. Par conséquent, ce mécanisme permet à la bactérie de contrôler l'entrée de substances qui pourraient lui être nocives, comme les antibiotiques (Hancock, 1998). Cette situation se retrouve chez toutes les bactéries gram-négatives, mais est particulièrement importante chez *P. aeruginosa*. Cette bactérie a une membrane externe de 12 à 100 fois plus imperméable que celle d' *E. coli* (Nikaido *et al.*, 1986 ; Hancock, 1998), lui conférant une résistance élevée. Les raisons qui expliquent comment la bactérie acquiert cette imperméabilité membranaire sont très controversées. Plusieurs évidences démontrent que OprF, une protéine membranaire majeure chez *P. aeruginosa*, est directement responsable de la limite d'exclusion élevée chez cette bactérie (Nikaido *et al.*, 1991; Bellido *et al.*, 1992). Cependant en dépit de sa grande quantité dans la membrane externe, cette protéine constitue un chemin très inefficace pour les antibiotiques à cause de sa structure. Par conséquent, d'autres canaux doivent exister pour expliquer le 25-35 % de perméabilité non spécifique résiduelle qui n'est pas due à OprF (Yoshihara *et al.*, 1989 ; Yamano *et al.*, 1993 ; Yoneyama *et al.*, 1994).

D'un autre côté, la pénétration d'antibiotiques peut avoir lieu directement au travers de la membrane par un chemin qui n'implique pas les porines (Hancock et Bell, 1988 ; Hancock, 1998). C'est notamment le cas des aminoglycosides, comme

la tobramycine, qui sont souvent utilisés contre *P. aeruginosa* et dont la pénétration s'effectue selon un mécanisme d'auto-promotion (Hancock et Bell, 1988 ; Hancock *et al.*, 1996 ; Hancock, 1998), c'est-à-dire que la molécule favorise sa propre pénétration à l'intérieur de la cellule. Ce mécanisme fonctionne de la façon suivante. Normalement, on retrouve à la surface des bactéries gram-négatives des lipopolysaccharides (LPS) qui sont maintenus ensemble par des ponts d'ions divalents. Puisque les aminoglycosides sont polycationiques, ils ont plus d'affinité pour ces sites et par conséquent, la molécule d'antibiotique déplace l'ion divalent, entraînant une instabilité dans la membrane puisque l'antibiotique est plus gros que l'ion. Ceci augmente donc la perméabilité de la membrane externe et l'antibiotique et les autres substances qui n'avaient pas accès à la cellule peuvent maintenant y pénétrer (Figure 3). L'imperméabilité membranaire a donc un rôle très important à jouer dans la résistance microbienne.

Le dernier mécanisme de résistance intrinsèque chez *P. aeruginosa* est constitué par les pompes à reflux. Ces pompes à reflux ont été démontrées récemment comme très importantes dans la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques (Poole *et al.*, 1993). Depuis, plusieurs études ont été effectuées afin de comprendre le fonctionnement de cette résistance. Chez *P. aeruginosa*, on retrouve des pompes de la famille des RND (« resistance-nodulation-division ») qui agissent sur une multitude de composés comme des antibiotiques incluant la tétracycline, le chloramphénicol, les quinolones, la novobiocine, les macrolides, le triméthoprim et, apparemment, les β -lactames et inhibiteurs de β -lactamases (Poole *et al.*, 1993 ; Gotoh *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 1995 ; 1998 ; Köhler *et al.*, 1996). Les pompes à reflux ont donc une large spécificité qui permet à la bactérie d'avoir une résistance plus générale. Ces pompes sont composées de trois sous-unités : un transporteur qui se retrouve dans la membrane cytoplasmique de la bactérie et qui pompe les composés vers l'extérieur de la bactérie, une protéine accessoire qui est associée à la porine et sert de pont entre la protéine interne (pompe) et externe (porine), et finalement une porine, située dans la membrane externe et qui sert de sortie à l'agent expulsé par la pompe (Figure 4).

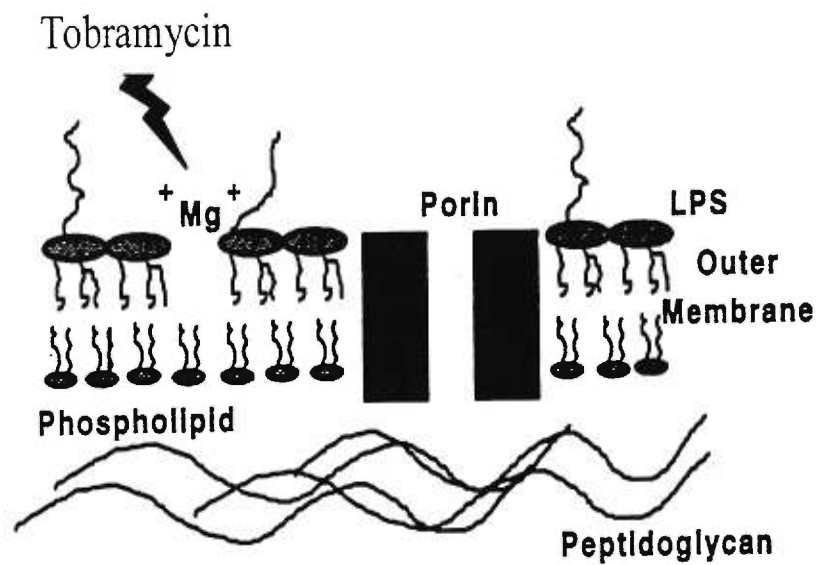


Figure 3. Mécanisme proposé pour la pénétration des aminoglycosides
(Hancock *et al.*, 1996)

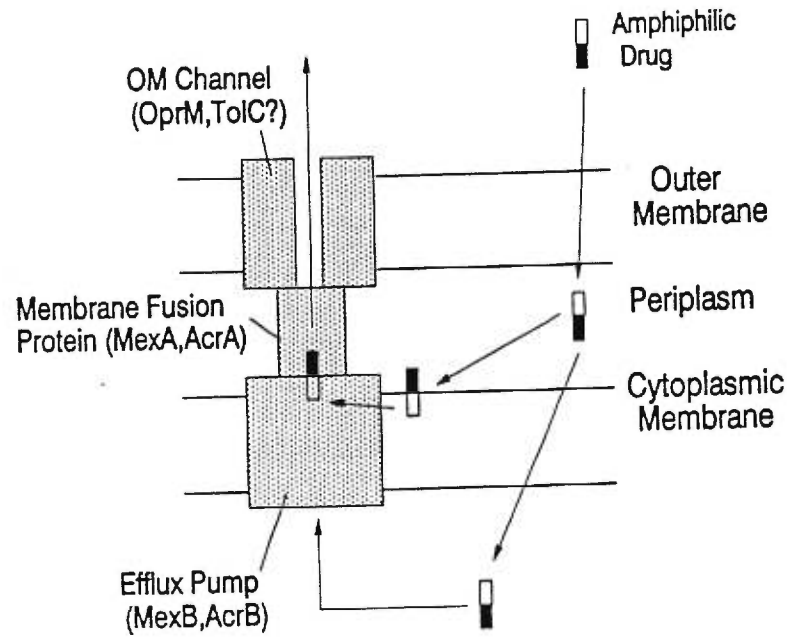


Figure 4. Modèle de pompe à reflux chez les bactéries gram-négative comme *P. aeruginosa* (Nikaido *et al.*, 1996)

Les mécanismes de résistance ne sont pas mutuellement exclusifs et ils travaillent souvent en synergie pour accroître la résistance aux antibiotiques. C'est le cas notamment de l'imperméabilité membranaire et des pompes à reflux. Même s'il est vrai que l'imperméabilité membranaire est inefficace sans un mécanisme de résistance secondaire tel que les pompes à reflux, c'est cette propriété qui distingue vraiment *P. aeruginosa* des autres bactéries gram-négative qui contiennent pourtant elles aussi des pompes à reflux (Hancock, 1998).

Les mécanismes mentionnés ci-dessus jouent un rôle très important dans la résistance bactérienne, cependant d'autres mécanismes sont également impliqués. C'est le cas notamment de la résistance transitoire. Cette résistance a été observée *in vitro* et *in vivo* et est définie comme une réduction de l'efficacité bactéricide d'un agent lorsque celui-ci est en contact avec la bactérie (Karlowsky *et al.*, 1997a). Une bactérie exposée à des niveaux inférieurs ou égaux à sa CMI peut acquérir une résistance à un aminoglycoside si on la réexpose à ce même antibiotique dans une période de temps donnée ultérieure. Ce phénomène disparaît lorsque l'antibiotique est éliminé du milieu de culture (Daikos *et al.*, 1990; Barclay *et al.*, 1992 ; 1996). Les aminoglycosides comme la tobramycine, la gentamycine, la netilmicine, l'amikacine et l'isepamicin induisent souvent ce type de résistance. De plus, l'exposition à l'un de ces antibiotiques peut conférer à la bactérie une résistance croisée contre les autres antibiotiques énumérés.

La reproductibilité, l'instabilité, la réversion, la nature constante de la CMI de la bactérie avant et après l'exposition à l'antibiotique, la conservation génomique de la souche, le nombre de cellules résistantes retrouvées dans une culture et une résistance croisée aux autres aminoglycosides suggèrent que ce type de résistance n'est pas dû à la production d'enzymes inactivantes, de mutations génétiques ou de changements dans la cible (Gilbert, 1995 ; Barclay *et al.*, 1996). Le développement de la résistance transitoire coïncide avec la diminution de l'accumulation des aminoglycosides à l'intérieur de la cellule (Daikos *et al.*, 1990; Karlowsky *et al.*, 1996). Cette accumulation dépend à la fois de la force proton motrice et de la

présence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle (Bryan, 1989). La résistance transitoire chez *P. aeruginosa* semble également coïncider avec des changements dans la composition de la membrane cytoplasmique, mais selon certains chercheurs elle serait indépendante de changements au niveau des lipopolysaccharides (LPS) et des protéines de la membrane externe (Karlowsky *et al.*, 1996). Chez certains organismes qui expriment une résistance transitoire à la gentamycine, on peut retrouver une augmentation dans les niveaux d'ARNm des gènes *denA* (nitrite réductase) et *anr* (respiration anaérobie), deux gènes impliqués dans la chaîne respiratoire. Ceci suggère que *P. aeruginosa* pourrait contrôler l'expression de ces deux chaînes respiratoires principales en réponse aux aminoglycosides (Karlowsky *et al.*, 1997b), ce qui réduirait l'accumulation d'aminoglycosides dans la bactérie.

La résistance génétique peut survenir soit par l'acquisition de nouveau matériel génétique (plasmides), soit par un changement au niveau génétique dû à une mutation ou une altération qui se traduit par une cible moins sensible. Un exemple est l'acquisition par *P. aeruginosa* d'un plasmide codant pour des enzymes qui modifient les aminoglycosides. Ce plasmide porte au moins 6 gènes codant pour des N-acétyltransférases et adénylyltransférases (Shaw *et al.*, 1993). De plus, cette bactérie possède un gène de résistance aux aminoglycosides, *aphA*, qui est chromosomique et peut apparemment être activé par des mutations (Okii *et al.*, 1983). Ces changements peuvent avoir de grandes conséquences sur la résistance d'une souche aux antibiotiques. Pour les antibiotiques dérivés de produits naturels, la résistance est communément due à l'acquisition de gènes codant pour des enzymes qui inactivent l'antibiotique, modifient la cible ou éliminent activement l'agent à l'aide de pompes à reflux. Des enzymes qui inactivent des antibiotiques synthétiques comme les quinolones, les sulfonamides et le triméthoprimine n'ont pas encore été identifiées. Pour ces antibiotiques et pour les antibiotiques naturels pour lesquels aucune enzyme inactivante ou altérante n'a émergé, la résistance survient généralement par une modification de la cible (Wehrli, 1983 ; Elwell et Fling, 1989 ; Then, 1989; Maxwell, 1992). Le mécanisme le plus répandu chez les bactéries est le développement d'une forme altérée de la cible normale par mutation ou recombinaison, ce qui amène une

résistance accrue à l'antibiotique. Un exemple de cela est la résistance aux quinolones chez *P. aeruginosa*. Cette résistance est due à des mutations dans la gyrase, réduisant l'affinité de l'antibiotique pour sa cible (Yoshida *et al.*, 1990). L'exemple le plus étudié demeure cependant la résistance aux β -lactames dans les souches qui ne possèdent pas de β -lactamases (Spartt, 1994).

1.2 Les FluidosomesTM

1.2.1 Caractéristiques

Les FluidosomesTM sont constitués de deux phospholipides : du dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) et du dimiristoyl phosphatidylglycérol (DMPG) dans un ratio de 18 :1 (p/p). La caractéristique principale des FluidosomesTM réside dans leur fluidité due à une température de pré- transition de phase de 33 °C et de transition de phase de 40 °C. Ceci signifie qu'aux températures corporelles, les liposomes comportent des zones hétérogènes de phase gel et liquide. Cette formulation fluide contient un aminoglycoside, la tobramycine, comme agent thérapeutique actif. Les FluidosomesTM ont été mis au point pour permettre le traitement d'infections bactériennes chroniques basé sur leur T_C qui, nous croyons, favorise les interactions liposomes-paroi bactérienne. De plus, les FluidosomesTM permettent une présence prolongée de l'antibiotique au niveau pulmonaire et une réduction de l'accumulation de l'antibiotique dans les reins (Beaulac *et al.*, 1996 ; 1997). Au niveau bactéricidie, les FluidosomesTM présentent une efficacité supérieure contre *P. aeruginosa* et autres bactéries comparativement à l'antibiotique libre. Cet effet a été observé à la fois *in vitro* (Beaulac *et al.*, 1998a) et *in vivo* (Beaulac *et al.*, 1997).

1.2.2 Bactéricidie *in vitro* et *in vivo*

In vitro, il a été démontré que les FluidosomesTM sont plus efficaces contre *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*, *E. coli* et *S. aureus* à des concentrations correspondant à la moitié de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des bactéries utilisées comparativement à l'agent libre (Beaulac *et al.*, 1998a, annexe II). L'efficacité bactéricide est 35 à 10⁵ fois plus grande avec l'antibiotique encapsulé comparativement à l'antibiotique libre après 16 h d'incubation. Le fait qu'une quantité d'antibiotique encapsulé correspondant à 50% de la CMI de la bactérie conserve une activité bactéricide importante suggère une interaction hors de l'ordinaire du liposome avec la bactérie puisqu'une telle efficacité ne peut être expliquée par un processus de diffusion normal de l'antibiotique.

L'efficacité bactéricide des FluidosomesTM a également été démontrée sur un modèle animal d'infection pulmonaire chronique à l'aide d'une souche clinique de *P. aeruginosa* muqueuse, PA 508, isolée à partir des expectorations d'un patient atteint de fibrose kystique. L'administration des FluidosomesTM a permis l'éradication de l'infection alors que la même quantité d'antibiotique libre n'était pas plus efficace que le témoin PBS puisque de 10⁶-10⁸ UFC étaient énumérées dans les poumons des animaux suite à ces deux traitements (Beaulac *et al.*, 1996). De plus, l'antibiotique a été retrouvé en moins grande quantité dans le sang et dans les reins d'animaux ayant reçus la formulation liposomal, diminuant d'autant les effets secondaires potentiels (Beaulac *et al.*, 1996). Naturellement, les FluidosomesTM doivent contenir de l'antibiotique pour être efficace.

1.3 La pharmacologie et les propriétés physico-chimiques des FluidosomesTM

1.3.1 La tobramycine et son mécanisme d'action

Les FluidosomesTM contiennent de la tobramycine, un aminoglycoside fréquemment utilisé pour traiter les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de fibrose kystique. Les aminoglycosides inhibent spécifiquement la

synthèse normale des protéines chez les bactéries susceptibles. Brièvement, les aminoglycosides se lient au site A du ribosome sur l'ARN 16S et inhibent la translocation de l'ARNm (Jiang et Patel, 1998 ; Wong *et al.*, 1998 ; Yoshizama *et al.*, 1998) La tobramycine interagit directement avec l'ARN en s'insérant dans la cavité formée par les bases désappariées et est partiellement enchassée entre la base de la boucle et une guanine qui s'étend au-dessus de la molécule d'antibiotique. On remarque également plusieurs liens hydrogène inter-moléculaires entre les groupements amines chargés de la tobramycine avec des atomes accepteurs sur les bases ou sur les phosphates de l'ARN. Ceci cause une mauvaise lecture de l'ARNm par le ribosome et bloque la synthèse des protéines.

1.3.2 Les méthodes de dosage de la tobramycine

Il existe plusieurs méthodes de quantification des aminoglycosides. On peut diviser ces méthodes en trois catégories : les tests chimiques, immunologiques et microbiologiques. Le test chimique le plus utilisé pour la quantification des aminoglycosides est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Barends *et al.*, 1981a, 1981b ; Wichert *et al.*, 1991 ; Beaulac *et al.*, 1996). Le principe du dosage par HPLC est la dérivatisation de l'antibiotique avec un réactif. Deux réactifs sont communément utilisés : le 1-fluoro-2,4- dinotrofluorobenzène (DNFB) et le o-phthalaldéhyde combinés avec le mercaptoéthanol. Ces réactifs réagissent avec les amines primaires et secondaires des aminoglycosides lorsqu'incubés avec ceux-ci. Le complexe aminoglycoside/ réactif peut ensuite être analysé sur colonne à phase inverse et détecté par ultra-violet (UV) ou par fluorescence. Cette technique est très sensible et permet de détecter des quantités de l'ordre du µg/ml.

Les tests immunologiques sont également utilisés pour la détection et la quantification d'antibiotique dans le sang ou les autres fluides corporels. Leurs applications se retrouvent surtout en clinique, avec des tests commerciaux comme le test EMIT (enzyme-multiplied immunoassay technique), le test de AMES (fluorescent

immunoassay), le TDx (fluorescent polarization immunoassay) et le test immunologique radioactif (RIA). Le test EMIT est un test rapide et simple pour vérifier la présence de drogues dans des fluides biologiques basé sur l'utilisation d'anticorps spécifiques pour la drogue à tester et de conjugués drogue-enzyme qui agissent comme indicateur. Les tests de AMES et TDx sont basés sur la polarisation de la fluorescence couplée à un anticorps anti-aminoglycoside (Stobberingh *et al.*, 1982 ; Jandreski et Garbinclus, 1993). Le RIA est un test simple et efficace. Le principe du RIA est basé sur l'utilisation d'un isotope radioactif couplé à un antigène indicateur. Jusqu'ici, aucun test ELISA n'existait pour détecter et quantifier les aminoglycosides parce que ce type d'antibiotique s'absorbe mal aux puits d'une micro-plaque ELISA.

Les tests microbiologiques utilisent des bactéries susceptibles à l'antibiotique pour en déterminer la présence et la quantité (Braby et Kats, 1988 ; Ackerman *et al.*, 1996). Le test le plus utilisé est le test de diffusion. Dans ce test, des bactéries de référence qui ne démontrent aucune résistance à l'antibiotique sont incorporées dans un milieu solide approprié. Une fois le milieu solidifié, des puits sont fabriqués pour contenir les échantillons et la quantification est basée sur une courbe standard.

1.3.3 Administration des FluidosomesTM sous forme de poudre.

Les antibiotiques sont habituellement nébulisés sous forme de liquide (Le Conte *et al.*, 1993 ; Fiel, 1995 ; Touw *et al.*, 1995 ; Mukhopadhyay *et al.*, 1998). Cependant, l'inhalation de poudre sèche a également été rapportée (Goldman *et al.*, 1990 ; Conway *et al.*, 1993). Les inhalateurs de poudre sèche (IPS) offrent des avantages par rapport aux inhalateurs conventionnels. Premièrement, les IPS sont activés par la respiration du patient réduisant ou éliminant les problèmes de coordination entre la respiration et le fonctionnement de l'appareil (Pedersen, 1987 ; 1996). De plus, les IPS sont simples et rapides à utiliser et le produit contenu à l'intérieur reste stable plus longtemps qu'avec les nébulisateurs liquides. Puisque les liposomes peuvent être fabriqués sous forme de poudre et que les IPS sont

relativement simples, ils pourraient être utilisés pour le traitement d'infections pulmonaires.

1.3.4 L'étude des interactions entre les phospholipides des FluidosomesTM et différents agents thérapeutiques

Les aminoglycosides sont des molécules hydrophiles constituées d'un groupement cyclitol associé à des sucres aminés. Il y a cinq groupements amines présents dans la molécule de tobramycine (figure 5). À pH neutre, ces groupements sont protonés et par conséquent contiennent une charge positive. Cette charge permet donc à la molécule de tobramycine d'interagir avec différents types de molécules tels les phospholipides. Ce genre d'interaction est impliqué dans la néphrotoxicité et l'ototoxicité des aminoglycosides à des concentrations élevées (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1991 ; 1995). Les cellules tubulaires du rein et les cellules ciliées de la cochlée sont particulièrement affectées (Tulken, 1986 ; 1989 ; 1990).

L'interaction qui se produit entre les aminoglycosides et les phospholipides est principalement électrostatique puisqu'il a été démontré dans plusieurs études que celle-ci était dépendante du pH et de la force osmotique en plus de nécessiter la présence de lipides négatifs (Laurent *et al.*, 1982 ; Chung *et al.*, 1985). La nature de la tête polaire du phospholipide négatif ne semble pas être importante pour l'interaction puisqu'aucune différence n'a été observée entre PG, PI, PS et PA (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1995). Par contre, la nature de l'aminoglycoside influence grandement la liaison de la molécule. Des études ont démontré que l'ordre d'affinité pourrait se définir comme suit : néomycine > gentamicine > tobramycine > amikacine A > streptomycine (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1995). Les mêmes principes cités ci-dessus peuvent s'appliquer pour les membranes artificielles comme les liposomes et plus particulièrement les FluidosomesTM. Cependant, chez les liposomes, cette interaction agit davantage au niveau des propriétés pharmacocinétiques et toxicologiques.

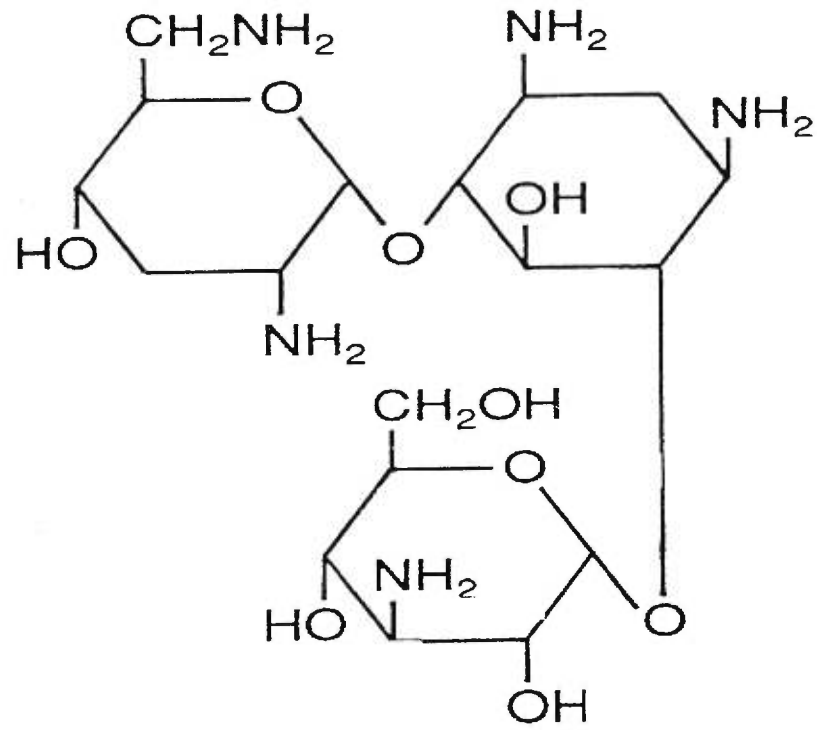


Figure 5. Structure moléculaire de la tobramycine.

1.3.5 La spectrométrie infrarouge

L'interaction entre les phospholipides et diverses drogues peut être étudiée à l'aide de la spectrométrie infrarouge. La spectrométrie infrarouge se base sur le niveau d'énergie des molécules. Chaque molécule peut avoir plusieurs niveaux d'énergie. Les liaisons d'une molécule donnée, par exemple, peuvent s'allonger ou se courber, ou bien une partie de la molécule peut pivoter par rapport à une autre. Tous ces mouvements moléculaires sont quantifiés, autrement dit, certaines liaisons ne peuvent s'allonger ou se courber que sous l'action de radiations d'une certaine fréquence ou, puisque fréquence et énergie sont proportionnelles, qu'à certains niveaux d'énergie. Le principe de la spectrométrie infrarouge est donc très simple. On expose une molécule se trouvant à un certain niveau d'énergie à une radiation dont on fait varier progressivement la fréquence. Aussi longtemps que la molécule n'absorbe pas la radiation, la quantité de lumière détectée sera égale à la quantité de lumière émise par la source. À une fréquence correspondant à une certaine transition d'énergie de la molécule, la radiation sera absorbée par la molécule et ne sera plus détectée. Evidemment, dans la spectrométrie infrarouge, des longueurs d'ondes de 2.5 à 15.0 x 10⁻⁶ mètres sont utilisées. Ceci se traduit par des énergies qui varient entre 2 à 12 kcal/ mole. Ces énergies sont suffisantes pour exciter des liaisons covalentes et les faire passer d'un état vibrationnel à un autre. En spectrométrie infrarouge, il y a deux types de vibrations : les vibrations d'élongation des liaisons (ou vibration de valence) et les vibrations de déformation des liaisons. Les élongations peuvent être symétriques ou antisymétriques et les déformations peuvent se produire dans le plan par des cisaillements ou balancements ou hors du plan par des va-et-vient ou torsions. Les spectres infrarouges sont habituellement exprimés en transmission de lumière en fonction de la fréquence. La spectrométrie infrarouge par transformées de Fourier est la plus couramment utilisée aujourd'hui pour analyser les phospholipides et leurs interactions parce qu'elle permet de soustraire le rapport signal sur bruit de fond ainsi que le signal dû aux bandes d'eau.

On obtient facilement en quelques minutes le spectre infrarouge d'un composé. Le spectre d'un composé donné est son identification propre puisque chaque composé a un spectre infrarouge qui le caractérise. La figure 6 démontre le spectre infrarouge d'un phospholipide, le dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) et sa structure. Lorsqu'on étudie les phospholipides, il y a deux régions d'intérêt particulier : les chaînes d'hydrocarbures et les têtes polaires. Les chaînes d'hydrocarbures sont situées dans la région de 800 à 1200 cm^{-1} . Cette région est particulière pour les variations dans les groupements C-H et C-C, en fonction de la température et d'autres variables externes. Cette région est souvent analysée pour obtenir la température de transition de phase des phospholipides. Les régions de 1700 à 1725 et de 815 à 825 cm^{-1} sont pour leur part caractéristiques de la région polaire des phospholipides. Ces régions sont utilisées pour l'analyse des interactions lipides-eau ou autres molécules, principalement les antibiotiques.

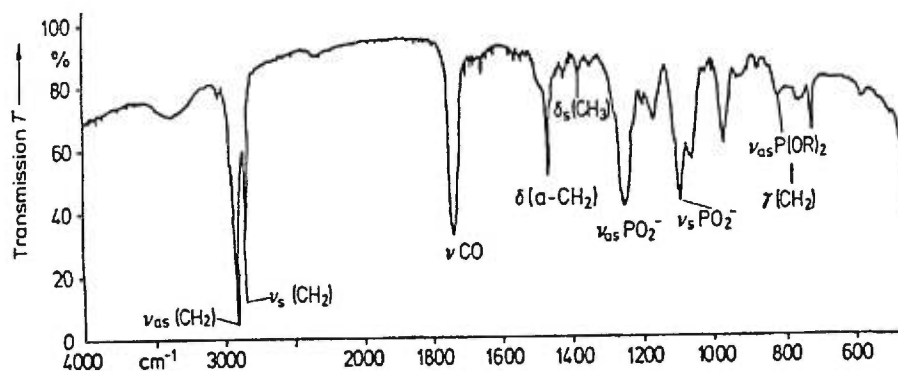


Figure 6. Spectre infrarouge atténué du DPPC (Cevc et Seddon, 1993)

Chacune de ces régions est sensible à la formation de liens hydrogènes. C'est entre autre à l'aide de cette technique que l'interaction des aminoglycosides et des phospholipides a été élucidée.

1.4 Objectifs du présent travail et stratégie expérimentale

Les travaux de recherche du présent travail avaient pour but de caractériser les mécanismes d'action et les propriétés biologiques et physico-chimiques des FluidosomesTM. L'hypothèse de départ qui a permis l'élaboration de la formulation des FluidosomesTM préconisait qu'un certain niveau de parenté entre les phospholipides et la paroi bactérienne puisse permettre un phénomène de fusion et faciliterait l'introduction de l'antibiotique dans la cellule bactérienne. Des études ont démontré que les liposomes pouvaient interagir avec des bactéries (section 1.1.3.1), mais aucune étude n'a démontré jusqu'à présent que cette interaction impliquait une fusion des liposomes avec la paroi bactérienne.

C'est à l'aide de la microscopie électronique et de la cytométrie en flux que nous avons tenté de répondre à cette question. La microscopie électronique nous a permis d'étudier la pénétration de l'antibiotique encapsulé et libre à l'intérieur de la bactérie. Des cinétiques de croissance de *P. aeruginosa* résistant à la tobramycine (CMI 64 µg/ml) en présence de FluidosomesTM ou de tobramycine libre ont été effectuées. À des temps déterminés, des échantillons de bactéries étaient prélevés et traités en vue d'études immunocytochimiques pour détecter la présence de tobramycine dans le cytoplasme de la bactérie. Les résultats de ces études sont présentés au chapitre 2 (Sachetelli *et al.*, 1998a, article soumis à *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*).

Pour démontrer qu'une fusion se produisait entre les FluidosomesTM et *P. aeruginosa*, une sonde fluorescente, le PKH2-GL, a été utilisée. Cette sonde, qui permet d'étudier l'intégration de phospholipides dans les membranes, a été incorporée dans les FluidosomesTM lors de leur fabrication. Des cinétiques de croissance avec des souches résistante et sensible de *P. aeruginosa* ont ensuite été effectuées en présence de FluidosomesTM marqués. Des échantillons de bactéries étaient prélevés dans le temps et l'incorporation de PKH2-GL dans les bactéries était étudiée en cytométrie en

flux. Les résultats de ces études sont également présentés au chapitre 2 (Sachetelli *et al.*, 1998a)

L'immunogénicité et la cytotoxicité des liposomes aux niveaux systémique et pulmonaire est importante à considérer pour l'utilisation éventuelle des FluidosomesTM chez l'humain. Comme nous l'avons vu précédemment, les liposomes par eux-mêmes ne sont pas immunogéniques (Schuster *et al.*, 1979 ; Phillips *et al.*, 1995), mais peuvent le devenir lorsqu'associés à un agent thérapeutique en raison des propriétés d'adjuvant des liposomes. C'est pourquoi, l'immunogénicité et la cytotoxicité des FluidosomesTM ont été analysées. Des immunisations intrapéritonéales et intra-trachéales répétées ont été effectuées chez des souris pour mesurer l'immunogénicité de l'ensemble FluidosomesTM- tobramycine. Des tests de phagocytose ont également été pratiqués en présence des FluidosomesTM et de macrophages pour étudier leur effet sur ce type de cellules. Les résultats de ces études sont présentés au chapitre 3 (Sachetelli *et al.*, 1998b, article soumis à *Biochimica et Biophysica Acta*).

La tobramycine contenue à l'intérieur des FluidosomesTM est habituellement dosée par HPLC et par des tests microbiologiques. Dans le but de posséder une méthode efficace mais plus rapide, simple et moins coûteuse, nous avons développé un test ELISA pour la détection de la tobramycine basée sur l'utilisation de l'Alcian bleu comme agent liant (Laakel *et al.*, 1996 ; Lagacé *et al.*, 1994). Ce test est présenté au chapitre 4 (Sachetelli *et al.*, 1998c).

L'efficacité *in vivo* et *in vitro* des FluidosomesTM a été démontrée dans des études de croissance différentielle (Beaulac *et al.*, 1996, 1998a ; Annexe I). Ces études démontrent que les FluidosomesTM sous forme liquide sont plus bactéricides que l'antibiotique libre. Dans le but de développer un traitement efficace et simple pour l'humain, nous avons étudié l'efficacité des FluidosomesTM sous forme lyophilisée *in vitro* et *in vivo*. Les études *in vitro* et *in vivo* ont été effectuées selon les mêmes procédures que les études précédentes (Beaulac *et al.*, 1996, 1998a;

Annexe I), mais en utilisant des FluidosomesTM et de la tobramycine libre sous forme lyophilisée. Le résultat des études *in vitro* est présenté au chapitre 5 (Beaulac *et al.*, 1998b), tandis que celui des études *in vivo* est présenté au chapitre 6 (Beaulac *et al.*, 1998c).

Comme il a été mentionné précédemment, les aminoglycosides sont des antibiotiques hydrophiles capables de se lier *in vivo* ainsi qu'*in vitro* à des phospholipides cellulaires chargés négativement. Cette liaison est impliquée dans la néphrotoxicité et l'ototoxicité de cet antibiotique. Les FluidosomesTM contiennent du dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), un lipide neutre, et du dimyristoyl phosphatidylglycérol (DMPG), un lipide chargé négativement. L'objectif était donc d'étudier l'interaction entre la tobramycine encapsulée dans les FluidosomesTM et ces deux phospholipides afin de déterminer la présence de cette interaction et son implication possible dans le mécanisme d'action des FluidosomesTM. Pour ce faire, des expériences d'affinité et de spectrométrie infrarouge ont été effectuées. Les tests d'affinité consistaient à incuber une concentration constante de tobramycine avec une concentration croissante de phospholipides. Après une incubation, l'antibiotique et les phospholipides étaient séparés par centrifugation, puis la quantité de tobramycine non associée avec les phospholipides était déterminée par HPLC. Les résultats de ces expériences sont présentés à l'annexe II.

La spectrométrie infrarouge a pour sa part été utilisée pour caractériser cette interaction au niveau moléculaire. Les FluidosomesTM ainsi que chacun des phospholipides constituants ont été mis en présence de tobramycine, puis soumis à des cycles gel-dégel de façon à bien hydrater les phospholipides et permettre une interaction maximale. Les échantillons étaient alors placés dans un spectromètre infrarouge et analysés. Les résultats de ces études sont présentés à l'annexe II.

CHAPITRE 2- ARTICLE

Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells

Sébastien Sachetelli, Christian Beaulac et Jacqueline Lagacé

Département de Microbiologie et Immunologie

Université de Montréal

Montréal, Canada

Article soumis à *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal
formulation and bacterial cells

Running title: Interaction of FluidosomesTM with bacteria

S. Sachetelli, C. Beaulac, S. Sénéchal and J. Lagacé*

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of
Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7.

*: corresponding author. Tel.: (514) 343-2180, Fax: (514) 343-6358.

Abstract

It was previously demonstrated that fluid liposomal-encapsulated tobramycin, named FluidosomesTM, was successful in eradicating mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in an animal model of chronic pulmonary infection whereas free antibiotic did not reduce colony forming unit (CFU) counts (2,4). These liposomes were also shown to be bactericidal in *in vitro* tests against strong resistant *P. aeruginosa* strains. To define the mechanism by which FluidosomesTM work, negative staining, immunoelectron microscopy and fluorescence activated cell sorting (FACS) studies were performed. It was found that FluidosomesTM fuse with bacterial cell walls leading to a marked increase of tobramycin in the cytoplasm of a resistant bacteria (minimal inhibitory concentration (MIC) > 64 µg/ml). The time needed to reach the maximal fusion rate was about 5 h for the resistant strain comparatively to 0.5 h for the sensitive strain. The specific characteristics of FluidosomesTM could help overcome bacterial resistance related to permeability barrier, efflux pumps and even enzymatic hydrolysis considering the importance of synergy in the whole process of antibiotic resistance.

Introduction

Chronic pulmonary infections with *Pseudomonas aeruginosa* and other related strains like *Burkholderia cepacia* are considered as the most important factor determining the prognosis of cystic fibrosis (CF) patients (7,13,17). These bacteria are known for their very low nonspecific permeability and/ or the presence of membrane-associated energy driven-efflux systems that make them resistant to the majority of antibiotics (15). Other mechanisms of resistance like enzymatic inactivation of the drug and alteration of its molecular target can work synergistically with previous mechanisms (6,11,18, 20). Another cause of resistance to antibiotics that is largely underestimated is a transitory and unstable phenomenon of decreased membrane permeability that appears and is maintained only in the presence of the antibiotic (9). Consequently, efficient therapy against *P. aeruginosa* in CF remains difficult and controversial leading to progressive pulmonary damage and, eventually to death (13,17).

To increase the bactericidal efficacy of antibiotics, different liposomal formulations were developed in our laboratory with the aim of promoting effective interactions between bacteria and encapsulated drugs, increasing the lifetime of the encapsulated antibiotics and reducing systemic drug absorption (3). Tobramycin encapsulated in a negatively charged liposomal formulation presenting a low gel-liquid crystalline transition temperature (T_C) $\leq 37^\circ\text{C}$ succeeded, for the first time, in eradicating mucoid *P. aeruginosa* in an animal model of chronic pulmonary infection (2). This fluid liposomal encapsulated tobramycin, named FluidosomesTM, was later shown to be effective against all the other bacterial strains tested: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (4). To investigate further how FluidosomesTM interact with bacteria, we proceeded in performing negative staining, immunoelectron microscopy and fluorescence-activated cell sorting (FACS) studies.

Materials and Methods

Bacterial strains. A clinical and a reference strains were used in this study. *P. aeruginosa* 429 is a clinical strain obtained from a patient with cystic fibrosis (Sainte-Justine Hospital, Montréal, Québec, Canada) which has an minimal inhibitory concentration (MIC) for tobramycin of 64 µg/ml. A *P. aeruginosa* 429 susceptibility profile with the 24 aminoglycosides for which MICs were performed shows resistance values between 64 and 512 µg/ml. This strain was also probed negative by DNA hybridization to all 14 aminoglycoside resistance genes tested (Antibiotic Screening and Evaluation, Schering-Plough, New Jersey, USA) suggesting permeability resistance that was confirmed by disk tests . The strain 429 shows a small colony morphology and a rate of growth corresponding to only about 29% of that of the reference strain. The reference strain, *P. aeruginosa* ATCC 25619, was obtained from ATCC (American Type culture Collection, Rockville, Md). This strain is not resistant to tobramycin (MIC < 1 µg/ml). Both strains were stored in brain heart infusion broth supplemented with 10% glycerol. For the experiments, an 17-h culture of these organisms in proteose peptone no 2 broth (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) was prepared.

FluidosomesTM. FluidosomesTM are liposomes composed of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dimiristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) (Avanti polar lipids, Alasbaster, AL) in a ratio of 18:1 (w/w). They are prepared by Theralipids, Inc. (Ville Mont-Royal, Québec, Canada) using the dehydration-rehydration vesicle method as previously described (2,4). Briefly, appropriate amounts of both phospholipids are dissolved in chloroform contained in a round-bottom flask. A lipid film is then obtained by rotoevaporation (Büchi Rotavapor) at 65°C under vacuum (Büchi vacuum controller). The lipids are then redissolved in phosphate-buffered saline (PBS) 1:20, freeze-dried at 4°C (Virtis Genesis 12 EL Console freeze dryer, Canberra Parkard, Toronto, Canada) and kept at -70 °C until use. When FluidosomesTM containing tobramycin are needed, 3.75 ml of tobramycin sulfate (Nebcin, Eli Lilly, Toronto, Ontario, Canada) at a concentration of 40 mg/ml was added to the freeze-dried liposomal preparation. The solution was then incubated

60 min. at 65 °C with vigorous vortexing every 10 min and extruded successively through polycarbonate membranes of 1.0, 0.6 and 0.4 µm. FluidosomesTM without tobramycin were prepared similarly but PBS was used instead of the antibiotic. Unencapsulated tobramycin was then removed by centrifugations (2 X 5000 g, 30 min. 4°C) and the final liposomal pellet was resuspended in PBS. The quantification of tobramycin in FluidosomesTM was performed by HPLC analysis as previously described (2,4).

Antibiotic penetration assessment by immunoelectron microscopy. For these experiments, the *Pseudomonas aeruginosa* strain 429 was used. Briefly, a 17 h culture of this clinical strain was collected and a solution with an optical density (O.D.) of 0.04 (660 nm) was made in fresh proteose peptone no 2. 29 ml of this solution was then added in 50 ml tubes. FluidosomesTM or free tobramycin at a final concentration of 30 µg/ml (half the MIC of the bacteria) or PBS were then added and incubated at 37°C with agitation (250 RPM). Two ml samples were taken after 0, 1, 2, 3 and 6 hours of incubation and processed for electron microscopy. Briefly, the samples were centrifuged and the pellet resuspended in a solution of electron microscopy grade glutaraldehyde and paraformaldehyde (Sigma, St-Louis, MI) at percentages of 0.1 and 4 % respectively prepared in 0.1 M of cacodylate buffer pH 7.0. The cells were incubated for a period of two hours at room temperature in the fixation solution. After fixation, the cells were washed in cacodylate buffer 0.1 M containing 3% sucrose (w/v) and processed for embedding in Spurr resin. Ultra thin cuts of the samples were made and prepared for immunogold labeling using standard procedure (5). To detect the presence of tobramycin inside the bacteria, antibodies against tobramycin (Cerdelane, Ontario) were used and revealed with colloidal gold (10 nm) coupled to protein A/G prepared as previously described (8). Samples were analyzed using a Hitachi transmission electron microscope (Hitachi 7100).

Analysis of fusion between bacteria and liposomes by negative staining. Bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* 429) were incubated with FluidosomesTM following the same procedure as described above. A sample was taken 1 hour after incubation and

processed for visualization by negative staining. A drop of the bacterial suspension was layered on formvar coated copper grid and incubated 1 min. at room temperature to allow the bacteria to adhere to the grid. Excess liquid was absorbed and a drop of phosphotungstic acid (PTA) at 1% (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) was added. The grid was incubated 1 min, excess liquid was absorbed and the sample was visualized by electron microscopy.

Labeling of FluidosomesTM with PKH2-GL. To evaluate fusion of FluidosomesTM with bacteria by flow cytometry, FluidosomesTM were labeled with PKH2-GL using the PKH2-GL labeling kit (Sigma, St-Louis, MI). PKH2-GL is a probe often used to study interactions between biological membranes (10, 19). This probe is a fluorescent cell linker dye containing aliphatic carbon tails which insert themselves in membranes. It possesses similar spectral characteristics as FITC. Briefly, freeze-dried FluidosomesTM were rehydrated with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 as previously described (2, 4). The final liposomal pellet was then used for the labeling procedure. Labeling was effectuated following the manufacturer's instructions but with small modifications. A 1 ml aliquot was taken and centrifuged 30 min. at 6000 g, 4°C. The pellet was then resuspended in 1 ml of diluant A (Sigma, St-Louis, MI). Diluant A is a solution contained in the kit used for the labeling procedure. Eight µl of PKH2-GL was then added for a final concentration of 4×10^{-6} M. The volume was then completed to 2 ml with diluant A. The PKH- liposomal solution was incubated for 5 min. at room temperature with circular agitation. Following the incubation, 2 ml of bovine serum albumin at 1% (w/v) in PBS was added and the solution was further incubated for 1 min. with agitation to stop the labeling reaction. FluidosomesTM were then washed twice with PBS by centrifuging at 5000g, 30 min., 4°C to remove any free PKH. Labeling efficiency was on average 95% as determined by flow cytometric analysis.

Flow cytometric analysis of fusion using PKH2-GL. Integration of Fluidosomes™ to bacterial cells was demonstrated in fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, using the fluorescent marker PKH2-GL. *P. aeruginosa* 429 or ATCC 25619 were incubated for 17 h in proteose peptone broth no 2. A solution of 0.3 of O.D. (660 nm) was then made. The solution was centrifuged and the cell pellet resuspended in RPMI supplemented with 2.5 % fetal calf serum for washing. The final cell pellet was resuspended in RPMI supplemented with 2.5 % fetal calf serum to obtain the same initial concentration. RPMI was used because it was determined by earlier experimentation to be the best medium for reducing background fluorescence of *P. aeruginosa* due to siderophore production. Aliquots of 18 ml were then taken and transferred to conical tubes of 50 ml (Sarstedt, St-Laurent, Québec, Canada). Bacteria were incubated either with 200 µl of Fluidosomes™ labeled with PKH2-GL, 200 µl of PBS (negative control) or 80 µl of free PKH-2GL (positive control) to obtain a final concentration of 4×10^{-6} M. PBS was then added to complete the volume to 20 ml and the tubes were incubated at 37°C with agitation (250 RPM). Tobramycin was not encapsulated in Fluidosomes™ in order to avoid bacterial cell killing. Based on preliminary studies, two ml samples were taken after 10 min, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours of incubation. Fluidosomes™ and free PKH2-GL were separated from the bacteria by centrifugation through a sucrose cushions of 21% (w/v) in PBS. The recovered bacterial pellet was washed twice in PBS and the final cell pellet was fixed with 300 µl of 2% paraformaldehyde diluted in PBS for FACS analysis.

Results

To try to understand how Fluidosomes™ succeed to show strong bactericidal activity against resistant bacteria with a quantity of antibiotic ≤ 50 % of the MIC (4), kinetic studies with *P. aeruginosa* 429 were performed as previously described (4) to study the mode of interaction of Fluidosomes™. This strain was selected because of its strong permeability resistance to tobramycin corresponding to 64 µg/ml. Following electron microscopic observations performed on negatively stained samples one hour after contact of Fluidosomes™ with *P. aeruginosa* 429, it could

be observed that FluidosomesTM interact very closely with the outer membrane of the bacteria (Fig.1A, dark spheres). Thickenings of the outer membrane were observed suggesting fusion of the liposomes with the bacterial membranes which could explain the increased penetration of antibiotic with FluidosomesTM inside bacterial cells (see arrow on Figure 2).

To assess the penetration of tobramycin inside the bacterial cells, the strain 429 was incubated with free tobramycin, FluidosomesTM or PBS. Samples were taken after 0, 1, 2, 3 and 6 h post-treatment. Immunogold techniques were used to reveal the presence of tobramycin. No significant differences were observed in the penetration of antibiotic between encapsulated and free tobramycin after 0 to 3 h of incubation (data not shown). However after 6 h of incubation, a noticeable difference could be seen. In longitudinal bacterial sections, up to 23 gold particles could be detected in bacteria exposed to FluidosomesTM (Fig. 1A) whereas less than a mean of 2 gold particles were found in the cytoplasm of cells treated with free antibiotic (Fig. 1B). Statistical analysis of colloidal gold labeling after 6 h of incubation in longitudinal bacterial sections showed an average of 9.54 ± 4.34 gold particles/ μm^2 in bacteria exposed to FluidosomesTM whereas only 1.20 ± 1.22 gold particles/ μm^2 were enumerated in longitudinal sections of bacteria incubated with free tobramycin ($P < 0.001$). The PBS control gave an average labeling of 0.51 ± 0.82 gold particles/ μm^2 in longitudinal sections of bacterial cells. Because transversal sections represent only about 33% of the longitudinal section surface of *P. aeruginosa* cells, only longitudinal sections were selected for enumeration of gold particles to assure the reproducibility of the counts between the different groups of cells. Background labeling, which consisted of gold particles not associated with bacteria or liposomes, was respectively of 1.96 ± 0.19 , 0.25 ± 0.12 and 0.02 ± 0.02 gold particles/ μm^2 in thin sections for FluidosomesTM, free tobramycin and PBS control

To verify whether the interaction of FluidosomesTM with the bacteria implicates an integration of liposomal phospholipids in bacterial membranes by fusion, FACS studies using PKH-2GL, a fluorescent lipophilic marker, were

performed. Labeled FluidosomesTM without antibiotic, were incubated with *P. aeruginosa* 429 (MIC 64 µg/ml) and the reference strain ATCC 25619, displaying no resistance to tobramycin. Antibiotic was not encapsulated in FluidosomesTM to avoid bacterial cell killing. After 10 min., 0.5, 1, 2, 3, 4, and 6 h of incubation, bacteria were separated by centrifugation through a sucrose cushion and washed. Fusion was assessed by the integration of phospholipid-PKH2-GL in bacterial cells as demonstrated by flow cytometry studies (Fig 3). Interaction with the non resistant strain was observed within 10 min. of contact with FluidosomesTM reaching a maximum signal of 61.70% of average fluorescent cells after 30 min and decreasing afterwards (Fig. 3A). The pattern observed with the resistant strain, *P. aeruginosa* 429, was strongly delayed. Indeed, after 10 min. of contact, no significant difference was observed between the control (bacteria not exposed to labeled FluidosomesTM) and bacteria incubated with liposomal PKH2-GL. As time progressed, the percentage of fluorescent bacteria increased gradually to reach a maximum of 38.60% after 5 h of incubation with liposomal PKH2-GL (Fig. 3B), strengthening the idea of fusion between the liposomes and the bacterial cells as suggested by electron microscopy studies. Positive controls, which consisted of bacteria marked with free PKH2-GL, were not put on the figures for simplicity but were in the range of 70 to 95 % of fluorescence for the duration of the experiments. This control assured us that PKH2-GL was compatible with bacterial membrane. All studies were repeated at least three times with the same results for a given strain.

Discussion

Using *P. aeruginosa* 429, it was previously demonstrated that the use of a quantity of tobramycin corresponding to only 50% of the MIC of this bacteria, succeed to reduce the number of CFU by a factor of 84 times comparatively to the same quantity of free tobramycin six hours after the addition of antibiotic (4). These results strongly suggest that the mode of action of FluidosomesTM is related to an uncommon way of penetration in bacterial cells since a normal diffusion process cannot explain why a quantity of encapsulated antibiotic corresponding to only 50% of the MIC can kill bacteria whereas the same quantity of free antibiotic is

ineffective. Unfortunately, it was impossible to reproduce such killing curves with the strain ATCC 25619 used as control in FACS studies since this latter strain is sensitive to tobramycin. This strain cannot stay alive in presence of a minimal concentration of antibiotic which is essential to measure a modification of growth following contact with free and encapsulated antibiotic. On the other hand, the sensitivity of the control strain to tobramycin was essential to perform comparative FACS studies with the resistant strain.

Using the following methodologies, negative staining coloration for E.M, immunoelectron microscopy and FACS, we reproduced in the present work, the kinetic study with the strain 429 with the aim to elucidate its mode of interaction with FluidosomesTM. E.M. observations of negative staining coloration of bacterial cell grown in presence of FluidosomesTM (dark spheres in Fig 1A) show that these latter interact very closely with bacterial membranes (dark spheres in Fig 1A). Immunogold coloration of ultra-thin sections done with strain 429 showed the presence of greater quantities of tobramycin in bacterial cells incubated with FluidosomesTM compared with the free antibiotic ($P < 0.001$) demonstrating increased penetration of the antibiotic when encapsulated (Fig. 1A and 1B). The lower background labeling for the free antibiotic and PBS controls (0.25 ± 0.12 gold particles/ μm^2 and 0.02 ± 0.02 gold particles/ μm^2 respectively) comparatively to the background signal present in the sections containing FluidosomesTM (1.96 ± 0.19 gold particles/ μm^2) can be explained by the fact that it is easy to eliminate free tobramycin through wash/centrifugation steps whereas FluidosomesTM are pelleted with bacteria during washes/centrifugations. Afterwards, when the samples go through the different steps of thin section preparation like fixation, dehydration and embedding, encapsulated tobramycin can be released. This can increase background labeling in the sections as observed in this case.

Even if the difference of labeling of bacteria exposed to FluidosomesTM and free tobramycin was very significant ($P < 0.001$), one could expect a more important labeling if we take into account the strong bactericidal efficacy of FluidosomesTM

compared to free tobramycin in previous studies (4). Because we found only a few gold particles into each FluidosomesTM (data not shown), this means that only a low percentage of molecules of tobramycin are revealed by antibodies/colloid gold particles coupled to protein A/G. Moreover, when thin section (200 nm) are made, only a small fraction of each cell can be observed. In addition, to be detected, the epitopes of tobramycin must be exposed at the section's surface in order for the antibody to bind and also, epitopes can be modified by the E.M. preparative processing reducing its recognition by the antibodies. The combination of all of these factors reduces the overall chances of having a high concentration of gold particles present at any given location in the bacteria and at any given time. Consequently it is almost impossible in this type of experiment, to obtain a very high level of labeling and a small standard deviation. Despite that fact, a very significant difference in labeling could be observed between bacteria exposed to FluidosomesTM and free tobramycin.

To further investigate the interaction of FluidosomesTM with bacterial cells and to precise if the increased penetration of tobramycin was associated with incorporation of liposomal phospholipids in bacterial cells, PKH2-GL was used in cytometry studies. PKH2-GL has the characteristic of inserting itself into membranes due to its aliphatic properties by use of Zyn-linker® technology (10,19). Because of its inherent insolubility in aqueous environments, the probe is trapped once incorporated into the membrane making it a reliable tracer for fusion and/ or integration analysis. Since the probe cannot by itself disincorporate or diffuse from the liposomes to the bacteria using the aqueous environment as an intermediate, this implies that the results observed can only be explained by a direct incorporation of liposomes or liposomal phospholipids in the outer membrane. The cytometry results show that the speed of incorporation of the markers in the two bacteria was very different. The integration of FluidosomesTM in the sensitive bacteria (ATCC 25619) was already important ten minutes after the addition of liposomes, reaching a maximum value of 61.70 % of bacteria containing liposomal-PKH2-GL after 30 min (Fig. 3A). The maximal incorporation was achieved only after 5 h of incubation with

the resistant strain (*P. aeruginosa* 429) at which time 39 % of bacteria contained liposomal-PKH2-GL (Fig 3B). It is significant that for the resistant strain, optimal interaction took place after 5 h of incubation (Fig 3B) which is in accordance with the beginning of the bactericidal effect observed after 6 h in previous kinetic studies following interaction of FluidosomesTM with *P. aeruginosa* 429 (4). The FACS study showed also that after 6 h of incubation, two different populations of cells could be distinguished in relation to the incorporation of liposomal-PKH2-GL (Figs. 3A and 3B). This phenomenon was probably due to the fact that the concentration of liposomal-PKH2-GL stayed the same throughout the whole experiment whereas as time progressed, liposomal-PKH2-GL was incorporated or fused with bacteria. A fluorescent population of bacteria appeared meanwhile bacterial growth proceeded and an increasing number of non-fluorescent bacteria repopulated the non-fluorescent pool. This eventually created two populations of cells, which were seen after 6 hours of incubation in the two strains tested. Eventually if additional liposomal-PKH2-GL would be available in the system, one could hypothesize that all bacteria present would be fluorescent. The different levels of liposomal-PKH2-GL incorporations in function of time between the two strains imply that membrane impermeability affects the initiation time, the rapidity and the rate of fusion. But even if the interaction was slowed with the resistant strain, the processes of fusion between the liposomes and the bacterial cells was still important and sufficient to explain the bactericidal activity previously observed with FluidosomesTM and *P. aeruginosa* 429 (4). Finally, the necessity to perform the FACS study in presence of liposomes free of tobramycin to maintain the integrity of the bacterial cells allowed to observe that tobramycin is not necessary for fusion to occur.

The ability of FluidosomesTM to increase penetration of antibiotics in bacterial cells by a fusion mechanism would be dependent on the T_C and negative charge of liposomal phospholipids (2,3). At body temperature, the liposomal phospholipids are in equilibrium between the gel and fluid phases. Membrane merging could be possible due to the formation of domains in the liposomal membrane at temperatures equal or above 37°C. Due to membrane merging, the antibiotic could easily penetrate

inside the bacteria allowing the increased bactericidal efficacy observed with the drug (2,4) thus circumventing the normal pathway of penetration. This is the first time that fusion between liposomes and bacterial cells based on low T_C of liposomes has been demonstrated to enhance the efficacy of the encapsulated therapeutic agent against resistant strains (2, 4). Usually, drugs entrapped in rigid liposomes may be more effective than free drugs *in vivo*, but they have generally low bactericidal activity against extracellular bacteria *in vitro* (1, 12, 21). The superior therapeutic effect of liposome-encapsulated drugs may result from liposomes being delivered to the infection site where they are degraded, releasing their contents. Experimental models of infections in which antimicrobial agents encapsulated in rigid liposomes have been successful in both *in vivo* and *in vitro* studies all involved infections of cells of the mononuclear phagocyte system (MPS) by facultative or obligate intracellular pathogens (14,16). In these studies, uptake of rigid liposomes by phagocytes was essential to obtain a superior therapeutic effect. However, this is not the case with FluidosomesTM and efficacy is displayed both *in vitro* and *in vivo* (2,4) against extracellular bacteria and without the involvement of macrophages.

The treatment of bacterial infections is a growing problem. Bacteria are becoming increasingly resistant to a wide variety of antibiotics making their eradication more difficult. The use of fluid liposomes for the treatment of persistent or difficult to treat infections could be an answer to this growing problem of resistance. FluidosomesTM possess a unique bactericidal activity against resistant strains and can be used with different drugs (unpublished data). The present work strongly suggests a fusion process between liposomal and bacterial membranes to explain the bactericidal efficacy of FluidosomesTM that has been demonstrated in previous studies (2,4). This demonstration is particularly striking since *P. aeruginosa* possesses one of the most efficient impermeability barrier against antibiotics. The data confirm that FluidosomesTM are very promising for patients suffering from infections hard to treat that resist to conventional antibiotherapy. Pre-clinical and clinical studies are in progress to test the efficacy of FluidosomesTM in the treatment of cystic fibrosis. Many other applications of FluidosomesTM are currently in progress.

Acknowledgements

We Thank Robert Alain for his help in electron microscopy analysis. Drs E.A. Cohen and G. Szatmari for there constructive critics. This work was supported by a grant from the Canadian Cystic Fibrosis foundation.

References

1. **Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., M.T. Ten Kate, L.E.T. Stearne-Cullen, and M.C. Woodle.** 1995. Efficacy of gentamicin or ceftazidime entrapped in liposomes with prolonged blood circulation and enhanced localization in *Klebsiella pneumoniae*-infected lung tissue. *J. Of Infec. Dis.* **171**: 938-947.
2. **Beaulac, C., S. Clément-Major, J. Hawari, and J. Lagacé.** 1996. Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 665-669.
3. **Beaulac, C., S. Clément-Major, J. Hawari, and J. Lagacé.** 1997. In vitro kinetics of drug release and pulmonary retention of microencapsulated antibiotics in liposomal formulations in relation to lipid composition. *J Microencapsulation.* **14**: 335-348.
4. **Beaulac, C., S. Sachetelli, and J. Lagacé.** 1998. In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentration of liposome-encapsulated antibiotic against gram-negative and gram-positive bacteria. *J Antimicrob. Chemother.* **41**: 35-41.
5. **Bendayan, M.** 1995. Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Progress. Histo. And Cytochem.* **29**: 39-43.
6. **Davis, J.** 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* **264**: 375-381.
7. **Davis, P.B., M. Drumm, and M.W. Konstan.** 1996. Cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **154**: 1229-1256.
8. **Ghitescu, L., Z. Galis, and M. Bendayan.** 1991. Protein AG-gold complex: An alternative probe in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 1057-1065.

9. **Gilleland, L.B., H.E. Gilleland, J.A. Gibson, and F.R. Champlin.** 1989. Adaptive resistance to aminoglycosides antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microb.* **29**: 41-50.
10. **Hugo, P., J.W. Kappler, D.I. Godfrey, and P.C. Marrack.** 1992. A cell line that can induce thymocyte positive selection. *Nature* **360**: 679-682.
11. **Jenkinson, H.F.** 1996. Ins and outs of antimicrobial resistance: Era of the drug pumps. *J Dent Res.* **75**: 736-742.
12. **Klemens, S.P., M.H. Cynamon, C.E. Swenson, and R.S. Ginsberg.** 1990. Liposome-encapsulated-gentamicin therapy of *Mycobacterium avium* complex infection in beige mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 967-970.
13. **Marelich, G.P., and C.E. Cross.** 1996. Cystic fibrosis in adults. From the researcher to practitioner. *West J med.* **164**: 321-334.
14. **Mehta, R.T., A. Keyhani, T.J. Queen, B. Rosebaum, K.V. Rolston and J.J. Tarrand.** (1993) In-vitro activities of free and liposomal drugs against *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex and *M. tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2584-2587.
15. **Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* **264**: 382-387.
16. **Onyeji, C.O., C.H. Nightingale, P.R. Tessier, D.P. Nicolau, and L.M. Bow.** (1995) Activities of clarithromycin, azithromycin, and ofloxacin in combination with liposomal or unencapsulated granulocytes-macrophage colony-stimulating factor against intra-macrophage *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. *J. Infec. Dis.* **172**: 810-816.
17. **Ramsey, B.W.** 1996. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *New England J. Med.* **335**: 179-188.
18. **Shaw, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare, and G.H. Miller.** 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycosides-modifying enzymes. *Microb. Rev.* **57**: 138-163.
19. **Spötl, L., A. Sarti, M.P. Dierich, and J. Möst.** 1995. Cell membrane labeling with fluorescent dyes for the demonstration of cytokine-induced fusion between monocytes and tumor cells. *Cytometry* **21**: 160-169.

20. **Spratt, B.G.** 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* **264**: 388-393.
21. **Webb, M.S., N.L. Boman, D.J. Wiseman, D. Saxon, K. Sutton, K.F. Wong, P. Logan, and M.J. Hope.** 1998. Antimicrobial efficacy against an In vivo *Salmonella typhimurium* infection model and pharmacokinetics of a liposomal ciprofloxacin formulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 45-52.

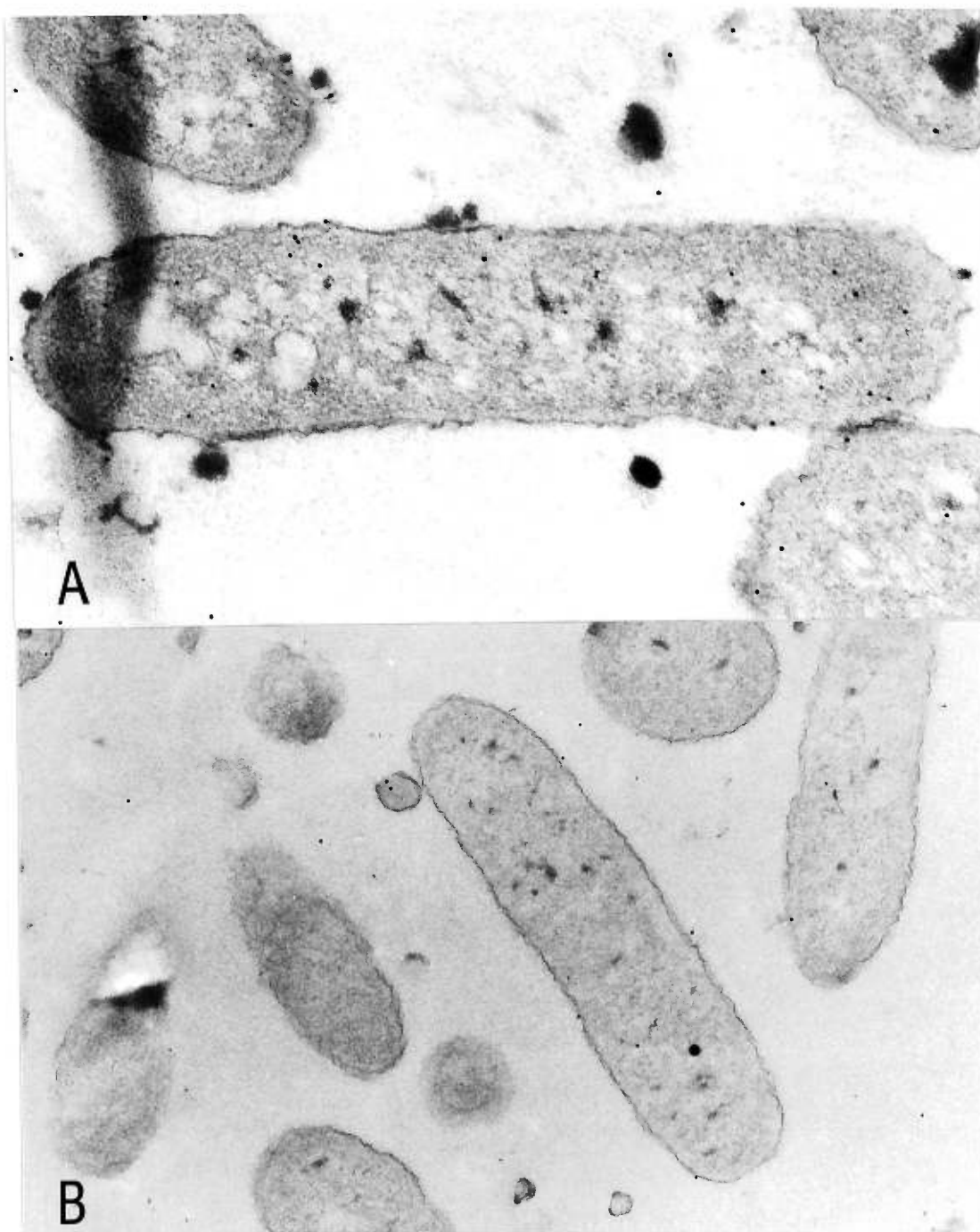


Fig. 1. Detection of tobramycin inside bacterial cells by immunogold labeling. (A) *Pseudomonas aeruginosa* 429 incubated six hours with Fluidosomes[™] (B) *Pseudomonas aeruginosa* 429 incubated six hours with free tobramycin. Magnification, A: X 57 120, B: X 51 000

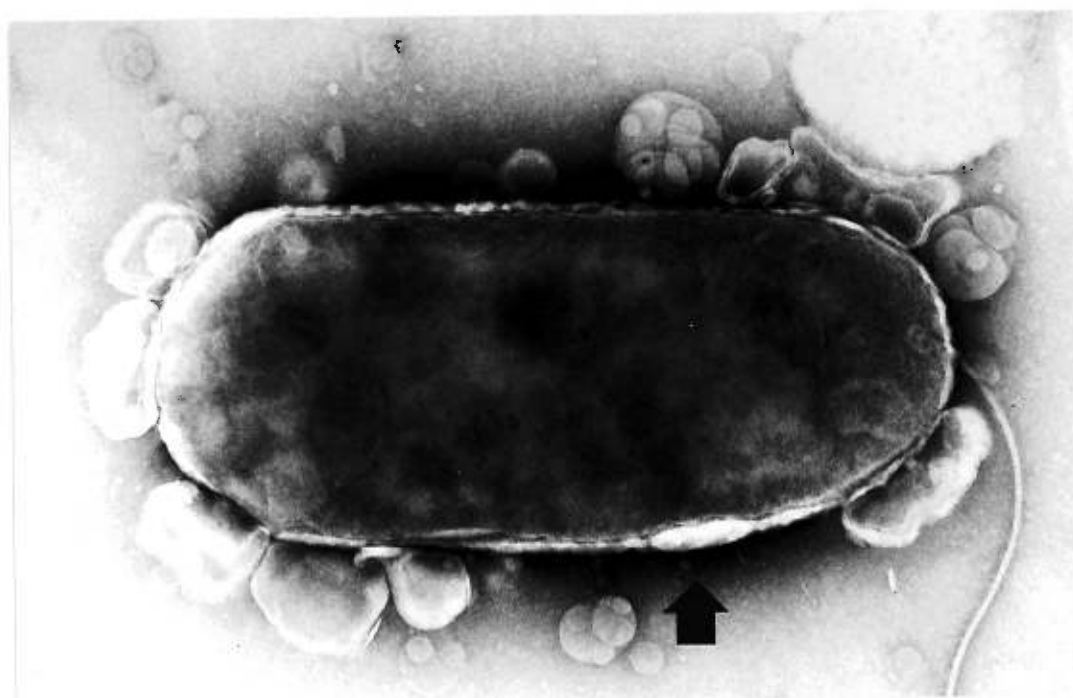


Fig. 2. Interaction of Fluidosomes[™] with *Pseudomonas aeruginosa* 429 cells as observed by negative staining with PTA. Magnification X 70 224.

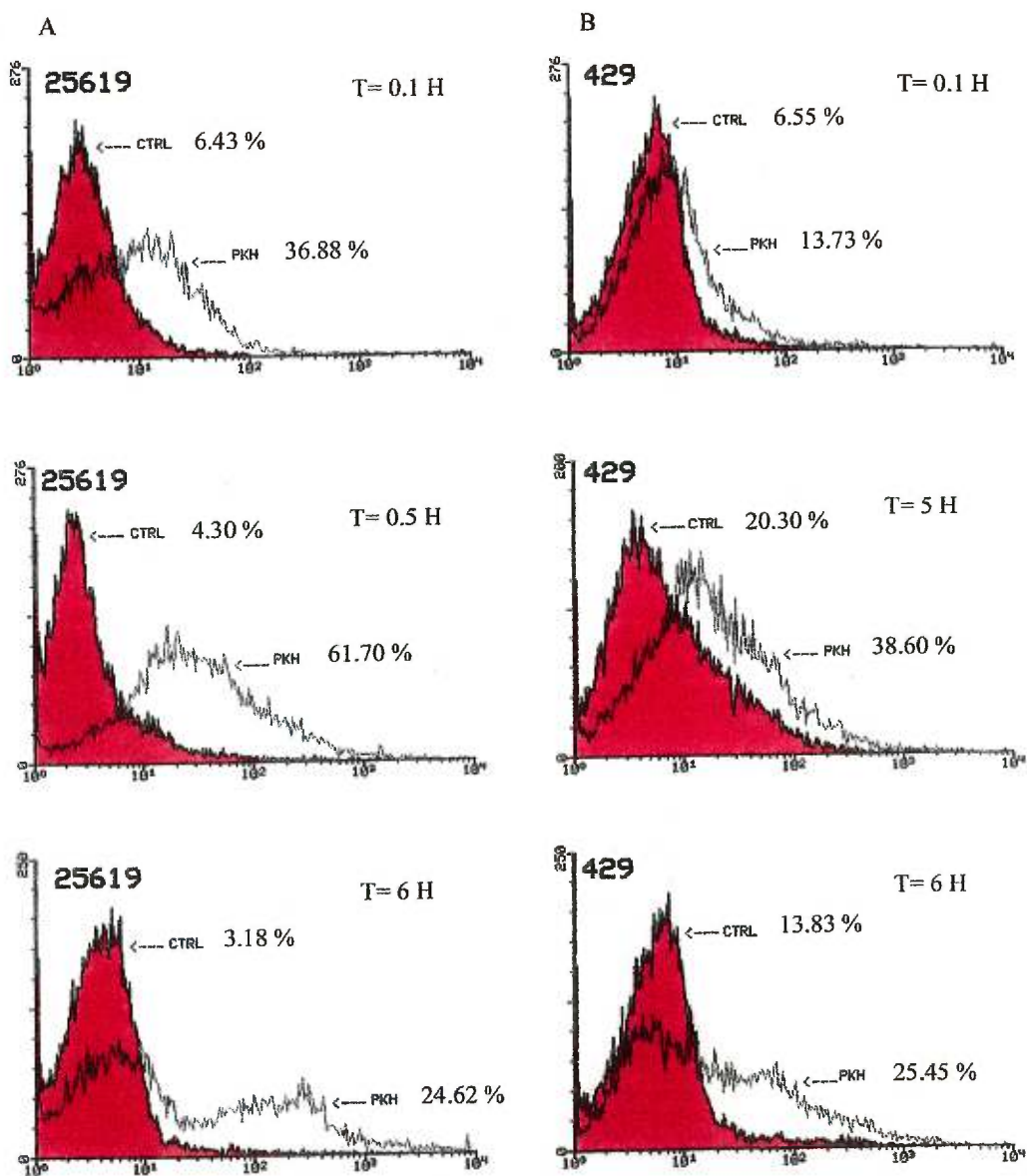


Fig. 3. Flow cytometry histograms of *Pseudomonas aeruginosa* strains ATCC 25619 (A) and 429 (B) incubated with Fluidosomes™. T, time (in hours); CTRL, negative control; PKH, Fluidosomes™ labeled with PKH. The percentages of fluorescent cells for the negative control and bacteria exposed to PKH2-GL are indicated on the figure. The X-axis represents fluorescence intensity and the Y-axis cell number.

CHAPITRE 3-ARTICLE

Evaluation of the pulmonary and systemic immunogenicity of FluidosomesTM, a liposomal-tobramycin formulation for the treatment of bacterial infections

Sébastien Sachetelli, Christian Beaulac, Renée Riffon et Jacqueline Lagacé

Département de Microbiologie et Immunologie
Université de Montréal
Montréal, Canada

Article accepté pour publication dans *Biochimica et Biophysica Acta*, General subjects 1999

Evaluation of the pulmonary and systemic immunogenicity of FluidosomesTM, a fluid liposomal-tobramycin formulation for the treatment of chronic infections in lungs.

Sébastien Sachetelli, Christian Beaulac, Renée Riffon and Jacqueline Lagacé*

Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

*: Corresponding author. Tel.: (514) 343-2180; Fax: (514) 343-6358

E-mail: jacqueline.lagace@umontreal.ca

Key words: Immunization, Liposomes, Antibodies, ELISA, Antibiotics.

Abstract

In previous studies, we have developed a fluid bactericidal liposomal formulation containing tobramycin, called FluidosomesTM, which has been shown to be highly bactericidal both in *in vitro* and in *in vivo* studies against *Pseudomonas aeruginosa* and other related and unrelated bacteria. One foreseeable application of these FluidosomesTM is the treatment of chronic pulmonary infections in cystic fibrosis patients colonized with *P. aeruginosa* and other related bacteria. Considering the capacity of some liposomal preparations to play an adjuvant role in vaccines, the non-immunogenicity of FluidosomesTM has to be demonstrated. The systemic and local immunogenicity of FluidosomesTM were assessed by effectuating repeated intra-peritoneal (i.p.) and intra-tracheal (i.t.) immunizations in BALB/c mouse. No significant mucosal and serum immune responses against FluidosomesTM and/or tobramycin were detected as compared with pre-immune sera. These data suggest that FluidosomesTM could be administered repeatedly without adverse immune responses to control chronic pulmonary infections in cystic fibrosis.

1. Introduction

Liposomes have been adopted by numerous researchers as the delivery vehicle of choice for drugs, genes and, vaccines [1-6]. Liposomes are usually non-toxic and non-immunogenic. Depending on the composition of the liposomes, the nature of the encapsulated or of liposome-associated molecules, and the kind of association, they can be degraded by phagocytes of the reticuloendothelial system, interact with plasma proteins, or be processed by the immune system as foreign bodies and elicit an immune response [7-10]. It has also been suggested that liposomal immunogenicity could be influenced by the physicochemical properties of the phospholipids such as the gel-liquid crystalline phase transition temperature (T_C) [11,12].

During the last six years, our laboratory has investigated the potential of delivering antibiotics to extracellular infections using fluid liposomes made of phospholipids characterized by a net negative charge and a low T_C . The low T_C allows, as observed in calorimetry studies, a destabilization of the liposomal membranes starting at a temperature of 33°C and onwards [13]. These liposomes, named Fluidosomes™, have shown a marked improvement of bactericidal activity against in-vitro and in-vivo extracellular infections even when initiated with resistant strains [14,15]. Recently, it was demonstrated that the superior bactericidal effect of Fluidosomes™ results from its ability to interact directly with the bacterial outer membrane which leads to increased penetration of the drug in parallel with incorporation of the liposomal membranes in the bacterial cells (article in review).

Local treatment of pulmonary infections with *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis (CF) represent one targeted application of Fluidosomes™. Because liposomes as well as their mode of administration may affect their metabolism and thus their potential side effects, it was important to study the influence of Fluidosomes™ on the immune system. In the present work, we examined the systemic and mucosal immune response (IgM, IgG and IgA) in sera and in broncho-alveolar lavages (BALs) following intra-peritoneal (i.p.) and intra-tracheal (i.t.) administration of different concentrations of Fluidosomes™ containing tobramycin through six i.p. and three consecutive i.t. immunizations.

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of FluidosomesTM

FluidosomesTM were a generous gift from Theralipids Inc. (Ville Mont-Royal, Québec, Canada). These liposomes are composed of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) at a ratio of 18:1 (w/w). They were fabricated using the dehydration- rehydration vesicle method (DRV) as previously described [14,15,16]. Briefly, appropriate amounts of both phospholipids were dissolved in chloroform in a round-bottom flask. A lipid film is then obtained by rotoevaporation (Büchi Rotavapor) at 65°C under vacuum (Büchi vacuum controller). The lipids are then redispersed in phosphate-buffered saline (PBS) 1:20, freeze-dried at 4°C (Virtis Genesis 12 EL console freeze dryer, Canberra Packard, Ontario, Canada) and kept at -70 °C until use. Lyophilized phospholipids (345 mg) were rehydrated with either 3.75 ml of PBS or tobramycin sulfate in PBS at a concentration of 40 mg/ml (Nebcin, Elli Lilly, Ontario, Canada). The liposomal mixture was then incubated at 65 °C for 60 min. with vigorous vortexing every 10 min. The preparation was then extruded successively at 65 °C through polycarbonate membranes of 1.0, 0.6 and 0.4 µm, respectively. The extruded liposomes were then washed twice by centrifugations (5000 g, 4°C, 20 min.) to remove unencapsulated tobramycin. To obtain immune sera against liposomes as a positive control, lipid A (Monophosphoryl from *E. Coli*, Sigma, St-Louis, MI) at a concentration of 20 µg µmol⁻¹ of lipids was mixed with the other phospholipids during the first step of liposome preparation. Tobramycin concentration in FluidosomesTM was determined by HPLC analysis as described previously [14]. The phospholipid concentration in FluidosomesTM was determined colorimetrically with ammonium ferrothiocyanate [17].

2.2 Immunizations

Female BALB/c mice, ages 6-8 weeks, were obtained from Charles-River (Saint-Constant, Québec, Canada). The animals had free access to food and water. A total of 107 mice divided into 17 groups (A to Q) were either i.p. or i.t. immunized with different concentrations of liposomes (0.8 µmole to 4 µmoles) containing tobramycin or PBS as displayed in Table 1. To get positive controls for the ELISA, 5 mice were hyperimmunized with FluidosomesTM-PBS containing lipid A (Table 1, group A). Mouse pre-immune sera,

used as negative control in the ELISA, were collected and pooled 24 h prior to the start of the immunizations. For the i.p. immunizations, mice were injected with 0.5 ml of the different liposomal mixtures (Table 1, groups A to H). After the first immunization, booster shots were administered after 7, 14, 21, 28, and 35 days for groups C to H (Table 1) and 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49 days for groups A and B (Table 1). ELISA results were obtained from sera collected 7 days after the last boost. The harvested serum was kept at -20°C until analysis.

For i.t. immunization, mice were anesthetized with a mixture of ketamin hydrochloride (70 mg) / xylazin (7 mg) (CDMV, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada) per kg of body weight. Volumes of 0.025 ml of FluidosomesTM, free tobramycin or PBS, were loaded in a 1cc syringe connected to an 18-gauge catheter. The catheter was then inserted in the trachea just above the bronchiolar tree as previously described [18]. After verification of the position of the catheter by formation of condensation on a cold mirror, the solution was injected. Inoculation was followed by a bolus of air to disperse the solution into the lungs. Following instillation, the animal's head was immediately elevated approximately 30° above the horizontal plane and maintained in this position until they recovered from the anesthesia. Mice were checked regularly to make sure that breathing was not impeded in anyway until they regained consciousness. Mice were immunized every two weeks for a total of 3 injections. Blood was taken 7 days after the third immunization. To determine the production of IgA antibodies in BALs, groups were randomly separated in halves at the end of the study and BALs were done. The harvested sera and BALs were tested by ELISA.

2.3 Evaluation of antibodies in serum and BAL by ELISA

To determine the antibody titer in sera and BALs, an ELISA assay using Alcian blue pre-treated microtiter plates was used as previously described [19,20]. Briefly, microtiter plates were treated by filling the wells with 100 µl of 1 % Alcian blue (w/v) in 3% acetic acid (v/v) and incubating them for 30 min. at 37°C. The plates were then washed twice with PBS, pH 7.2 and dried at room temperature. Antibodies were detected by using an indirect ELISA procedure as previously described [19,20]. Microtiter plates were coated at 4 °C overnight with 100 µl of either FluidosomesTM-PBS or free tobramycin at concentrations of

250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of phospholipids or 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of tobramycin in carbonate buffer 0.05M, pH 9.6. After washing with 0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.2, plates were incubated for 30 min at 37 °C with PBS containing 1 % (w/v) skim milk (Carnation) (PBS-M) to saturate non-specific binding sites. Sera and BALs were diluted 1/100, 1/500 and 1/1000 in PBS-M and incubated in triplicate for 1 h at 37 °C. Positive controls, which consisted of mouse anti-liposome antibodies diluted 1/100 were obtained from immunizations with lipid A associated to FluidosomesTM-PBS prepared as previously described [19]. Goat serum antibodies to tobramycin were obtained commercially (Cederlane, Ontario) and diluted 1/150. Following washes, the plates were incubated 1 h at 37°C with alkaline phosphatase goat anti-mouse IgG + IgM + IgA antibodies (H+L) diluted 1/3000 in PBS-M or swine anti-goat antibodies diluted 1/1000 (Cederlane, Ontario, Canada). After the incubation, plates were washed three times in PBS-T and two times in diethanolamine 10 mM and 0.5 mM MgCl_2 , pH 9.5 (alkaline phosphatase buffer). pNPP dissolved at 1 mg ml^{-1} in alkaline phosphatase buffer was then added and the plates were incubated for 1 h at room temperature. The absorbance was read spectrophotometrically after 1 h at 410 nm (570 nm reference) using a microtiter plate reader (Dynatech MR7000, Dynatech, Denkendorf, Germany). A preliminary ELISA test was also performed using alkaline phosphatase goat anti-mouse specific to IgG only (Cederlane, Ontario, Canada).

Isotyping of antibodies, detected in positive control sera and in rare mouse sera showing O.D. values near 0.100, was performed by an ELISA procedure as described above with small modifications. After coating of the plates overnight with FluidosomesTM-PBS and incubating with sera diluted 1/100 for 1 h at 37°C, rat anti-mouse isotype antibodies to IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM and IgA from an isotyping kit (Pharmingen, MAB isotyping kit, ca. No 04017K, Ontario, Canada) were added to the plates. The plates were then incubated 1 h at 37°C and washed three times with PBS-T. Anti-rat IgG antibodies (H+L) coupled to alkaline phosphatase diluted 1/1000 were added. After incubation for 1 h at 37°C, plates were washed three times with PBS-T and two times with diethanolamine 10 mM and 0.5 mM MgCl_2 , pH 9.5 (alkaline phosphatase buffer). PNPP dissolved at 1 mg ml^{-1} in alkaline phosphatase buffer was added and the plates were incubated for 1 h at room

temperature. The absorbance was read spectrophotometrically after 1 h at 410 nm (570 nm reference) using a microtiter plate reader (Dynatech, Denkendorf, Germany).

2.4 Data analysis

All the data was analyzed using Microsoft Excel version 5.0.

3. Results

3.1 Intra-peritoneal immunizations

Positive control serum was obtained following immunization of mice with lipid A associated with FluidosomesTM-PBS. At a dilution of 1/100, this pooled serum from 5 mice gave a mean O.D. value of 0.710 (Table 2). Isotype testing showed that the positive control serum was composed mainly of IgM antibodies, 87% and of IgG₁, 13%. Positive control serum against tobramycin (commercial source) gave a mean O.D. value of 0.463. Following six i.p. immunizations with different concentrations of FluidosomesTM (0.6 μ moles to 4 μ moles of phospholipids) and /or with tobramycin (0.026 to 0.2 mg), no significant ELISA values were obtained. After subtraction of ELISA values obtained with pre-immune sera, the 1/100 diluted sera gave maximal O.D. values of ≤ 0.080 and ≤ 0.059 , respectively, for antibodies to liposomes and tobramycin (Table 2). To simplify the presentation of the results, only values obtained from the 1/100 dilutions are detailed. With the 1/500 and 1/1000 dilutions, mean O.D. values were ≤ 0.021 and ≤ 0.004 , respectively. In addition, no significant ELISA values were observed against free or encapsulated tobramycin (Table 2). Moreover, no difference was observed between ELISA values obtained with FluidosomesTM-PBS and with FluidosomesTM-tobramycin concerning the presence of antibodies to tobramycin (Table 2).

3.2 Intra-tracheal immunizations

Because it is anticipated that FluidosomesTM will be administered directly in the lungs by aerosols, it was important to study local and systemic responses following this route of administration. To control with precision the quantity of FluidosomesTM administered in the lungs, immunizations were performed by the intra-tracheal route. The organization of the groups is displayed in Table 1 (I-Q) and the results obtained are

summarized in Table 3. Each group was tested for the presence of antibodies against liposomes and tobramycin after 3 immunizations. Again for simplicity, only 1/100 dilution data are presented. The same positive sera against liposomes and tobramycin used in ELISA following i.p. immunizations were used in tests following i.t. immunizations. After subtraction of ELISA values obtained with pre-immune sera, the maximal O.D. values obtained with 1/100 dilutions was 0.056 for liposomes and 0.006 for tobramycin (Table 3). Results obtained with dilutions of 1/500 and 1/1000 gave a mean O.D. \leq 0.020 for liposomes and \leq 0.009 for tobramycin. Isotyping of the small levels of antibodies obtained showed that their composition was predominantly IgM (97 %) and IgG (3 %) antibodies. BALs were also assayed to determine the presence of IgA antibodies. No antibodies against FluidosomesTM or tobramycin could be detected in the ELISA (data not shown).

4. Discussion

Liposomes by themselves have been generally shown not to be immunogenic [21,22] with a few exceptions [9]. When combined with drugs or antigenic molecules, this may change because of the adjuvant effect of the liposomes [23]. Several factors have been proven to influence the immunogenic properties of liposomes. These include charge on the liposomal surface, lipid composition, size and T_C [11-12]. For example, a stronger *in vivo* toxicity of positively charged liposomes over neutral and negatively charged liposomes has been observed [24]. However, there is still controversy on the subject of charge in regards to immunogenicity. Some immunological studies show that a negative or neutral charge works better to produce an immune response [25] while other show that positively charged liposomes work as well or even better than neutral and negatively charged phospholipids [26-29].

Lipid composition also influences the immunogenic and toxicity properties of liposomes. For example, the low immunogenicity of liposomes was reported as related to remarkably poor antigenic properties of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine [30], in contrast to other phospholipids, such as cardiolipin, phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol, or phosphatidic acid [22]. The size of liposomes also plays a role in immunogenicity. The small size of liposomes (< 110 nm) was shown to be critical in the

uptake by macrophages and subsequent processing for antigen presentation [31]. The bigger the liposomes are, the more chances they have of inducing an immune response [31]. In this sense, FluidosomesTM with a diameter of 400 nm could have the possibility of enhancing an immune response if other complementary characteristics had been present. It was observed that the T_C of liposomes could increase their immunogenicity at extreme values like high T_C (≥ 54 °C) or very low T_C (-10 °C) [9, 12]. The T_C of FluidosomesTM, 37°C, does not seem to favor an increase of immunogenicity.

The present study shows that no significant immune response can be elicited against phospholipids or tobramycin after six i.p. administrations of FluidosomesTM (Table 2). After subtraction of ELISA values obtained with pre-immune sera, only very low levels of antibodies to liposome and tobramycin could be detected (Table 2). The presence of tobramycin or PBS in the liposomes did not influence the production of antibodies against liposomes or tobramycin. This shows that encapsulation of tobramycin has no adjuvant effect. The only way to enhance an immune response against FluidosomesTM was to incorporate lipid A in the vesicle's membranes. The antibodies then produced against FluidosomesTM were mainly of the IgM class. This was not surprising since lipids generally induce a T-independent antigen response that is expressed by the production of IgM antibodies. Antibody response to tobramycin was similar to the response against FluidosomesTM (Table 2). Following three intra-tracheal immunizations, only very low levels of anti-liposome antibodies were detected (Table 3). These levels were similar to the levels detected after i.p. immunizations. The corresponding level of antibodies to tobramycin was essentially undetectable. The humoral immune response was made essentially of IgM and no antibodies were detected in BALs.

Since numerous factors can influence the immunogenicity of liposomes and /or encapsulated drugs, the necessity to demonstrate the non-immunogenicity of FluidosomesTM before considering repeated administration in patients was warranted. In the present study, we show that FluidosomesTM are not immunogenic even after i.p. and i.t. hyperimmunizations whether or not they are associated with tobramycin. This result is quite important since it demonstrates that the potential benefits of FluidosomesTM will not be

compromised due to associated immune responses. Complementary pre-clinical studies are in progress and clinical studies are anticipated in a near future.

Acknowledgment

This work was supported by a grant of the Canadian Cystic Fibrosis Foundation.

References

- [1] N.M. Sanderson, B. Guo, A.E. Jacob, P.S. Handley, J.G. Cunniffe, M.N. Jones, *Biochim. Biophys. Acta* 1283 (1996) 207-214.
- [2] N.M. Sanderson, M.N. Jones, *J. of Drug Targeting* 4 (1996) 181-189.
- [3] H.K. Johansen, *APMIS* 104 (suppl. 63) (1996) 5-42.
- [4] R.G. Crystal, N.G. McElvaney, M.A. Rosenfeld, C.S. Chu, A. Mastrangeli, J.G. Hay, S.L. Brody, H.A. Jaffe, N.T. Eissa, C. Danel, *Nature Genetics* 8 (1994) 42-51.
- [5] N.C. Phillips, J. Dahman, *Immun. lettres* 45 (1995) 149-152.
- [6] C.R. Alving, *J. Immunol. Methods*, 140 (1991) 1-13.
- [7] C.R. Alving, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 754 (1995) 143-152.
- [8] J. Szebeni, *Crit. Rev. in Therap. Drug Carrier Sys.* 15 (1998) 57-88.
- [9] R. Desjardins, K. Krzustyniak, H.M. Thérien, W. Banska, P. Tancrede, M. Fournier, *Int. J. Immunopharmac.* 17 (1995) 367-374.
- [10] M. Friede, S. Muller, J.P. Briand, M.H. Van Regenmortel, F. Schuber, *Mol. Immunol.* 30 (1993) 539-547.
- [11] G. Gregoriadis, C. Panagiotidi, *Immun. Lett.* 20 (1989) 237-240.
- [12] G. Gregoriadis, *Immun. Today* 11 (1990) 89-97.
- [13] C. Beaulac, Master thesis, Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), (1996), p 69.
- [14] C. Beaulac, S. Clément-Major, J. Hawari, J. Lagacé, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 1090-1095.
- [15] C. Beaulac, S. Sachtelli, J. Lagacé, *J Antimicrob. Chemother.* 41 (1998) 35-41.
- [16] C. Beaulac, S. Clément-Major, J. Hawari, J. Lagacé, *J Microencapsulation* 14 (1997) 335-348.

- [17] J.C.M. Steward, *Analyt. Biochem.* 104 (1980) 10-14.
- [18] A. Omri, C. Beaulac, M. Bouhajib, S. Montplaisir, M. Sharkawi, J. Lagacé, *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994) 1090-1095.
- [19] M. Laakel, M. Bouchard, J. Lagacé, *J. Immun. Methods* 190 (1996) 267-273.
- [20] S. Sachetelli, C. Beaulac, J. Lagacé, *Biochim. Biophys. Acta.* 1379 (1998) 35-41.
- [21] B.G. Schuster, M. Neidig, B.M. Alving, C.R. Alving, *J. Immunol.* 122 (1979) 900-905.
- [22] N. Van Rooijen, R. Van Nieuwmegen, *Meth. Enzym.* 93 (1983) 83-95.
- [23] N.C. Phillips, L. Gagné, N. Ivanoff, G. Riveau, *Vaccine* 14 (1996) 898-904.
- [24] E. Mayhem, E. Ito, R. Lazo, *Exp. Cell Res.* 171 (1987) 195-202.
- [25] A.C. Allison, G. Gregoriadis, *Nature* 252 (1974) 252.
- [26] T.D. Heath, D.C. Edwards, B.E. Ryman, *Biochem. Soc. Trans.* 4 (1976) 129-133.
- [27] N. Van Rooijen, R. Van Nieuwmegen, *Immunol. Commun.* 9 (1980) 243-256.
- [28] N.A. Latif, B.K. Bachhawat, *Immunol. Lett.* 15 (1987) 45-51.
- [29] Q. Bakouche, F. David, D. Gerlier, *Eur. J. Immunol.* 17 (1987) 1839-1842.
- [30] P.C. Calder, J.A. Bond, D.J. Harvey, S. Gordon, E.A. Newsholme, *Can. J. Biochem. Physiol.* 269 (1990) 807-814.
- [31] K. Krzystyniak, R. Desjardins, H.M. Thérien, W. Banska, P. Tancrede, J. Descotes, *Int. J. Immunopharmac.* 16 (1994) 817-824.

Table 1
Identification of the different groups of mice submitted to intra-peritoneal and intra-tracheal immunizations

Group	Number of mice	Contents of injections given
Intra-peritoneal immunizations		
A	5	Fluidosomes™ -PBS with lipid A (0.8 µmole); Positive control
B	5	Fluidosomes™ -PBS without lipid A (0.8 µmole); Negative control
C	3	Fluidosomes™ -tobramycin; 0.6 µmole of phospholipids (0.4 mg)
D	3	Fluidosomes™ -tobramycin; 1.4 µmole of phospholipids (1 mg)
E	3	Fluidosomes™ -tobramycin; 4 µmole of phospholipids (3 mg)
F	3	Fluidosomes™ -PBS; 0.6 µmole of phospholipids (0.4 mg)
G	3	Fluidosomes™ -PBS; 1.4 µmole of phospholipids (1 mg)
H	3	Fluidosomes™ -PBS; 4 µmole of phospholipids (3 mg)
Intra-tracheal immunizations^a		
I	9	Fluidosomes™ -tobramycin, 0.5 mg lipids (0.65 µmole)
J	9	Fluidosomes™ -tobramycin, 1 mg lipids (1.4 µmole)
K	9	Fluidosomes™ -tobramycin, 2 mg lipids (2.63 µmole)
L	9	Fluidosomes™ -PBS, 0.5 mg lipids (0.65 µmole)
M	9	Fluidosomes™ -PBS, 1 mg lipids (1.4 µmole)
N	9	Fluidosomes™ -PBS, 2 mg lipids (2.63 µmole)
O	8	0.15 mg of free tobramycin
P	9	1 mg of Fluidosomes™ -PBS + 0.15 mg of free tobramycin
Q	8	PBS control

^aHalf of each group of mice in the intra-tracheal immunizations were taken for broncho- alveolar lavages

Note: Tobramycin concentration in the liposomes used for intra-peritoneal and intra-tracheal immunizations were of 0,026 mg (group C), 0,07 mg (group D) and 0,2 mg (group E) respectively for the i.p. immunizations and 0,15 mg for the i.t. immunizations

Table 2
Mouse sera tested by ELISA to detect antibodies against Fluidosomes™ and tobramycin following 6 intra-peritoneal immunizations.

Group identity	Dilution of sera	Anti-liposome antibodies (Mean O.D.^a ± S.E.M.)	Anti-tobramycin antibodies (Mean O.D.^a ± S.E.M.)
Positive control (A)	1/100	0.710 ± 0.015	0.463 ± 0.041
Pre-immune sera ^b	1/100	0.065 ± 0.006	0.040 ± 0.003
C	1/100	0.080 ± 0.044	0.059 ± 0.032
D	1/100	0.036 ± 0.026	0.036 ± 0.018
E	1/100	0.041 ± 0.013	0.033 ± 0.018
F	1/100	0.030 ± 0.008	0.027 ± 0.021
G	1/100	0.052 ± 0.039	0.043 ± 0.025
H	1/100	0.027 ± 0.006	0.040 ± 0.006

^a O.D. means optical density at 410 nm

^b These values were subtracted from the experimental values to obtain the responses due to immunizations

Table 3
Mouse sera tested by ELISA to detect antibodies against Fluidosomes™ and tobramycin following 3 intra-tracheal immunizations.

Group identity	dilution of sera	Anti-liposome antibodies (Mean O.D.^a ± S.E.M.)	Anti-tobramycin antibodies (Mean O.D.^a ± S.E.M.)
Positive control (A) ^b	1/100	0.741 ± 0.050	0.326 ± 0.030
Pre-immune ^c	1/100	0.077 ± 0.009	0.061 ± 0.008
	1/100	0.016 ± 0.024	0.006 ± 0.012
	1/100	0.056 ± 0.051	0.003 ± 0.007
	1/100	0.019 ± 0.026	0.005 ± 0.013
	1/100	0.007 ± 0.010	N.D. ^d
	1/100	0.048 ± 0.034	N.D. ^d
	1/100	0.015 ± 0.021	N.D. ^d
	1/100	N.D. ^d	0.002 ± 0.005
	1/100	0.008 ± 0.017	0.000 ± 0.001
Q	1/100	0.006 ± 0.010	0.000 ± 0.001

^a O.D. stands for optical density

^b For tobramycin, the dilution was 1/150

^c The values of pre-immune sera were subtracted from the experimental values to obtain the response due to the immunizations.

^d N.D.: Not determined

CHAPITRE 4- ARTICLE

AMINOGLYCOSIDE DETECTION USING A UNIVERSAL ELISA BINDING PROCEDURE ONTO POLYSTYRENE MICROTITER PLATE IN COMPARISON WITH HPLC ANALYSIS AND MICROBIOLOGICAL AGAR-DIFFUSION ASSAY

Sébastien Sachetelli, Christian Beaulac, Jacqueline Lagacé

Département de Microbiologie et Immunologie
Université de Montréal
Montréal, Canada

Biochimica et Biophysica Acta 1379 : 35-41, 1998.



Aminoglycoside detection using a universal ELISA binding procedure onto polystyrene microtiter plates in comparison with HPLC analysis and microbiological agar-diffusion assay

Sébastien Sachetelli, Christian Beaulac, Jacqueline Lagacé *

Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montreal, Québec H3C 3J7, Canada

Received 21 March 1997; revised 9 June 1997; accepted 11 June 1997

Abstract

The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of aminoglycosides has been hindered due to low molecular weight compound adsorption to solid phases. Here, we describe an enzyme-linked immunosorbent assay based on the treatment of polystyrene microtiter plates with Alcian blue prepared in acetic acid prior to coating with the antibiotic. Whereas no detection of tobramycin was possible on commercially treated or untreated enzyme-linked immunosorbent assay plates, the Alcian blue treatment permitted detection of 0.025 and 0.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of tobramycin respectively using 0.05 and 0.1% of Alcian blue with a coefficient of variation of 1.85 and 7.69%, respectively. Comparative studies of five tobramycin samples of unknown quantity using enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography gave equivalent results while those done via microbiological agar-diffusion assay were an overestimation of the actual quantity. The use of the Alcian blue pretreatment enzyme-linked immunosorbent assay procedure has permitted, in previous studies, the measure of antibodies against synthetic peptides and phospholipids. Subsequently, our demonstration of the sensitivity and reliability of this method in the quantification of tobramycin strongly suggests that the use of Alcian blue pretreatment in enzyme-linked immunosorbent assay can be applied universally to avert molecule immobilization problems on solid phases. © 1998 Elsevier Science B.V.

Keywords: ELISA; Antibiotic; Alcian blue; Drug quantification; Aminoglycoside

1. Introduction

Methods of detection and quantification of antibiotics are important tools for basic research in many fields. The current research methods for detection of tobramycin or other aminoglycosides are mainly mi-

crobiological agar-diffusion (M-agar) assay [1,2] and high-performance liquid chromatography (HPLC) [3–5]. M-agar, the most commonly used method, is time consuming and more qualitative approach than HPLC, a very accurate method, which requires derivatization treatment of samples and a very expensive apparatus.

The use of conventional immunoassays to detect aminoglycosides is not practical because haptens or small molecular weight compounds like antibiotics adsorb very poorly or not at all to solid phases. For

* Corresponding author. Fax: +1-514-3435701; E-mail: lagacej@ere.umontreal.ca

reason, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique has been conceived for the detection of aminoglycosides by immobilizing antibody on a solid support [6], thereby requiring an antigen-antibody conjugate specific to each assay. Moreover, the antibody capture technique can present difficulties in such a way that the accessibility of the antigen is greatly decreased and the binding of specific antibody-conjugate is consequently lowered or completely hindered. In addition, there is crystallographic evidence that the binding domain is able to undergo reversible conformational changes upon ligand binding [7,8].

Recently, we reported a simple ELISA procedure for the detection of tobramycin on pretreatment of plates with Alcian blue dissolved in acetic acid to measure antibodies to phospholipids and phospholipids [9,10]. In this present study, we report a novel approach for the detection and quantification of one aminoglycoside using an ELISA, via immobilizing the drug on polystyrene microtiter plates by simple adsorption. The quantification of tobramycin by Alcian blue-pretreated plates in ELISA was compared to HPLC and M-agar methods. The results demonstrate that the ELISA and HPLC techniques detect tobramycin quantity approximately in the same range, whereas the M-agar assay is likely to overestimate the amount of antibiotic.

Materials and methods

Chemicals

Alcian blue (Cat. No. A-5268) was purchased from Sigma (St. Louis, MI). Polystyrene microtiter plates (Cat. No. 82.1581.100) were purchased from Corning Costar (Montreal, Canada) (commercially treated plates for enhanced binding from two companies were assayed but did not work well for this kind of assay). The antibiotics used for the investigation were as follows: Gentamycin sulfate, streptomycin sulfate, kanamycin sulfate and tobramycin sulfate. Other chemicals were from Sigma.

Antibodies

The following antibodies were used in the ELISA procedure: goat anti-tobramycin Igs and affinity puri-

fied swine anti-goat IgG coupled to alkaline phosphatase (Cerdarlane Lab., Canada).

2.3. Pretreatment procedure and ELISA

Alcian blue pretreatment of polystyrene ELISA plates was performed as described previously with slight modifications [9]. Briefly, microtiter plates were incubated for 30 min at 37°C with 100 μ l well⁻¹ of either 1, 0.3, 0.1 or 0.05% w/v of Alcian blue dissolved in 3% acetic acid, which was filtered prior to use on Whatmann paper no 3 and on a Bucher funnel (No. 3606060M). After Alcian blue incubation, the plates were washed twice with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) and dried at room temperature. The microtiter plates were then coated overnight at room temperature or alternately 2 h at 37°C with 100 μ l of either tobramycin in concentrations ranging from 0.025 to 6 μ g ml⁻¹ or samples of unknown concentrations (60, 35, 25, 5 and 1 μ g ml⁻¹) of tobramycin in 0.05 M carbonate buffer at pH 9.6. The plates were then washed twice with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T). To saturate non-specific binding sites, 200 μ l of skim milk (powder) dissolved in PBS containing 0.05% Tween 20 was added to each well and the plates were incubated for 30 min at 37°C. After the incubation, a wash was done with PBS-T and 50 μ l of goat anti-tobramycin antibodies diluted 1/150 in PBS milk 1% (PBS-M) was added to each well. Since these antibodies gave a positive signal at a dilution of 1/1000, a dilution of 1/150 was used because a maximum signal can be obtained. These plates were incubated for 1 h at 37°C with 5% CO₂ and washed 3 times with 200 μ l of PBS-T. A volume of 100 μ l of swine anti-goat IgG coupled to alkaline phosphatase diluted 1/1000 in PBS-M was added to the wells and incubated for 1 h at 37°C with 5% CO₂. After the incubation, the plates were washed 3 times with PBS-T and rinsed 2 times with 200 μ l of alkaline phosphatase buffer (10 mM diethanolamine containing 0.5 mM MgCl₂ at pH 9.5). *p*-Nitrophenyl phosphate was dissolved at a concentration of 1 mg ml⁻¹ in alkaline phosphatase buffer and 50 μ l was added to each well. After 1 h in the dark, absorbance was measured at 410 nm (reference wavelength 570 nm) using a microplate reader (Dynatech MR7000, Dynatech, Denkendorf, Germany).

2.4. HPLC

For comparison, tobramycin was analyzed by HPLC [5]. This tobramycin is 1-fluoro-2,4-diaminocyclohexane-1-carboxylic acid maintained in 100% MeOH. The sample was diluted in PBS and centrifuged at 1000 g for 5 min. The supernatant containing tobramycin (1 μ g l⁻¹) prep buffer (pH 6.5) was added, vorticed and then cooled. Standards were added in amounts of 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ng. The correlation chromatogram was obtained at concentrations of five quantities. The concentration of tobramycin was determined by the assay. The results were 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1.2% for in

2.5. Microb

Tobramycin samples were analyzed as described [11]. Briefly, 25619 was analyzed in PBS to 0.1 and 1.0 land units. The results were added to 2 laboratories glass plates placed in a incubator and incubated. Duplicate 2 and compared. The conce

2.4. HPLC analysis

For comparison studies, unknown samples of tobramycin (60, 35, 25, 5 and 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) in PBS were submitted to HPLC analysis as previously described [5]. This accurate quantification method of tobramycin is based on derivatization of the latter with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. Briefly, tobramycin contained in PBS samples was extracted as follows: a 100- μl portion of the sample was added to 1 ml of MeOH. The mixture was then vortexed for 1 min and incubated at 65°C for 30 min. A 900 μl portion of PBS was then added, vortexed for 1 min, and centrifuged at 5000 $\times g$ for 20 min at 4°C. 170 μl of the supernatant was then transferred to a HPLC vial containing 90 μl of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (180 g l^{-1}) prepared in MeOH, 67 μl of 0.1 M borate buffer (pH 9.3) and 673 μl of MeOH. Vials were sealed, vortexed, and heated for 30 min at 85°C and then cooled at room temperature. Tobramycin standards were constructed using PBS containing known amounts of tobramycin and processed as above. A correlation coefficient of 0.99 was observed for the chromatographic peak areas and the tobramycin concentrations between 2 and 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Three sets of five quality control PBS samples at tobramycin concentrations of 3.9 to 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ were analyzed to determine the intraday and interday variabilities of the assay. The coefficients of variation were of 0.01 and 0.1% for intraday measurements and 0.1 and 1.2% for interday measurements.

2.5. Microbiological assays

Tobramycin quantification present in unknown samples as well as in standard solutions were also analyzed using M-agar assay as previously described [11]. Briefly, a 17 h culture of *P. aeruginosa* ATCC 25619 was washed by centrifugation and resuspended in PBS to obtain a standard solution of 0.5 McFarland units. 11.5 ml of this bacterial solution was then added to 250 ml of antibiotic medium 5 (Difco laboratories, Detroit, MI) and poured rapidly onto glass plates. 25 μl of samples or standards were placed in duplicate in agar wells (5-mm diameter) and incubated overnight at 37°C under 5% CO_2 . Duplicate zone inhibition diameters were averaged and compared with a series of tobramycin standards. The concentrations of the unknown samples were

obtained by extrapolation based on the linear regression analysis data obtained using the standard inhibition zones.

Table 1
Intra-assay variations of tobramycin standard curves using different concentrations of Alcian blue for pre-treatment

Tobramycin concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Average OD ^a (410 nm)	%CV ^b
<i>1% Alcian blue</i>		
0	0.020	25.00
0.25	0.066	42.42
0.5	0.132	56.06
1	0.212	50.47
3	0.423	32.39
6	0.634	18.93
<i>0.3% Alcian blue</i>		
0	0.014	7.14
0.025	0.022	4.55
0.05	0.030	0.00
0.1	0.068	4.41
0.125	0.095	1.05
0.25	0.175	7.43
0.5	0.282	4.61
1	0.301	8.97
3	0.482	1.66
6	0.471	2.97
<i>0.1% Alcian blue</i>		
0	0.017	0.00
0.025	0.019	0.00
0.05	0.039	7.69
0.1	0.078	2.56
0.125	0.149	0.67
0.25	0.206	2.91
0.5	0.330	3.64
1	0.397	1.51
3	0.563	2.49
6	0.550	1.09
<i>0.05% Alcian blue</i>		
0	0.018	11.10
0.025	0.028	7.14
0.05	0.054	1.85
0.1	0.113	7.96
0.125	0.149	4.70
0.25	0.297	3.70
0.5	0.394	5.08
1	0.414	3.62
3	0.492	1.22
6	0.556	1.98

^a OD stands for optical density.

^b Coefficient of variation (%).

Data analysis

All data was analyzed with Microsoft EXCEL version 5.0. Results from the ELISA assay were analyzed using the Student t test for small sample

Results

Determination of test sensitivity and stability

Preliminary studies, using keyhole limpet hemocyanin (KLH) coupled to tobramycin as positive control, showed that the conventional ELISA used to detect different concentrations of tobramycin added on untreated microtiter plates completely lacked sensitivity (Data not shown).

In a first series of experiments performed with 1% (v/v) of Alcian blue pretreated microtiter plates, we used broad concentrations of tobramycin varying between 0.1 to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Results show that the lowest concentration of tobramycin which could be detected with 1% Alcian blue was 0.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$. In a second series of experiments using concentrations of 0.1 and 0.05% of Alcian blue, showed an enhancement in the sensitivity of this assay allowing for detection of 0.05 ($P \leq 0.05$), 0.05 ($P \leq 0.05$) and 0.15 ($P \leq 0.1$) $\mu\text{g ml}^{-1}$ of tobramycin respectively. Intra-day and inter-day variation studies were performed using the following concentrations of tobramycin: 0, 0.25, 0.5, 1, 3 and 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for 1% Alcian blue and 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.125, 0.250, 0.5, 1 and 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for 0.3, 0.1 and 0.05% Alcian blue. Intra-assay variations are shown in Table 1. The concentration of Alcian blue which gave the most sensitive detection associated to the least variation is 0.1% Alcian blue. The inter-day variation studies were performed for 1, 0.3 and 0.1% of Alcian blue (Table 2). Again, the most sensitive and reproducible results were obtained with 0.1% of Alcian blue, the coefficient of variation (expressed in percentage) ranging from 0.88 to 11.49%. To quantify high concentration samples, ten-fold dilutions must be made to obtain concentrations between 0.05 and 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tobramycin at which the test performed with 0.05–0.3% of Alcian blue is very accurate.

Table 2

Inter-assay variations of tobramycin standard curves using different concentrations of Alcian blue for pre-treatment

Tobramycin concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Average OD ^a (410 nm)	%CV ^b
1% Alcian blue		
0	0.018	11.11
0.25	0.052	26.92
0.5	0.085	52.94
1	0.192	8.85
3	0.339	21.24
6	0.487	21.36
0.3% Alcian blue		
0	0.018	22.22
0.05	0.030	0.00
0.1	0.062	9.68
0.125	0.072	30.56
0.25	0.128	36.72
0.5	0.206	36.89
1	0.244	23.77
3	0.429	12.35
6	0.454	3.96
0.1% Alcian blue		
0	0.018	5.56
0.05	0.044	11.36
0.1	0.087	11.49
0.125	0.135	10.37
0.25	0.188	9.04
0.5	0.323	1.86
1	0.408	2.94
3	0.568	0.88
6	0.500	10.20

^a OD stands for optical density.

^b Coefficient of variation (%).

3.2. Cross reactivity with various aminoglycosides

The evaluation of the anti-tobramycin antibodies cross-reactivity against other aminoglycosides showed no cross-reactivity with streptomycin and gentamycin whereas a strong cross reaction occurred with kanamycin (Table 3).

3.3. Comparison of the method with HPLC and M-agar

To compare the Alcian blue-ELISA procedure to other current methods of aminoglycoside analysis, 5 unknown samples of tobramycin (60, 35, 25, 5 and 1

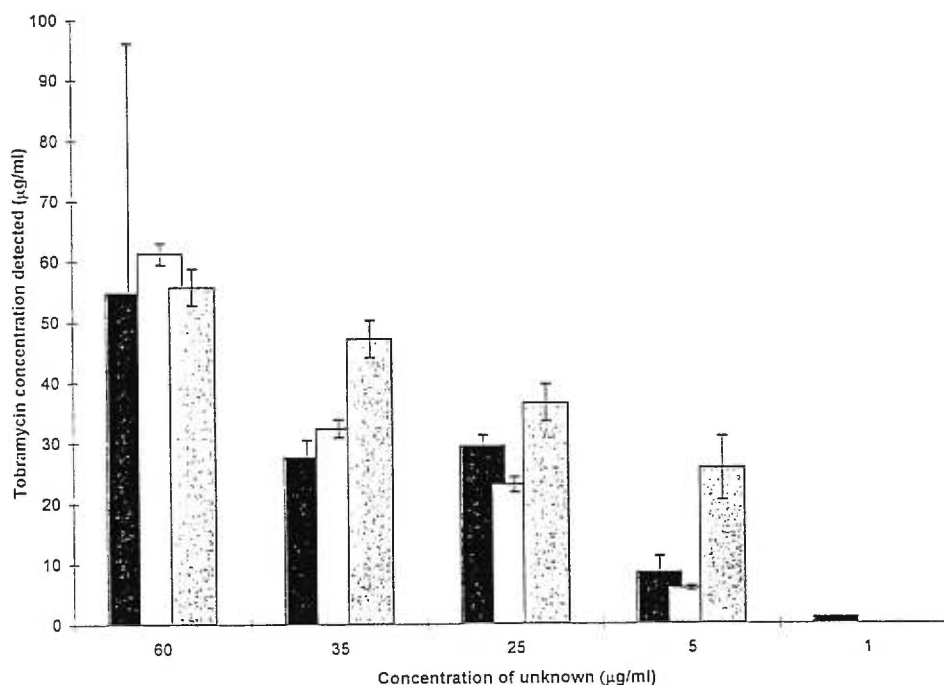


Fig. 1. Quantification of tobramycin unknowns by ELISA (■), HPLC (□) and microbiological agar-diffusion assay (▨). Each unknown was analyzed in triplicate. Unknowns contained respectively 60, 35, 25, 5 and 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of tobramycin. The results are expressed as the mean tobramycin concentration \pm SEM.

$\mu\text{g ml}^{-1}$) were quantified by ELISA, HPLC and M-agar. To fall into the quantitative range of the test, \log_{10} dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) of each unknown were performed but only the dilutions of 1/10 and 1/100 were retained for quantification. The positive values obtained with the highest dilutions were selected for all unknown tobramycin determinations and compared with standard curves. It was demonstrated that the quantities determined by HPLC and ELISA were very close as shown in Fig. 1 and this in spite of the important standard error (41.27) observed in ELISA

for the unknown with a concentration of 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$. For other values of 35 $\mu\text{g ml}^{-1}$ or less, standard error for the mean was inferior to 2.98. Tobramycin quantifications performed by HPLC were very accurate but less sensitive than ELISA since the unknown containing 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ was detected only by ELISA (Fig. 1). The quantities of tobramycin analyzed by M-agar assay were generally overestimated particularly for the unknown sample corresponding to 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, which was the lowest concentration detected by this method (Fig. 1).

Table 3

Evaluation of cross reactivities of aminoglycoside analogs with the anti-tobramycin antibodies

	Cross-reactivity
Streptomycin	—
Gentamycin	—
Kanamycin	+

Aminoglycosides were used at a concentration of 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The experiment was done in 2 triplicate series and was repeated twice.

4. Discussion

The quantification of aminoglycosides is of vital importance in various fields of research. Because of its simplicity, rapidity of execution, sensitivity and low cost, ELISA has become the most universal research assay. The major limitation of this test is the inability of small molecular weight compounds to adequately bind to the solid support in standard adsorption conditions. Different treatments are used to

minimize denaturation and/or desorption of the target molecules: (1) the use of coupling agents or cyanogen bromide [12]; (2) treatment of target with carbodiimides [13]; (3) conjugation of the target to a carrier molecule such as bovine serum albumin and subsequent immobilization of the conjugate by passive adsorption [14]; (4) use of streptavidin [15], (5) antibodies [16] or (6) protein A [17]. The majority of these approaches only resolved the problem in special cases, increase the non-specific signal, and are labor intensive and/or expensive.

We have already reported a very easy and reproducible pre-treatment of ELISA microtiter plates with Alcian blue for immobilization of peptides [10] and phospholipids [11]. This method seems to be able to bind all types of molecules in a natural state without increasing the assay background and preserving the chemical properties of the solid phase. We have taken advantage of this technique in order to develop immunoprotocols aimed at the retention and quantification of tobramycin for routine analysis of multiple antibiotic samples in our laboratory.

Our assay permits the detection of tobramycin with sensitivity and acceptable accuracy. Values as low as $0.15 \mu\text{g ml}^{-1}$ of tobramycin can be detected with this procedure using 0.05% Alcian blue ($P \leq 0.1$) compared to absence of detection in the case of high concentration of tobramycin in non-Alcian blue pre-treated microtiter plates. In addition, this assay permits the quantification of tobramycin at concentrations as low as 0.025 to $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ using 0.3, 0.1 or 0.05% of Alcian blue ($P \leq 0.05$) and an upper limit of $6 \mu\text{g ml}^{-1}$ if 1% of Alcian blue is utilized. Quantification of tobramycin beyond $6 \mu\text{g ml}^{-1}$ does not require to be diluted in order to maintain accuracy of the assay. For the quantitative range of the test, mean correlation coefficients of 0.99 to 0.97 were obtained in the intra-day and inter-day variation studies indicating that this ELISA procedure for assaying aminoglycosides is reproducible within a designated range (Tables 1 and 2). The commercial anti-tobramycin antibodies used in this study cross-reacted only with one other aminoglycoside, kanamycin. This cross-reactivity was not surprising since the chemical configuration of this antibiotic is strongly related to tobramycin [18]. Thus, caution must be taken if other aminoglycosides were to be present in the same sample analyzed by this method. The problem would

be easily solved by using antibodies more specific to the aminoglycoside analyzed. As expected, the quantification of tobramycin by HPLC was very accurate (Fig. 1) while compared to the values of unknown samples analyzed ($60, 35, 25, 5$ and $1 \mu\text{g ml}^{-1}$). The results obtained with ELISA were in the same range as those obtained by HPLC which determine that this assay is reliable to measure tobramycin. However, quantification performed with the M-agar assay showed that this latter assay permits only an approximate determination of the tobramycin.

The mechanism behind Alcian blue enhancing effect on the binding capacity of polystyrene wells is unknown. A possible mechanism for the enhancement of tobramycin binding or that of other aminoglycosides may be due to the chemical properties of Alcian blue, in that it possesses various charged groups that can interact with polycationic aminoglycosides under coating conditions (at pH 9.6). Such interactions could result in the covalent binding of the antibiotic to the microtiter plates.

Using Alcian blue for immobilizing biomolecules on solid phases is technically very simple, rapid and reproducible. This method permitted the detection and quantification of tobramycin presence in a reliable way as demonstrated by HPLC analysis. Our demonstration that Alcian blue pre-treatment can permit the utilization of the ELISA technique against synthetic peptides, phospholipids and aminoglycosides, strongly supports that this assay is of universal application for molecules posing problems at the level of immobilization on solid phases.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Cystic Fibrosis Foundation.

References

- [1] M.S. Brady, S.E. Katz, *J. Assoc. Off. Anal. Chemists* 71 (1988) 717–720.
- [2] B.H. Ackerman, F.A. Dellobuono, *Pharmotherapy* 16 (1996) 201–222.
- [3] D.M. Barends, C.L. Zwaan, A. Hulshoff, *J. Chromatogr.* 225 (1981) 417–426.

- [4] D.M. Barends, C.L. Swaan, A. Hulshoff, *J. Chromatogr.* 222 (1981) 316–323.
- [5] C. Beaulac, S. Clément-Major, J. Hawari, J. Lagacé, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 665–669.
- [6] R.C. Yao, D.F. Mahoney, *J. Antibiotic* 37 (1984) 1462–1468.
- [7] E.W. Voss Jr. M.A. Dombink-Kurtzman, S.D. Miklasz, *Immun. Invest.* 17 (1988) 25–39.
- [8] L.W. Guddat, L. Shan, J.M. Anchin, D.S. Linthicum, A.B. Edmundson, *J. Mol. Chem.* 236 (1994) 247–274.
- [9] J. Lagacé, S. Arsenault, E.A. Cohen, *J. Immunol. Methods* 175 (1994) 131–135.
- [10] M. Laakel, M. Bouchard, J. Lagacé, *J. Immunol. Methods* 190 (1996) 267–273.
- [11] A. Omri, C. Beaulac, M. Bouhajib, M. Montplaisir, M. Sharkawi, J. Lagacé, *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994) 1090–1095.
- [12] F. Boudet, J. Thèze, M. Zouali, *J. Immunol. Methods* 142 (1991) 73–82.
- [13] J. Sondergard-Andersen, E. Lauritzen, K. Lind, A. Holm, *J. Immunol. Methods* 131 (1990) 99–104.
- [14] H.J. Geerligts, W.J. Weijer, W. Bloemhoff, G.W. Welling, S. Welling-Wester, *J. Immunol. Methods* 106 (1988) 239–244.
- [15] M. Suter, J.E. Butler, H. Peterman, *Mol. Immunol.* 26 (1989) 221–230.
- [16] A.D. Smith, J.E. Wilson, *J. Immunol. Methods* 94 (1986) 31–35.
- [17] P.K.M. Ngai, F. Ackermann, F. Wendt, R. Savaco, H.R. Bosshard, *J. Immunol. Methods* 158 (1993) 267–276.
- [18] Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R.F., Otterbein, E.S., 1983. *The Merck index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 10th Ed., Merck, New Jersey, pp. 1358.

CHAPITRE 5-ARTICLE

IN VITRO BACTERICIDAL EVALUATION OF A LOW PHASE TRANSITION TEMPERATURE LIPOSOMAL TOBRAMYCIN AS A DRY POWDER PREPARATION AGAINST GRAM NEGATIVE AND GRAM POSITIVE BACTERIA

Christian Beaulac, Sébastien Sachetelli, Jacqueline Lagacé

Département de Microbiologie et Immunologie
Université de Montréal
Montréal, Canada

Article accepté pour publication dans *Journal of Liposome Research*, 1999

**IN VITRO BACTERICIDAL EVALUATION OF A LOW PHASE TRANSITION
TEMPERATURE LIPOSOMAL TOBRAMYCIN FORMULATION AS A DRY
POWDER PREPARATION AGAINST GRAM NEGATIVE AND GRAM POSITIVE
BACTERIA**

BEAULAC, C., SACHETELLI, S., AND LAGACE, J.*

Department of Microbiology and Immunology
Faculty of Medicine, Université de Montréal
Case postale 6128, succursale Centre-ville
Montréal, Québec (Canada), H3C 3J7

*Corresponding author:

Phone: (514) 343 – 2180

Fax: (514) 343 – 6358

Internet: jacqueline.lagace@umontreal.ca

Abstract

In previous studies, delivery of a liquid preparation of encapsulated tobramycin in fluid liposomes, called Fluidosomes™, has showed a marked improvement in the bactericidal activity against in-vitro and in-vivo extracellular infections. To examine the possibility of developing aerosol treatment using dehydrated Fluidosomes™ for the treatment of chronic pulmonary infections, freeze-dried preparations of tobramycin and Fluidosomes™ were tested against cultures of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Bacterial colonies were enumerated 0, 1, 3, 6 and 16 h after the addition of the antibiotic. Sixteen hours post-treatment, the growth of *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* and *E. coli* in the presence of sub-minimal inhibitory concentrations of tobramycin was lowered respectively by 17, 40, 47 and 50 times in comparison with growth in the presence of free antibiotic ($P < 0.01$). No improvement was observed against *S. aureus*. Results obtained in this study suggest that: 1) the dehydrated form of liposomal antibiotic maintains the ability to increase penetration of the antibiotic in gram negative bacterial cells; 2) the development of aerosolization methods to administer dehydrated liposomes associated with high concentrations of antibiotic could be a practical and efficient way of treating chronic pulmonary infections caused by resistant bacteria.

Keywords : Aerosolization, Liposomes, *Pseudomonas aeruginosa* , Dry powder.

INTRODUCTION

Over the past 30 years several treatments have been developed to improve survival in cystic fibrosis (CF) patients, which resulted in increasing the number of children surviving to adulthood with the disease. Cystic fibrosis patients generally develop pulmonary infections with *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* followed by lung colonization with *Pseudomonas aeruginosa* and/or other related strains like *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia* (1-5). Chronic pulmonary infections with *Pseudomonas* occur in 70-90% of patients with CF and are associated with high rates of morbidity and mortality. The most common anti-Pseudomonal treatment is a combination of an aminoglycoside and a β -lactam antibiotic. In spite of the development of newer antimicrobial agents with less toxicity, tobramycin remains the drug of choice in the treatment of CF pulmonary infection (6). Nevertheless whatever the antibiotic used, chronic pulmonary infections due to *Pseudomonas* in CF patients are rarely eradicated. Recently, it was demonstrated that tobramycin encapsulated in a fluid liposomal formulation, called FluidosomesTM, succeed in eradicating a chronic pulmonary infection caused by *P. aeruginosa* in an animal model (7). Moreover, *in vitro* studies showed that sub-minimal inhibitory concentrations (sub-MIC) of FluidosomesTM reduced the growth of *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*, *E. coli* and *S. aureus* by factors of 84, 129,166, 10^5 and 10^4 times respectively comparatively to free tobramycin (8). In the aim of developing practical ways to administer FluidosomesTM to humans, aerosolization of both liquid and dehydrated liposomes was considered. Studies on dehydrated liposomes are particularly attractive since dry powder inhaler systems are known to be less time consuming and generally more effective per mg of drug than nebulized liquid drugs (9). The aim of the present study was to verify if tobramycin contained in FluidosomesTM and used as a dry powder could maintain a high level of bactericidal efficiency against *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*, *E. coli* and *S. aureus* as previously demonstrated with the liquid form of the same liposomal formulation (8).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

Clinical strains of *P. aeruginosa* (PA 429), *S. maltophilia* (XM 47), and *E. coli* (EC HB 101 NM 88) were isolated from the sputum of patients with cystic fibrosis (Sainte-Justine Hospital, Montréal, Québec, Canada). Clinical strains of *B. cepacia* (ID-28369) and *S. aureus* (LSQP 2499) were a generous gift from the Laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ). Microorganisms were stored at -70 °C in Brain Heart Infusion broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) supplemented with 10 % glycerol.

Antibiotic susceptibility testing

The free tobramycin MIC of each bacteria used in the killing curve experiments were performed by broth microdilution assay in accordance with the procedures recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (10) and confirmed by E-Test (AB BIODISK, Sweden) following the manufacturer's recommendations. Briefly, a bacterial inoculum of 50 µl corresponding to 5×10^5 colony forming units (cfu) / mL (0.02 O.D., 660 nm), were added to 50 µl of serial two-fold dilutions of free tobramycin into the wells of microtiter plates (Sarstedt, Québec, Canada). The plates were incubated at 37 °C for 20 h. prior to the determination of MICs. The MIC was defined as the lowest concentration of antibiotic which inhibited visible growth. The antibiotic concentration used in the killing curves was calculated by using 50 % or less of the MIC values obtained by microdilution and E-Test determinations. MICs were determined three times in triplicate.

Liposomal and free antibiotic dosages

Fluid liposomal encapsulated tobramycin (Fluidosomes™) or control liposomes with phosphate buffered saline (PBS) were a generous gift from Theralipids Inc. (Theralipids inc, Ville Mont-Royal, Québec, Canada). These liposomes are composed of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) in a ratio (w/w) of 18: 1. They were prepared using the dehydration-rehydration vesicle method as previously described (7, 8). Briefly, appropriate amounts of both phospholipids (343 mg in total) were dissolved in chloroform in a round-bottom flask. A lipid film was then obtained by rotoevaporation (Büchi Rotavapor) at 65°C under vacuum (Büchi vacuum controller). For each bacterium tested, amounts of tobramycin were added to the dry phospholipid film so that

the final antibiotic concentration would correspond to half of their MIC. The antibiotic was added in the following way. The lipids were redispersed either in 30 ml phosphate-buffered saline (PBS) 1:20 (liposomal-PBS) or 30 ml of PBS 1:20 containing tobramycin sulfate (Nebcin, Eli Lilly, Toronto, Ontario, Canada) at a final concentration of 50 % of the MIC of the bacteria to be tested (Fluidosomes™). Free tobramycin controls containing the same total amount of antibiotic as the corresponding Fluidosomes™ preparations were also prepared. The preparations were then equally separated (3 ml) in ten individual dosages of Fluidosomes™, free antibiotic, liposomal-PBS, and PBS. Such preparations were prepared for each bacterium tested and in duplicate for a total of 20 vials for each preparation. The preparations were afterwards placed in 10 ml lyophilization bottles and freeze-dried at 4°C in the same lyophilization cycle (Virtis Genesis 12 EL console freeze dryer, Canberra Packard, Ontario, Canada). After complete lyophilization, the vials were sealed under vacuum and stored at -70 °C until use.

To verify that the dosages used in the killing curve experiments were controlled for both antibiotic and phospholipid content, HPLC analysis and phospholipid determination of 10 individual dosages of each preparation were determined. Briefly, 10 vials of each preparation were randomly selected and rehydrated with 1.1 ml of PBS 1X. The preparations were then vigorously vortexed for 1 min. and 100 µl was then taken to be analyzed for tobramycin concentration. The remainder of the preparations (1 ml) were centrifuged at 5000g, 30 min, 4°C to evaluate the encapsulation efficiency (pellet/ supernatant) and phospholipid content. HPLC analysis was effectuated as previously described (7). The phospholipid content of each individual liposome dosages was determined using the method of Fiske and Subbarow (11).

Killing curves

In-vitro killing curves were performed as previously described (12,13) with modifications. Studies were performed in the presence of sub-MIC concentrations of free tobramycin or Fluidosomes™ and controls made of liposomal-PBS, liposomal-PBS with free tobramycin or PBS alone. Briefly, volumes of 250 mL of Proteose Peptone Broth no 2 (Difco Laboratories, Detroit, USA) were inoculated with a 17 h pre-culture of each bacterium (*P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus*) giving a stock preparation

containing a mid-logarithmic growing final inoculum of 5×10^5 cfu/ mL, as evaluated initially by O.D. at 660 nm. This value allowed control growth to reach a density of 10^8 to 10^{10} cfu/ mL. To confirm bacterial growth, culture dilutions were plated in triplicate and cfu were enumerated. All the killing tests were performed in triplicate as follows: 30 mL of the cultures described above were added directly to lyophilization vials containing dry powder doses of free tobramycin, Fluidosomes™, liposomal-PBS, free tobramycin, and PBS. Quantities of tobramycin and phospholipids contained in the dry powder preparations were controlled as described above and were exactly the same for the liposomal and free drug dosages. Cultures of *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* received respectively 30, 1, 3, 1.50 and 1 μg / mL (final concentration) of either free or encapsulated tobramycin has determined by susceptibility testing. These values represent 50% of the respective MIC of each bacterial strain. For the liposomal-PBS and free tobramycin controls, cultures were added to lyophilized liposomal-PBS, vortexed and then transferred to vials containing lyophilized tobramycin. The cultures were then incubated with agitation at 37 °C for 16 h. Samples (1 mL) were collected at regular intervals and serially diluted into sterile PBS. Viable colony-counts were determined by taking three 100 μl samples from each dilution (final dilution of 10^{-8}) and plating them on Proteose Peptone no. 2 agar (Difco Laboratories) to insure colony isolation. After an overnight incubation at 37°C in 5 % CO₂, the colonies were counted and averaged. In-vitro killing curves were performed in triplicate in three independent experiments.

Data analysis

Bacterial counts were expressed as the mean +/- standard error from the mean (S.E.M) obtained from at least three plates per dilution. All computer analysis were performed by linear regression using Microsoft EXCEL version 5.0.

RESULTS

Susceptibility testing

Comparative MIC determinations using the broth microdilution assay (BMDA) following NCCLS recommendations and E-Test gave MIC of 60, 2, 6, 1.5, 3 µg/ml respectively for *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli*, and *S. aureus*. These values were used to adjust the tobramycin concentration in the killing curve assays.

Characterization of liposomal and free tobramycin formulations

To determine that all the preparations used in the experiments were the same for a given strain, analysis of the phospholipid and antibiotic content of 10 individual dosages of each preparation for each bacterium was verified. In the 10 different preparations studied for each bacterium, an average of 31 mg ± 2.3 % of phospholipid was present. Encapsulation efficiency of the multilamellar vesicle preparations was of 73.5% ± 1.8 % for all preparations. Since the final antibiotic concentration depends on the MIC of the bacteria tested, the lipid to drug ratios were respectively of 46.86, 702.94, 281.18, 937.26 and, 702.49 mg of lipid per mg of encapsulated antibiotic for *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus*. The coefficient of variation between the different free antibiotic dosages was 0.6 %.

Comparative efficiency of dehydrated FluidosomesTM and free tobramycin

At the beginning of the bactericidal study, the mean concentrations of *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* were respectively of 2.83×10^7 , 2.48×10^8 , 5.41×10^7 , 5.62×10^7 and 3.89×10^7 cfu per mL. The number of cfu for the different bacterial strains after incubation of 1, 3, 6 and 16 h with free tobramycin, FluidosomesTM and controls are presented in Figs. 1A to 1E. As indicated in Materials and Methods, the doses of encapsulated and free tobramycin were adjusted to about 50% of the MIC resulting in concentrations of 30, 1, 3, 0.75 and 1.55 µg/ml of final antibiotic concentration respectively for *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus*. Killing curves of bacteria were evaluated by enumeration of cfu on agar plates (Fig.1A-1E). The controls consisting of

liposomal-PBS and empty liposomes with free antibiotic were not included in the figures for clarity because of the overlap of these results with the PBS control and free antibiotic respectively. As an example, the values after 16 h for the empty liposomes were $2,6 \times 10^8$, $6,35 \times 10^9$, $2,53 \times 10^{10}$, $2,25 \times 10^{10}$ and $6,37 \times 10^9$ cfu/ mL respectively for *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* comparatively to $3,35 \times 10^8$, $6,48 \times 10^9$, $2,52 \times 10^{10}$, $2,23 \times 10^{10}$ and $1,26 \times 10^{10}$ cfu/ mL for the PBS control. For the empty liposome with free tobramycin control, these values were respectively of $1,12 \times 10^9$, $1,98 \times 10^{10}$, $2,45 \times 10^{10}$, $1,33 \times 10^{10}$, $6,05 \times 10^7$ for *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* comparatively to $1,2 \times 10^9$, $1,93 \times 10^{10}$, $2,68 \times 10^6$, $1,21 \times 10^{10}$, $5,59 \times 10^7$ for the free antibiotic.

Six hours after the addition of liposomal associated-tobramycin, a bactericidal effect in *S. maltophilia*, *B. cepacia* and *E. coli* cultures could be seen. The reduction in growth was respectively of 2.5, 13.5, and 20.3 times comparatively to the same cultures treated with free antibiotic (Figure 1B, 1C and 1D). Sixteen hours after the addition of liposomal antibiotics to the same cultures, the reduction in growth reached respectively 40, 47 and 50 times the values obtained with free antibiotic ($P < 0.001$). A significant growth reduction of 17 folds in *P. aeruginosa* cultures treated with Fluidosomes™ comparatively to cultures treated with free antibiotic could only be observed after 16 h (Figure 1A). These differences are very significant ($P < 0.01$) as calculated by a student t test. In the *S. aureus* cultures, the only gram- positive strain tested, no significant difference was observed between the numbers of cfu following the addition of Fluidosomes™ and the free antibiotic. In the PBS control cultures, bacterial growth reached approximately $10^8 - 10^{10}$ cfu/ mL depending of the strain (Figure 1A-1E).

DISCUSSION

Many years of antibiotic usage have selected out drug-resistant strains that utilize different mechanisms such as permeability barriers, active efflux pumps, enzymatic inactivation and alteration of the drug's target to develop resistance (14-18). Another important cause of bacterial resistance to antibiotics that is frequently underestimated, is an adaptive unstable permeability defect that has been well documented in *P. aeruginosa*

following exposure to an aminoglycoside (19-24). FluidosomesTM were conceived to increase the penetration of antibiotics through the cell walls of bacteria exhibiting a strong impermeability barrier.

The use of liposomes as drug delivery system to improve drug therapy traditionally relies on three rationales: pharmacokinetic and biodistribution modifications, administration and / or site-directed delivery and reduced toxicity of the chemotherapy. Current liposomal formulations include phospholipids, which have a high phase transition temperature ($T_C \geq 42^\circ \text{C}$), and/or are mixed to cholesterol which increases rigidity and stability of the liposomes. Experimental models of infections in which antimicrobial agents encapsulated in rigid liposomes have been successful in both in-vivo and in-vitro studies all involved infection of cells of the mononuclear phagocyte system (MPS) by facultative or obligate intracellular pathogens (25,26). In these studies, uptake of rigid liposomes by phagocytes was essential to obtain a superior therapeutic effect. Conversely, FluidosomesTM present a negative charge and a low T_C allowing, as observed in calorimetry studies, a destabilization of liposomal membranes starting at a temperature of 33°C (27). Recently, it was demonstrated that the superior bactericidal effect of FluidosomesTM (7,8), even when initiated against resistant strains results from its ability to directly interact with the bacterial membrane. This interaction leads to the merger of the liposomal membranes with the bacteria allowing increased penetration of the drug (28).

In view of a foreseeable clinical development of FluidosomesTM for the treatment of chronic pulmonary infections in CF by aerosols, the use of dry powder form of FluidosomesTM could be an attractive solution for many reasons. The stability of the drug, the simplicity and the rapidity of the administration and in general greater efficiency per mg of drug than nebulized liquid drugs are a few of the reasons (9). Consequently, the previous experiments performed with the liquid form of FluidosomesTM were repeated using the same bacterial strains and the same initial concentrations of antibiotic (8). However because the mode of incorporation of the antibiotic into the two kinds of liposomal preparations are different, it was not appropriate to directly compare in the same experiment, the liquid and dry forms of FluidosomesTM. The results obtained in the present study demonstrate that sub-

MIC concentrations of Fluidosomes™ added as a dry powder preparation to cultures, reduce after 16 h of incubation the number of cfu of *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* and *E. coli*, by factors of 17, 40, 47 and 50 respectively comparatively to the same quantity of free powdered antibiotic. Moreover, the drug has an effect only if it is encapsulated in Fluidosomes™ has demonstrated by the empty liposomes- free tobramycin control which follows the free tobramycin curve in all cases. This demonstrates that the phospholipids play a role in the bactericidal effect. The increased bactericidal effect of Fluidosomes™ has been shown in a previous experiment to be the result of the direct interaction of Fluidosomes™ with the bacterium (28). Moreover, the results obtained with the dry powered form of Fluidosomes™ seem to be in accordance with the proposed fusion mechanism observed previously with the liquid form (28). However, the bactericidal effect is delayed in time and less important comparatively to these latter results (8).

The greater efficiency of the liquid form of Fluidosomes™ compared to the dehydrated form against bacteria may be explained by different factors. The reduced quantity of tobramycin that is encapsulated in powdered Fluidosomes™ comparatively to liquid Fluidosomes™ and the difference in liposome morphology between the liquid and powder forms of Fluidosomes™ could play a role. The usual preparation of liquid liposomes comprises a rehydration step followed by extrusion and washes to eliminate unencapsulated antibiotic and consequently the liquid preparation is composed of liposomes that have a defined size (0.4 µm) and contain 100 % of encapsulated antibiotic. To prepare the liposomes in the dry powder form, a precise quantity of tobramycin is added to phospholipids before the freeze-drying step and because liposomes are used directly as a powder, the following steps are not executed. Thus, there remains unencapsulated tobramycin which cannot be eliminated and must be considered in the total therapeutic dose. Moreover, such a preparation when rehydrated produces a dispersion composed of liposomes of various sizes, number of particles, and possibly less encapsulated antibiotic. Studies performed to determine the quantity of antibiotic effectively encapsulated in liposomes following direct incorporation of powdered liposomal tobramycin in PBS have shown a mean of 73.5 % of encapsulation for doses of 600 µg of tobramycin. However, encapsulation efficiency in culture media could not be measured directly because of the low

final antibiotic concentration used as a dry powder and the fact the antibiotic cannot be quantified directly in culture media. Consequently, this did not allow us in the present study to verify with certainty the percentage of encapsulation in liposomes rehydrated directly with the bacterial cultures. Nevertheless, encapsulation efficiency with culture media should be relatively similar to the ones obtained in the encapsulation studies with PBS since the same experimental procedure was used. It is important to mention that clinical treatments will require doses of antibiotic that will be sufficient to avoid such problems.

In conclusion, if we consider the advantages of inhalers versus nebulizers (9), the feasibility to aerosolize dehydrated liposomes (29), and the bactericidal efficacy of dehydrated FluidosomesTM used at a tobramycin concentration of 30 µg per ml against a strain presenting a MIC of 60 µg/ ml, this study suggests that this liposomal preparation could be a well adapted answer to the resistance problem of gram negative bacteria in CF and in other patients presenting chronic pulmonary infections. Further studies that examine the therapeutic values of aerosolized dry powder preparations of liposomal tobramycin in the management of experimental pseudomonal pneumonia in animals are in progress.

Acknowledgement

This study was supported by a grant from the Canadian Cystic Fibrosis Foundation.

REFERENCE

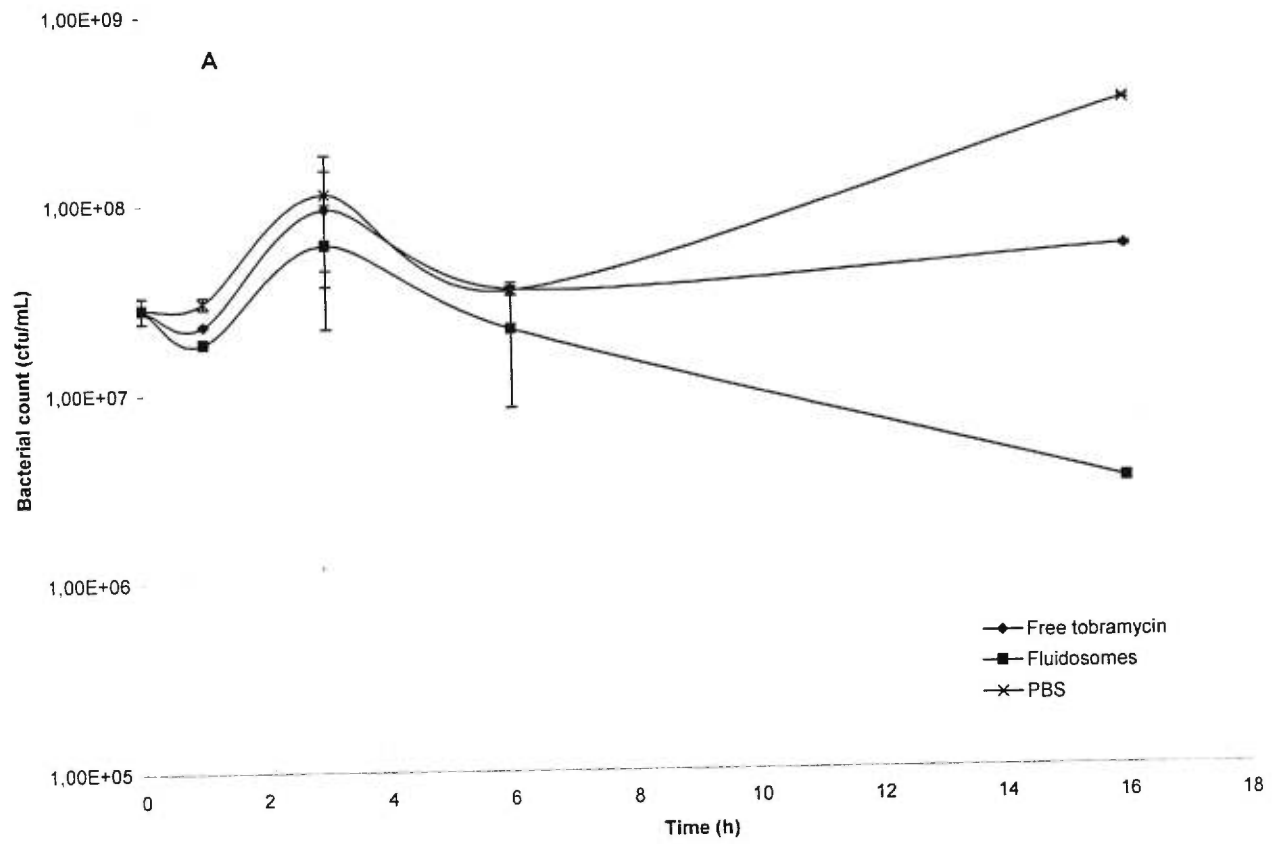
1. Pederson, S.S., Hoiby, N., Espersen, F., and Koch, C. 1992. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* 47 : 6-13.
2. Ramphal, R. 1991. The adhesion-receptor systems of *Pseudomonas aeruginosa*: where are we now ? Fifth annual North American cystic fibrosis conference, October 1991. *Pediatric and Pulmonology* 11 (suppl 6-7): S9.4.
3. Aronoff, S.C., Quinn, F.J. jr., and Stern, R.C. 1991. Longitudinal serum IgG response to *Pseudomonas cepacia* surface antigens in cystic fibrosis. *Pediatric and Pulmonology*. 11 : 289-93.

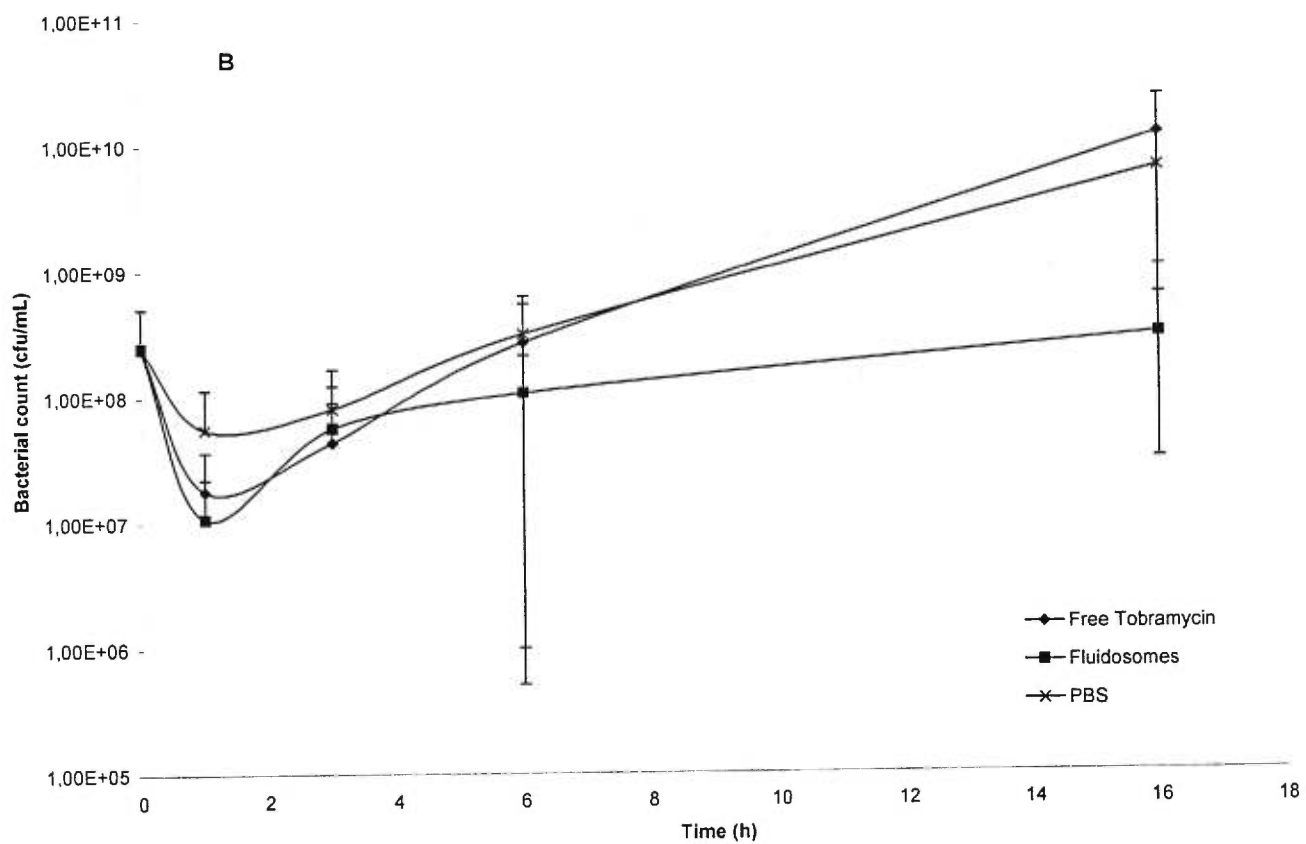
4. Thomassen, M.J., Demco, C.A., Klinger, J.D., and Stren, R.C. 1985. *Pseudomonas aeruginosa* colonization among patients with cystic fibrosis: a new opportunist. *American Review of Respiration Diseases*. 131 : 791-796.
5. Tomasz, A. 1994. Multiple-antibiotic resistant pathogenic bacteria. *New England Journal of Medicine*. 330:1247-1251.
6. Lindsay, C.A., and Bosso, J.A. 1993. Optimization of antibiotic therapy in cystic fibrosis patients. *Clinical Pharmacokinetics*. 24 : 496-506.
7. Beaulac, C., Clément Major, S., Halawari, J., and Lagacé, J. 1996. Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40 : 665-669.
8. Beaulac, C., Sachelletti, S., and Lagacé, J. 1998. *In-vitro* bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. of Antimicrobial Chemother.* 41: 35-41.
9. Pedersen, S. 1996. Inhalers and nebulizers: which to choose and why. *Respiratory medicine* 90 : 67-77.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
11. Bartlett, G. 1958. Phosphorus assay in column chromatography. *Clinical and research* 234: 466-468.
12. Doit, C. P., Bonacorsi, S.P., Fremaux, A.J., Sissia, G., Cohen, R., Geslin, P.L., and Bingen, E.H. 1994. *In vitro* killing activities of antibiotics at clinically achievable concentrations in cerebrospinal fluid against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38: 2655-2659.
13. Friedland, I.R., Paris, M., Shelton, S., and McCracken, G.H. 1994. Time-kill studies of antibiotic combinations against penicillin-resistant and -susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *J. of Antimicrobial Chemother.* 34: 231-7.
14. Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: role of permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382-88.

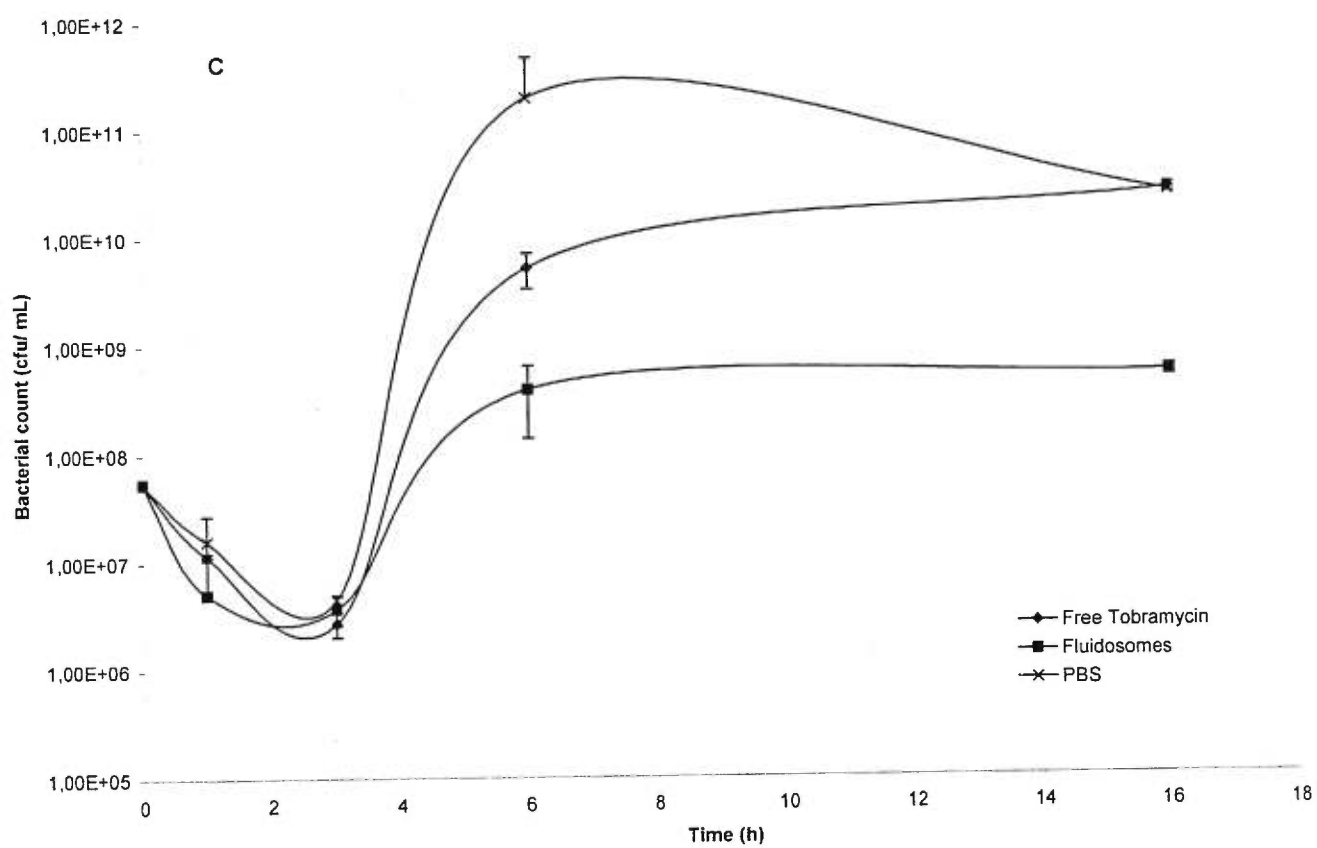
15. Grinus, L.L., and Goldberg, E.B. 1994. Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *J. of Biological Chemistry* 269: 29998-30004.
16. Ahmed, M., Lyass, L., Markham, P. N., Taylor, S.S., Vazquez-Laslop, N., and Neyfakh A. 1995. Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J. of Bacteriology* 177: 3904-10.
17. Okusu, H., Ma, D., and Nikaido, H. 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple resistance (mar) mutants. *J. of Bacteriology* 178 : 306-8.
18. Lyon, B.R., and Skurray, R.A. 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. [Review] *Microbiological Review* 51, 88-134.
19. Gilleland L.B., Gilleland H.E., Gibson J.A., and Champlin, F.R. 1989. Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J of Medical Microbiology* 29: 41-50.
20. Gilleland H.E. 1988. Adaptive alterations in the outer membrane of Gram-negative bacteria during human infections. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 499-502.
21. Daikos G.L., Jackson G.G., Lolans V.T., and Livermore, D.M. 1990. Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics from first-exposure down regulation. *J of Infectious Diseases* 162: 414-20.
22. Daikos G.L., Lolans, V.T., and Jackson, G.G. 1991. First-exposure adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in vivo with meaning for optimal clinical use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35: 117-23.
23. Barclay M.L., Begg E.J., and Chambers, S.T. 1992. Adaptive resistance following single doses of gentamicin in a dynamic *in vitro* model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36: 1951-57.
24. Barclay M.L., Begg E.J., Chambers S.T., Thornley P.E., Pattermore P.K., and Grimwood K. 1996. Adaptive resistance to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J of Antimicrobial Chemotherapy* 37: 1155-64.

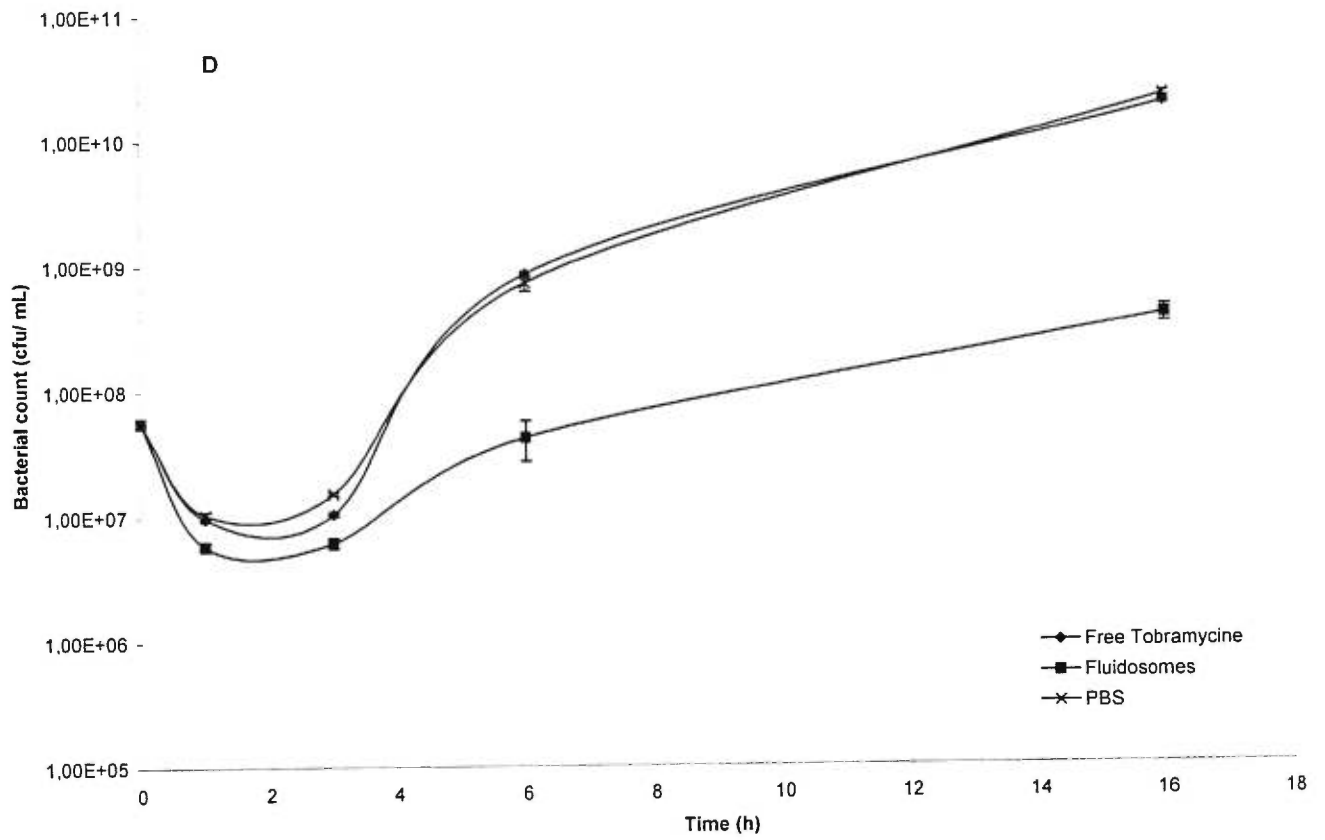
25. Mehta R.T., Keyhani A., McQueen T.J., Rosebaum B., Rolston K.V., and Tarrand J.J. 1993. In-vitro activities of free and liposomal drugs against *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex and *M.tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37: 2584-7.
26. Onyeji C.O., Nightingale C.H., Tessier P.R., Nicolau D.P., Bow L.M. (1995). Activities of clarithromycin, azithromycin, and ofloxacin in combination with liposomal or unencapsulated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against intramacrophage *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. *J of Infectious Diseases* 172: 810-6.
27. Beaulac C. (1995) Elaboration et évaluation de chémoliposomes à action bactéricide anti-*Pseudomonas aeruginosa* chez un modèle animal d'infection chronique. Master thesis, Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), p 67.
28. Sachetelli S., Beaulac C., Lagacé J. (1998) Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. Submitted to *Antimicrob. Agents Chemother.*
29. Johnson D.L., Wenger, E.N., and Polikandritou-Lambros, M. 1996. Aerosolization and hygroscopic growth evaluation of lyophilized liposome aerosols under controlled temperature and relative humidity conditions. *Aerosols Science and Technology* 25: 22-30.

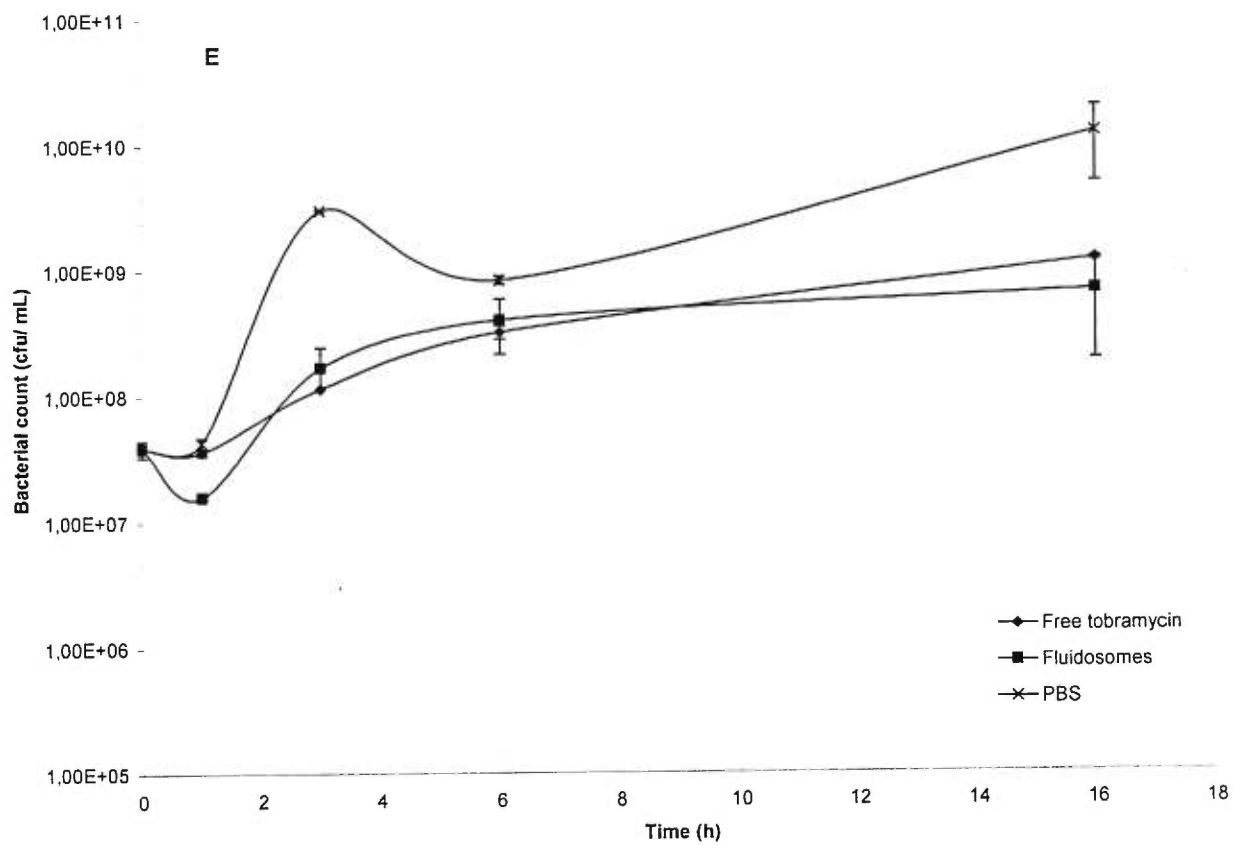
Figure 1. Killing curves of bacteria exposed to sub-MIC of free and encapsulated tobramycin respectively (FluidosomesTM) for: a) *P. aeruginosa*, 30 µg/ml; b) *S. maltophilia*, 1 µg/ml; c) *B. cepacia*, 3 µg/ml; d) *E.coli*, 1.50 µg/ml and e) *S. aureus*, 1 µg/ml. The growth of bacteria was evaluated by cfu counts at 0, 1, 3, 6 and 16 h. MICs of tobramycin for *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* were found by E-Test MIC method to be 60, 2, 6, 1.5, 3 µg/ml respectively. Results are expressed as the arithmetic mean of the three samples ± S.E.M.











CHAPITRE 6-ARTICLE

**AEROSOLIZATION OF LOW PHASE TRANSITION
TEMPERATURE LIPOSOMAL TOBRAMYCIN AS DRY POWDER IN
AN ANIMAL MODEL OF CHRONIC PULMONARY INFECTION
CAUSED BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Christian Beaulac, Sébastien Sachetelli et Jacqueline Lagacé

Département de Microbiologie et Immunologie
Université de Montréal
Montréal, Canada

Accepté pour publication dans *Journal of Drug Targeting*, 1999

**AEROSOLIZATION OF LOW PHASE TRANSITION TEMPERATURE
LIPOSOMAL TOBRAMYCIN AS A DRY POWDER IN AN ANIMAL MODEL
OF CHRONIC PULMONARY INFECTION CAUSED BY *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA***

Keywords: Bactericidal, Liposomes, Nebulization, *Pseudomonas aeruginosa*,
Tobramycin

Christian Beaulac, Sébastien Sachetelli and Jacqueline Lagacé*

Department of Microbiology and Immunology

Faculty of Medicine, Université de Montréal

Case postale 6128, succursale Centre-ville

Montréal, Québec (Canada), H3C 3J7

E-mail: jacqueline.lagace@umontreal.ca

* Corresponding author

Tel.: (514) 343-2180

Fax: (514) 343-6358

Number of pages in the manuscript: 18

Number of figures: 2

Running title: *In vivo* bactericidal efficacy of fluid liposomes in powder form

ABSTRACT

Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in an animal model of chronic pulmonary infection has been previously demonstrated following the intratracheal administration of FluidosomesTM, a low phase transition temperature (Low T_C) liposomal tobramycin preparation administered in liquid form (Beaulac et al., 1996). In the present work, the same liposomal formulation was administered as a dry powder aerosol to an animal model of chronic pulmonary infection in view of a possible clinical development in cystic fibrosis patients. Chronic infection was established by intratracheal administration of 10⁵ cfu of a mucoid variant of *P. aeruginosa*, PA 508, prepared in agar beads. Sixteen hours after one aerosol treatment, the cfu counts performed on lungs (pair) treated with liposomal tobramycin were of 4.31 x 10⁵ cfu/lungs comparatively to 1.32 x 10⁸ and 3.02 x 10⁸ cfu /lungs respectively in untreated and in lungs treated with free antibiotic. Considering the quantity of liposome-tobramycin that has reached the lungs, the results suggest that aerosolization of low phase transition temperature liposomal tobramycin used as a dry powder preparation could be an effective way of treating chronic pulmonary infection caused by *Pseudomonas*.

INTRODUCTION

Chronic lung infections due to *Pseudomonas aeruginosa* is the major cause of morbidity and mortality in patients with cystic fibrosis (CF). Despite the use of aggressive antibiotic therapy, *Pseudomonas aeruginosa* is rarely eradicated (Hoiby et al., 1982; Pier, 1986; Vasil, 1986). Difficulties to eradicate infections caused by *P. aeruginosa* and other related bacteria like *Burkholderia cepacia* and *Xanthomonas maltophilia* are due in large part to the low permeability level of their outer membrane combined to multiple drug efflux pumps (Poole et al., 1993; Lewis et al., 1994; Nikaido, 1994; Chen et al., 1995; Fontana et al., 1995). Another important cause of bacterial resistance to antibiotics that is frequently underestimated is an adaptive and unstable permeability defect that has been well documented in *P. aeruginosa* following exposure to an aminoglycoside (Barclay et al., 1992; Gilligan, 1991). This reversible refractoriness to the bactericidal action of an antibiotic following first exposure appears to be related to reversible down-regulation of drug uptake into the bacteria, especially during the period of accelerated energy-dependant drug transport (Daikos et al., 1988). Recently, adaptive resistance to the bactericidal action of tobramycin was identified in *P. aeruginosa* isolated from the sputum of 7/7 patients with CF analyzed soon after an inhalation dose (Barclay et al., 1996).

Liposomes, a drug delivery system, could be one way of improving the effectiveness of antibiotics in modifying the pharmacokinetics, biodistribution and interaction of microorganisms with the encapsulated drug (Beaulac et al., 1996; Cynamon et al., 1989; Nightingale et al., 1993; Saito and Tomioka, 1989; Vladimirsky and Ladigina, 1982). Drugs encapsulated in conventional liposomes harboring a high phase transition temperature ($T_C \geq 42^\circ\text{C}$) and/ or mixed to cholesterol, which increases rigidity and stability of the liposomes, have shown effectiveness in reducing drug toxicity and infection caused by facultative or obligate intracellular pathogens involving cells of the mononuclear phagocytic system (Mehta et al., 1993; Onyeji et al., 1995). However, rigid liposomes have generally low bactericidal activity against extracellular bacteria since uptake of rigid liposomes by phagocytes seems

essential to obtain a superior therapeutic effect (Bakker-Wondenberg et al., 1995; Grayson et al., 1995).

During the last five years, our laboratory has investigated the potential of delivering antibiotics to extracellular infections using fluid liposomes made of synthetic phospholipids characterized by a net negative charge and a low T_C . This low T_C allows, as observed in calorimetry studies, a destabilization of liposomal membranes from a temperature of 33 °C (Beaulac, 1995). These liposomes named Fluidosomes™, which can directly interact with the bacterial cell walls, were successful in eradicating mucoid *P. aeruginosa* in an animal model of chronic pulmonary infection whereas antibiotic encapsulated in rigid liposomal preparations or free antibiotic did not show any bactericidal effect (Beaulac et al., 1996; Omri et al., 1994). Afterwards, it was demonstrated in *in vitro* studies that sub-minimal inhibitory concentrations (sub-MIC) of liposome-encapsulated tobramycin succeed to reduce the growth (number of cfu) of *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Xanthomonas maltophilia*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, by 84 to 10^5 times more than the same quantities of the free antibiotic (Beaulac et al., 1998). Taking into consideration that the preparation of Fluidosomes™ requires a freeze-drying step and the practical advantages of dry powder formulation of drugs for aerosolization, bactericidal activity of Fluidosomes™ in powder form was first tested in *in vitro* studies. These studies showed that our liposomal associated-antibiotic administered as a dry powder maintained a higher bactericidal activity over the free antibiotic (17 to 50 times superior) against *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Xanthomonas maltophilia* and *Escherichia coli* (unpublished data). The aim of the present work was to demonstrate the bactericidal efficacy of aerosolized Fluidosomes™ administered as a dry powder in an animal model of chronic pulmonary infection caused by a mucoid strain of *P. aeruginosa*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain

A clinical isolate of *P. aeruginosa*, PA 508, was used throughout this study. PA 508 is a mucoid strain isolated from the sputum of a CF patient (Sainte-Justine Hospital, Montréal, Québec, Canada). The minimal inhibitory concentration (MIC) of tobramycin against PA 508 is 1 µg/ml. Bacteria were stored at - 70 °C in brain heart infusion broth supplemented with 10 % glycerol. For the experiments, a 17-h culture of this organism in Proteose Peptone broth No. 2 (Difco Laboratories, Detroit, MI) was used.

Liposomes

Dry powder preparations of Fluidosomes™ (liposomal associated tobramycin) and PBS-liposomes (control preparations) were a generous gifts from Theralipids Inc., (Biotechnology Research Institute, Ville Mont-Royal, Québec, Canada). The liposomes were prepared by the dehydration-rehydration vesicle method (Beaulac et al., 1996) whereas free tobramycin was lyophilized. Briefly, phospholipids were dissolved in chloroform in a round-bottom flask connected to an evaporator (Bucci Rotavapor). Parameters of evaporation like temperature and pressure were controlled (Bucci). After complete evaporation of the chloroform, the dry phospholipid film was hydrated with a precise quantity of tobramycin needed for the experiment. Tobramycin was dissolved in PBS 1/20 to reach the minimal volume for complete hydration. The liposomal suspension was then distributed in vials and submitted to lyophilization (Virtis Genesis 12 EL Console freeze dryer; Canberra Parkard, Toronto, Ontario, Canada). Each vial of dry powder preparation contained predetermined dose of tobramycin and was automatically sealed under vacuum. Vials were kept at - 70 °C until use. The liposomal preparations consisted of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) (Avanti Polar Lipids, Inc, Birmingham, AL, USA) at a ratio (w/w) of 18:1. Tobramycin in liposomal preparations was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) as described below. To control the uniformity of the doses in terms of phospholipid and tobramycin

content, powder preparations from ten vials were dissolved individually into 1 ml of sterile PBS and analyzed as described below. The powder of ten other vials from the same batch was administered using a microsprayer (Penn-Century, Philadelphia, PA), specially designed for powder aerosolization. This step was done to control the doses administered from the microsprayer. Each dose of dry powdered FluidosomesTM was placed into the microsprayer and dispersed into 1 ml of sterile PBS (kept at 37° C) by effectuating five pumpings. Before aerosolization, the maximal quantity of lipid to be dissolved in 1 ml of PBS was 30 mg. These solutions were mixed using a vortex mixer (2 times, 1 min.) and centrifuged at 5000 g x 20 min. The suspensions were clear and light microscopy observation suggested complete liposome reconstitution. In our hands, previous studies have shown that liposomes prepared by the dehydration-rehydration vesicle method in well controlled conditions of pressure and temperature allows liposomes to be totally recovered in the pellet following centrifugation at 5000 g x 20 min.; this was not possible when liposomes were produced without the lyophilization step (unpublished data). It can be anticipated that liposomes produced with a lyophilization step can present a higher density. The supernatants were collected and the pellets were resuspended in 1 ml of PBS. Afterwards, 100 µl samples of the non-aerosolized liposomal solutions (total liposomal preparations), and aerosolized preparations (supernatants and resuspended liposomal pellets) collected in PBS were submitted to HPLC analysis for tobramycin determination as described below. Two hundred microliter samples of the same preparations were also submitted to phospholipid determinations using a modified method from Fiske and Subbarow (Bartlett, 1985). All experiments were performed in triplicate.

Tobramycin quantification

The procedure for the determination of tobramycin in FluidosomesTM is based on derivatization of tobramycin with 1-fluoro 2,4-dinitrobenzene (FDNB) as previously described (Beaulac et al., 1996). Briefly, a volume of 170 µl of supernatant from a tobramycin- methanol (MeOH) extraction solution was transferred in a vial containing 90 µl of FDNB-MeOH solution (180 g/L), 70 µl of sodium borate (0.1 M) and 670 µl

of MeOH. Vials were then sealed, vortexed and heated for 30 min at 85 °C and cooled at room temperature. Because the antibiotic activity of tobramycin cannot be evaluated following HPLC analysis due to the derivatization reaction which inactivates the drug, the samples were also analyzed by microbiological assay as described previously (Beaulac et al., 1996). The microbiological assay is not as accurate as the HPLC analysis for tobramycin quantification but this latter permits the verification of the bactericidal activity of the drug contained in the samples.

Experimental design

One hundred and twenty nine Sprague-Dawley rats weighing 175 to 225 g (Charles River, Saint Constant, Québec, Canada) were used in this study. The animals were allowed free access to food and water. Chronic pulmonary infection caused by *P. aeruginosa* 508 was induced as previously described (Omri et al., 1994) with slight modifications. Briefly, the bacterial strain was grown overnight at 37 °C in Proteose Peptone broth No. 2 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Bacteria were then incorporated into agar beads and a suspension containing 5×10^5 CFU / 100 µl was administered intratracheally to animals following their anaesthesia with a mixture of 70 mg of ketamine hydrochloride per kg of body weight (CDMV, St Hyacinthe, Québec, Canada) and 7 mg of xylazine (CDMV, St Hyacinthe, Québec, Canada) per kg of body weight by intramuscular injection. Two days after the inoculation, 3 rats were randomly selected to verify the level of the infection. Preliminary studies have showed that if the infection procedure is well done, this latter is stable for many weeks in rats (unpublished data). Rats were divided into the following five groups: group 1 (n= 30), infected animals treated with dehydrated tobramycin; group 2 (n= 30), infected animals treated with dehydrated FluidosomesTM; group 3 (n= 30), infected animals treated with dehydrated PBS-FluidosomesTM; group 4 (n= 30), infected animals treated with dehydrated PBS and group 5 (n= 3), infected animals left untreated. A group treated by mixing dry powder of empty liposomes with a dry powder of free drug was not included in this study because preliminary studies did not show that this form of treatment was efficient. Three days after the inoculation of the coated bacteria, the rats were treated with dry powder aerosols. Rats were placed

on a support in an upright position (45°) to facilitate intubation with an intratracheal catheter connected a polished stylet (20-25 mm depth depending of trachea size). The stylet was then withdrawn, and the intubation was confirmed by the formation of water condensation on a cold mirror. A delivery device for intratracheal administration of dry powder, the Penn Century intratracheal aerosolizer (microsprayer) (Penn-Century, Philadelphia, PA), was introduced through a catheter to the bifurcation of the trachea. This microsprayer consists of a 5 ml syringe combined with a sub-miniaturized nozzle mounted on the tip of a 3 inch, 18-gauge stainless steel tube. When the syringe plunger is depressed, the powder is forced at a high pressure into a small mixing chamber at the end of the steel tube imparting considerable momentum to the powder. Dry powder doses of 600 µg of free tobramycin or associated to liposomes (Fluidosomes™) and controls were administered to rats. At several times (0, 1, 3, 6 and 16 h) after treatment, animals were anesthetized, exsanguinated and killed. Kidneys and lungs were removed aseptically and homogenized in cold sterile PBS (40% wt/vol) for 30 s with a polytron Homogenizer (Polytron: Kinematica, Lucerne, Switzerland). A sample of 500 µl of homogenized lungs was immediately used for serial dilutions (10 fold) in PBS and appropriate dilutions were plated and cultured in triplicate on Proteose Peptone no. 2 agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) in triplicate. After an overnight incubation, the number of CFU was determined. *P. aeruginosa* colonies were also tested on C-390 medium agar (Campbell et al., 1988) to confirm the identity of the bacteria. Samples (100 µl) of serum and homogenized tissues were conserved at - 70 °C in a methanol extraction solution before HPLC analysis. The remainder of the tissue homogenates were conserved at - 70 °C.

Data analysis

Bacterial counts are expressed as the mean CFU +/- standard error from the mean as obtained from at least three plate counts per dilution. Analyses were performed by linear regression using Microsoft EXCEL version 5.0. Cfu counts at the end of the experiment were compared statistically with a Student t-test.

RESULTS

Standardization of dry powder doses

HPLC analysis of 10 samples of Fluidosomes™ and 10 samples of free tobramycin after rehydration of their dry powder form indicated the presence of quantities of tobramycin corresponding respectively to 599.3 ± 8.98 and 595.7 ± 10.72 μg of antibiotic per vial. The percentage of coefficient of variation between free tobramycin samples and Fluidosomes™ was respectively of $\leq 0.6\%$ and $\leq 1.8\%$. Phospholipid quantification (Bartlett, 1985) showed a mean value of $28.06 \text{ mg} \pm 3.08$ for liposome-PBS and 30.57 ± 2.24 for liposome-tobramycin. HPLC analysis of quantities of antibiotic leaving the microspayer and dissolving in PBS were of $343.8 \mu\text{g} \pm 74.4$ (57.3% rat) for Fluidosomes™ and $577.0 \mu\text{g} \pm 14.76$ (96.17%) for free antibiotic.

Animal model

A *P. aeruginosa* chronic pulmonary infection implanted into the lungs of rats was previously monitored to be stable over 21 days. It was difficult to go over this time period due to the increasing infection resulting in the lost of the animals. *P. aeruginosa* colony counts performed from dilutions of homogenized lung tissues effectuated at time 0, indicated a mean cfu of 1.44×10^6 in rats included in the study (Figure 1). One, three and six hours after the treatment, no significant differences in the cfu counts were observed between the different groups. Sixteen hours after the treatment, the cfu counts performed from the lungs treated with dry Fluidosomes™ were of 4.31×10^5 whereas those from lungs treated with liposomal controls or with free antibiotic reached values respectively of 1.32×10^8 cfu and 3.02×10^8 per pair of lungs (Figure 1). Consequently, a cfu lowering of about 300 times was observed following the treatment with Fluidosomes™ comparatively to the use of free tobramycin. Differences in the cfu counts between lung tissues treated with free and encapsulated antibiotic were significant ($p \leq 0.05$) whereas no significant differences were observed between control lungs and lungs treated with free antibiotic. In lungs treated with free antibiotic, 5.01 and 2.07 μg of tobramycin per pair of lungs were found respectively 1 and 3 h. after treatment as determined by HPLC analysis (Figure 2). In lungs treated with Fluidosomes™, only traces of tobramycin, inferior to the threshold of quantitative

HPLC determination, were detected. Three hours after the treatment, a mean of 31.72 μg per pair of kidneys were detected in animals treated with free tobramycin comparatively to a mean of 15.74 μg in animal treated with FluidosomesTM. Small amounts of tobramycin could be detected only in lungs treated with FluidosomesTM at 6 and 16 hours following treatment (Figure 2). Traces of antibiotic inferior to the threshold of the quantitative sensitivity of the HPLC assay were detected only in the sera of animals treated with free antibiotic right up to 6 h. after treatment (Figure 2).

DISCUSSION

The eradication of mucoid *P. aeruginosa* in an animal model of chronic pulmonary infection has been previously demonstrated following the intratracheal administration of a liquid dose of fluid liposomal tobramycin (Beaulac et al., 1996) now designated FluidosomesTM. In view of a possible clinical development, different ways of liposome administration have to be tested. The aerosol administration of liposomes as a dry powder preparation is attractive for reasons related to stability of the product, simplicity and quickness of administration when using dry powder inhalation system (DPI's) and/or metered dose inhalers (MDI). Very recently, we demonstrated that the dry powder form of FluidosomesTM used directly in culture media showed a greater bactericidal efficiency than the same free dehydrated antibiotic dose (17 to 50 times more efficacy) against *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Xanthomonas maltophilia* and *Escherichia coli* (unpublished data). In the present work, the same animal model of pulmonary infection previously used to study the bactericidal efficacy of the liquid form of FluidosomesTM (Beaulac et al., 1996) was used to evaluate the efficacy of the dehydrated form of FluidosomesTM. Dry FluidosomesTM containing a 600 μg -dose of tobramycin were administered to infected rats by aerosol with an intratracheal aerosolizer. The results presented here show that 16 h post treatment, dehydrated FluidosomesTM aerosolized in infected rats killed 300 times more bacteria than free dehydrated tobramycin. The quantity of tobramycin detected by HPLC analysis of lungs, excluding the trachea, was 5.01 and 2.07 μg /pair of lungs, following one and three hours after the administration of free antibiotic. After the administration of FluidosomesTM, only traces of tobramycin were detected in the lungs. These

concentrations were maintained until 16 h after the treatment showing a bactericidal efficacy significantly more important in terms of number of cfu than free antibiotic. To explain such results, we must consider that in the lungs, the presence of fluids and the ambient humidity index of about 98% (Johnson et al., 1996), is sufficient to allow the rehydration of powdered liposomes in a liquid form that can directly interact with the bacterial membrane. This is compatible with the T_C of FluidosomesTM that induces a destabilization of liposomal membranes starting at 33 °C and in a reversible way can allow encapsulation of tobramycin associated to dry liposomes.

To evaluate adequately the bactericidal activity of the powder form of FluidosomesTM comparatively to free antibiotic, every parameter influencing the accurate dosage of encapsulated tobramycin truly available in the lungs has to be examined. Studies performed to determine the quantity of antibiotic encapsulated in liposomes following direct use of dehydrated FluidosomesTM into culture media at 37°C, have shown a mean of 73.5% of encapsulation (unpublished data). In this study, it was also determined that 57.3% of the dehydrated FluidosomeTM dose left the microspayer comparatively to 97.1% for the same initial dose of free antibiotic. These observations suggest that a mean of 236.8 µg of FluidosomesTM was administered to rats comparatively to a mean dose of 582.6 µg for the free antibiotic. Secondly, the lowered efficacy of the microspayer to deliver FluidosomesTM comparatively to the free antibiotic is probably due to the hygroscopic characteristic of the liposomal preparation as suggested by the appearance of FluidosomesTM trapped in the device after the aerosolization. This suggests that the aerosolized powder form of FluidosomesTM, because of its hygroscopicity, was less efficient than free antibiotic to reach the pulmonary tissue. The problem of hygroscopicity is presently being addressed and would be resolved in a near future. Based on the HPLC analysis of tobramycin found in the lungs, we must consider that only minute quantities of tobramycin reached the lungs following administration of FluidosomesTM. In spite of that, a 300 fold reduction of cfu numbers in the lungs was observed following the administration of FluidosomesTM comparatively to the measured quantities of free antibiotic that reached the lungs. The very efficient bactericidal activity of this low quantity of FluidosomesTM in comparison

to free antibiotic may be explained by the mode of interaction of these liposomes with the bacterial cell membrane. Indeed, it was demonstrated by immuno-electron microscopy studies that FluidosomesTM can increase dramatically the penetration of encapsulated tobramycin in bacterial cells resistant to this antibiotic. In the same work, it was also demonstrated by flow cytometry studies that these liposomes can be incorporated in a maximal way after 30 min. of incubation in sensitive bacterial cells whereas the maximal value of liposome incorporation was reached after 5 h. of incubation with a strain showing a MIC of 60 µg/ml to tobramycin (Sachetelli et al., submitted). If we consider the inefficiency of antibiotics presently used to treat pulmonary infections in CF, the present work suggests that FluidosomesTM could fight the outbreak of different forms of antibiotic resistance particularly the low outer-membrane permeability barrier which can arise as a stable or as an adaptive unstable response (Barclay et al., 1992; Gilligan, 1991).

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Canadian Cystic Fibrosis Foundation.

REFERENCES

- Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., Ten Kate, M.T., Stearne-Cullen, L.E.T. and Woodle, M.C. (1995) Efficacy of gentamicin or ceftazidime entrapped in liposomes with prolonged blood circulation and enhanced localization in *Klebsiella pneumoniae*-infected lung tissue. *J. Infect. Dis.* ,171, 938-47.
- Barclay, M.L., Begg, E.J. and Chambers, S.T. (1992) Adaptative resistance following single doses of gentamicin in a dynamic in vitro model. *Antimicrobial. Agents Chemother.*, 36, 1951-1957.

- Barclay, M.L., Begg, E.J., Chambers, S.T., Thornley, P.E., Pattemore, P.K. and Grimwood, K. (1996) Adaptative resistance to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 37, 1155-1164.
- Bartlett, G. (1985) Phosphorus assay in column chromatography. *Clinical and research*, 243, 466-468.
- Beaulac, C., Clément-Major, S., Hawari, J. and Lagacé, J. (1996) Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 665-69.
- Beaulac, C. (1995) Elaboration et évaluation de chémoliposomes à action bactéricide anti-*Pseudomonas aeruginosa* chez un modèle animal d'infection chronique. Master thesis, Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), p 67.
- Beaulac, C., Sachetelli, S., Lagacé, J. (1998) In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentration of liposomes-encapsulation antibiotic against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41, 35-41.
- Campbell, M.E., Farmer, S.W. and Speert, D.P. (1988) New selective medium for *Pseudomonas aeruginosa* with phenanthroline and 9-chloro-9-[4- (diethylamino) phenyl]- 9, 10- dihydro-10- phenylacridine hydrochloride (C-390). *J. of Clinical Microbiol.*, 26, 1910-1912.
- Chen, N.Y., Yuan, M. and Livermore, D.M. (1995) Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J. Med. Microb.*, 43, 300-09.
- Cynamon, M.H., Swenson, C.E., Palmer, G.S. and Ginsberg, R.S. (1989) Liposome-encapsulated-amikacin therapy of mycobacterium avium complex infection in beige mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, 1179-1183.

Daikos, G.L., Lolans, V.T. and Jackson, G.G. (1988) Alteration in outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* associated with selective resistance to quinones. *Antimicrob Agents Chemother.*, 32, 341-348.

Fontana, R., Altamura, M., Arcamone, F., Cornaglia, G., Morandotti, G. and Sperring, R. (1995) Structure-activity relationship of new 2-substituted penem antibiotics. *J. Antibiotics*, 48, 1488-93.

Gilligan, P.H. (1991) Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4, 35-51.

Grayson, L.S., Hansbrough, J.F., Zapata-Sirvent, R., Roehrborn, A.J., Kim, T. and Kim, S. (1995) Soft tissue infection prophylaxis with gentamicin encapsulated in multivesicular liposomes: Results from a prospective, randomized trial. *Crit. Care Med.*, 23, 84-91.

Hoiby, N., Friis, B., Jensen, K., Koch, C., Moller, N.E., Stivring, S. and Szaff, M. (1982) Antimicrobial chemotherapy in cystic fibrosis patients. *ACTA Paediatr. Scan. Suppl.*, 301, 75-100.

Johnson, D.L., Wenger, E.N., Polikandritou-Lambros, M. (1996) Aerosolization and hygroscopic growth evaluation of lyophilized liposome aerosols under controlled temperature and relative humidity. *Aerosol Sc. and Tech.*, 25, 22-30.

Lewis, K. (1994) Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.*, 19, 119-123.

Mehta, R.T., Keyhani, A., McQueen, T.J., Rosebaum, B., Rolston, K.V. and Tarrand, J.J. (1993) *In-vitro* activities of free and liposomal drugs against *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex and *M. tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, 2584-7.

Nightingale, S. D., Saletan, S.L., Swenson, C.E., Lawrence, A.J., Watson, D.A., Pilkewick, F.G., Silverman, E.G., and Cal, S.X. (1993) Liposome-encapsulated gentamicin treatment of *Mycobacterium avium* intracellulare complex bacteremia in AIDS patients. *Antimicrobial Agents Chemother.*, 37, 1869-1872.

Nikaido, H. (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: role of permeability barriers and active efflux. *Science*, 264, 382-88.

Omri, A., Beaulac, C., Bouhajib, M., Montplaisir, S., Sharkawi, M. and Lagacé, J. (1994) Pulmonary retention of free and liposome-encapsulated tobramycin after intratracheal administration in uninfected rats and rats infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 38, 1090-95.

Onyeji, C.O., Nightingale, C.H., Tessier, P.R., Nicolau, D.P. and Bow, L.M. (1995) Activities of clarithromycin, azithromycin, and ofloxacin in combination with liposomal or unencapsulated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against intramacrophage *Mycobacterium avium* - *Mycobacterium intracellulare*. *J. Infect. Dis.*, 172, 810-6.

Pier, G.B. (1986) Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J. Infect. Dis.*, 151, 575-580.

Poole, K., Krebes, K., McNally, C. and Neshat, S. (1993) Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.*, 175, 7363-7372.

Saito, H. and Tomioka, H. (1989) Therapeutic efficacy of liposomal entrapped rifampin against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, 429-433.

Vasil, M.L. (1986) *Pseudomonas aeruginosa*: mechanism of virulence, epidemiology. J. Pediatr., 108, 800-805.

Vladimirsky, M. A. and Ladigina, G.A. 1982. Antimicrobial activity of liposome entrapped streptomycin in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Biomed. Pharmacother., 36, 375-377.

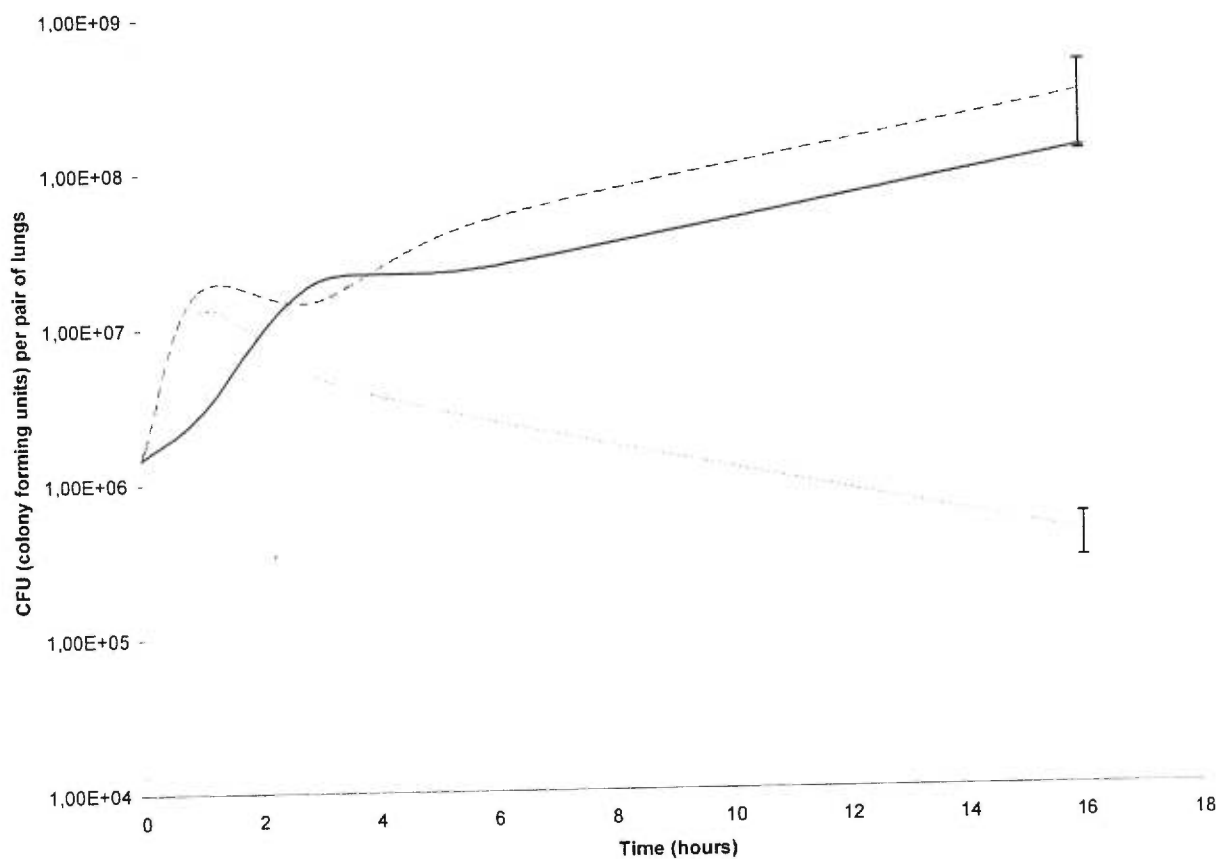


FIGURE 1 CFU counts of *Pseudomonas aeruginosa* # 508 in a rat model of pulmonary infection treated with 600 μg of free tobramycin or Fluidosomes™-tobramycin in dry powder form. Bacterial colonization was evaluated by cfu counts at 0, 1, 3, 6 and 16 h post treatment. The solid lines (—) on the graph represent bacteria exposed to PBS (controls), the dashed lines (---) represent bacteria exposed to free tobramycin and the dotted lines (.....) represent bacteria exposed to dry powder Fluidosomes™-tobramycin. Results are expressed as the arithmetic mean of the three samples \pm S.E.M.

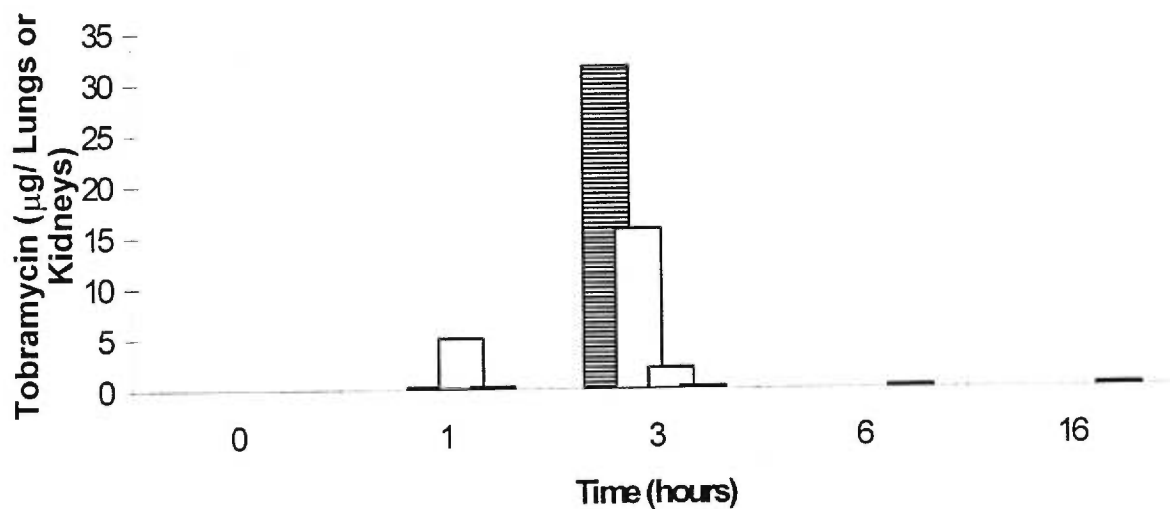


FIGURE 2 Tobramycin quantification in μg per pair of lungs and kidneys following intratracheal administration of a $600 \mu\text{g}$ dose of free tobramycin or FluidosomesTM-tobramycin in dry powder form. The HPLC quantification was performed after 0, 1, 3, 6 and 16 h post treatment in lung and kidney homogenates. Free tobramycin in lungs (grey bars), FluidosomesTM-tobramycin in lungs (black bars), free tobramycin in kidneys (horizontal bars), and FluidosomesTM-tobramycin in kidneys (colorless bars).

CHAPITRE 7- DISCUSSION

Les infections bactériennes causées par *P. aeruginosa* et autres bactéries sont de plus en plus difficiles à traiter avec les méthodes conventionnelles. La forte résistance aux antibiotiques des souches cliniques en est la principale cause. Les liposomes, grâce à leurs propriétés pharmacologiques et physico-chimiques, pourraient être une solution pour contrer ce problème. Une formulation liposomale, appelée FluidosomesTM, développée dans notre laboratoire a démontré *in vitro* et *in vivo* une efficacité supérieure à celle de l'antibiotique libre contre *P. aeruginosa* et autres bactéries d'importance médicale. Pour mieux comprendre le type d'interaction entre les FluidosomesTM et les cellules bactériennes et analyser leurs effets secondaires potentiels lors de leur administration chez l'humain, nous avons procédé à des études de microscopie électronique, d'immunisation et de cytométrie. Nos études ont permis de mettre en évidence que le type d'interaction des FluidosomesTM et des bactéries serait en fait un phénomène de fusion. C'est la première fois que ce type d'interaction est mis en évidence dans des conditions physiologiques normales. La fusion a pour effet d'augmenter considérablement la pénétration de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie, faisant des FluidosomesTM un moyen efficace pour traiter des infections bactériennes récalcitrantes. Nos études immunologiques ont permis de démontrer que les FluidosomesTM ne sont pas immunogènes, ce qui est un point important pour l'administration humaine.

7.1 Interaction des FluidosomesTM avec *P. aeruginosa*

Utilisant une souche clinique résistante aux antibiotiques, *P. aeruginosa* 429, nous avons précédemment démontré qu'en utilisant de la tobramycine encapsulée à une concentration correspondant à la moitié de la CMI de cette bactérie, il était possible de réduire le nombre d'UFC par un facteur de 84 fois comparativement à la même quantité d'antibiotique libre 6 h après l'addition de celui-ci (Beaulac *et al.*, 1998a). Ces résultats suggèrent fortement que le mode d'action des FluidosomesTM est relié à une voie de pénétration inhabituelle puisqu'une diffusion normale ne peut expliquer pourquoi une quantité d'antibiotique encapsulée correspondant à la moitié de la CMI a une action bactéricide tandis que la même quantité d'antibiotique libre est inefficace. Notre hypothèse est que les FluidosomesTM interagissent avec les bactéries en fusionnant avec celles-ci. L'antibiotique pénètre donc plus facilement et rapidement à l'intérieur de la bactérie comparativement à l'antibiotique libre car la fusion permet de court-circuiter la membrane externe qui constitue une barrière importante dans la pénétration de l'antibiotique chez *P. aeruginosa*. De plus, cette pénétration massive de l'antibiotique dans la bactérie permettrait d'outre passer la capacité des enzymes hydrolysantes présentes à neutraliser l'antibiotique et des pompes à reflux à expulser l'antibiotique hors de la bactérie. En conséquence, la fusion permettrait d'augmenter de beaucoup l'efficacité de l'antibiotique.

En utilisant la microscopie électronique et la cytométrie en flux, nous avons reproduit les cinétiques précédemment effectuées avec la souche 429 dans le but d'élucider l'interaction des FluidosomesTM avec les bactéries. Des observations en microscopie électronique de bactéries incubées en présence de FluidosomesTM et colorées négativement, démontrent que ces derniers interagissent intimement avec les membranes bactériennes (Fig. 2, chapitre 2). Des études d'immunocytochimie sur coupes ultra-mince effectuées avec la souche 429 ont démontré que l'antibiotique encapsulé dans les FluidosomesTM pénétrait en plus grande quantité à l'intérieur de la bactérie que l'agent à l'état libre ($p < 0.001$) atteignant un maximum 6 heures après le début de l'incubation (Fig. 1A et 1B, chapitre 2). En moyenne, 9.54 ± 4.34 particules

d'or/ μm^2 ont été retrouvées dans les bactéries exposées aux FluidosomesTM comparativement à 1.20 ± 1.22 particules d'or/ μm^2 avec l'antibiotique libre ($p < 0.001$). On retrouve 0.51 ± 0.82 particules d'or/ μm^2 dans le contrôle PBS. Le bruit de fond, qui consiste en particules d'or non associées avec les bactéries ou les membranes liposomales, était plus faible pour l'antibiotique libre et le contrôle PBS (0.25 ± 0.12 et 0.02 ± 0.02 particules d'or/ μm^2 respectivement) comparativement au bruit de fond présenté par les coupes contenant des FluidosomesTM (1.96 ± 0.19 particules d'or/ μm^2). Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'il est facile d'éliminer l'antibiotique libre par des lavages/ centrifugations tandis que les FluidosomesTM sont sédimentés avec les bactéries lors de cette procédure. Par conséquent lorsque l'échantillon est soumis au processus de préparation des coupes comme la fixation, la déhydratation et l'enrobage, la tobramycine encapsulée peut être libérée ce qui cause vraisemblablement ce bruit de fond.

Même si la différence de marquage entre les bactéries exposées aux FluidosomesTM et l'antibiotique libre est significative ($p < 0.001$), on pourrait s'attendre à un marquage plus important si l'on considère l'efficacité bactéricide observée précédemment pour les FluidosomesTM, comparativement à l'antibiotique libre (Beaulac *et al.*, 1998a). Puisque seulement quelques particules d'or ont été retrouvées dans les FluidosomesTM, ceci implique qu'un petit pourcentage de molécules de tobramycine a été détecté par l'anticorps associé avec la protéine A/G. De plus, lorsque l'on effectue des coupes minces (200-300 nm), seulement une petite portion de la bactérie est visualisée. En plus de la minceur des coupes, la détection de l'antibiotique nécessite qu'il soit exposé à la surface de la coupe et les épitopes sont souvent modifiés par les produits utilisés pour la fixation, réduisant ainsi la détection par les anticorps. La technique utilisée explique pourquoi le marquage n'est pas aussi intense qu'attendu. Il reste que la différence présente entre les FluidosomesTM et l'antibiotique libre est très significative ($p < 0.001$).

Pour mieux caractériser l'interaction des FluidosomesTM avec les bactéries et pour préciser si l'augmentation de la pénétration de la tobramycine était associée avec

l'incorporation des phospholipides liposomaux dans la bactérie, nous avons utilisé la cytométrie en flux, couplée à l'usage d'une sonde lipophile, le PKH2-GL. Le PKH2-GL a la particularité de s'intégrer dans les membranes grâce à ses propriétés aliphatiques. Une fois intégrée, cette molécule est emprisonnée dans la paroi membranaire. Cette propriété fait de cette molécule une sonde fiable pour suivre l'intégration et la fusion membranaire puisque qu'elle ne peut se désincorporer ou diffuser des liposomes à la bactérie en utilisant le milieu aqueux comme intermédiaire. En conséquence, la localisation de la sonde dans la bactérie implique qu'il y a eu fusion entre la membrane externe de la bactérie et les liposomes.

Nos études en cytométrie en flux ont démontré que la sonde était intégrée à la bactérie, ce qui suggère une fusion des membranes liposomales avec cette dernière (Fig. 3, chapitre 2). De plus, la vitesse d'incorporation semble liée à la résistance de la souche aux antibiotiques. Avec une souche de référence ATCC (PA 25619) très sensible à l'antibiotique, l'intégration est rapide et atteint une valeur maximale après 30 min. de contact (61.70 %). Cependant, avec une souche clinique qui démontre une grande résistance aux antibiotiques (64 µg/ml de CMI), cette interaction se produit beaucoup plus lentement pour atteindre un maximum (39 %) après 5 h de contact. Ceci démontre que la fusion des FluidosomesTM avec la cellule bactérienne peut expliquer l'effet bactéricide amplifié des FluidosomesTM comparativement à l'antibiotique libre. De plus, les liposomes utilisés pour effectuer ces expériences ne contenaient pas de tobramycine, démontrant que les FluidosomesTM sont capables d'interagir avec la bactérie sans l'intermédiaire de l'antibiotique. L'antibiotique n'a été encapsulée dans les liposomes pour cette expérience dans le but d'éviter la mort cellulaire.

Le fait que l'incorporation maximale de PKH se produise après 5 h d'incubation avec la souche résistante est très significatif (Fig. 3B, chapitre 2). Cette observation coïncide parfaitement avec le début de l'effet bactéricide précédemment observé après 6 h d'incubation des FluidosomesTM avec *P. aeruginosa* 429 (Beaulac *et al.*, 1998a). Les études de cytométrie en flux démontrent également qu'après 6 h d'incubation, deux populations de cellules bactériennes peuvent être distinguées par rapport à

l'incorporation de PKH2-GL liposomal (Fig.3A et 3B, chapitre 2). Ce phénomène est probablement dû au fait que la concentration de PKH2-GL liposomal reste constante pour la durée de l'expérience tandis que la concentration des cellules bactériennes augmente de façon constante : une population de cellules fluorescentes fait son apparition pendant que la croissance bactérienne continue et permet après un délai de 6 h l'accroissement des cellules non marquées. On peut penser que si suffisamment de PKH liposomal était disponible, éventuellement, toutes les bactéries présentes seraient marquées. Cependant, l'augmentation plus importante de l'autofluorescence après 6 h d'incubation dans la souche 429 comparativement à la souche 25619 ne peut être complètement expliquée par l'explication ci-dessus. La souche 429 produit des pigments comme la pyocyanine lorsqu'elle entre en fin de phase logarithmique. Ce pigment est excitable à la même longueur d'onde que le PKH2-GL. Par conséquent, ceci se traduit par une augmentation de l'autofluorescence des cellules bactériennes.

Les niveaux différents d'incorporation de PKH liposomal en fonction du temps par rapport aux deux différentes souches implique que l'imperméabilité membranaire affecte le temps d'initiation, la rapidité et le taux de fusion des liposomes. D'autres raisons peuvent également expliquer les différences observées dans les événements de fusion. Premièrement, la souche résistante possède un taux de croissance plus lent que la souche de référence. Ceci peut ralentir la fusion puisque la bactérie prend plus de temps à interagir avec les liposomes. Deuxièmement, la composition membranaire de la souche résistante est différente de la souche sensible. Les membranes de la souche résistante contiennent de multiples pompes à reflux et un nombre additionnel de protéines membranaires par rapport à la souche non résistante. Cette présence de protéines ralentirait l'interaction en bloquant quelque peu l'accès des liposomes aux LPS de la membrane externe de la bactérie. Parmi les protéines additionnelles exprimées par la souche résistante, il y a la protéine H. Lorsque cette protéine est exprimée dans la membrane externe, elle interagit fortement avec les LPS remplaçant les ponts Mg^{+2} / Ca^{+2} normalement présents. Cette interaction augmente la rigidité de la membrane externe. Ceci affecterait la fusion en permettant une moins grande interaction et conséquemment fusion des liposomes avec la membrane externe.

été plus lente à se produire avec la souche résistante, le processus de fusion entre les liposomes et les bactéries est quand même assez important pour expliquer l'effet bactéricide précédemment observé avec les FluidosomesTM (Beaulac *et al.*, 1998a).

La capacité des FluidosomesTM à augmenter la pénétration de l'antibiotique dans les cellules bactériennes par un mécanisme de fusion serait dû à la T_C et à la charge de ceux-ci. Compte tenu de la T_C des FluidosomesTM qui montrent un début de déstabilisation à partir de 33°C, ceci pourrait mener à la formation de domaines dans les membranes liposomales permettant aux phospholipides contenus dans ces domaines ainsi qu'à l'antibiotique, de transférer à l'intérieur des membranes bactériennes. Parallèlement, lorsque le liposome entre en contact avec la bactérie, il y aurait déstabilisation de la membrane bactérienne au point de contact. Ceci permettrait aux phospholipides de s'incorporer à la membrane bactérienne tout en permettant à l'antibiotique encapsulé de pénétrer celle-ci. Il est possible que la tobramycine, en raison de sa charge positive, déstabilise encore plus la membrane ce qui favoriserait le processus. La tobramycine, se trouvant à l'interface eau-lipide lorsque les liposomes entrent en contact avec la bactérie ainsi que l'antibiotique libéré, pourrait faciliter l'initiation de la fusion en déstabilisant les ponts calcium et magnésium présents dans la paroi externe de la bactérie. Puisque les bactéries et les FluidosomesTM possèdent une charge négative, il est possible en absence de tobramycine, que le DMPG chargé négativement puisse capter les ions divalents présents dans la membrane externe de la bactérie affaiblissant la membrane et favorissant ainsi la fusion. Cependant comme il a été discuté précédemment, la tobramycine ne semble pas essentielle à la fusion puisque celle-ci se produit en absence de la tobramycine.

Grâce à la fusion, l'antibiotique peut pénétrer plus facilement la bactérie ce qui augmente de beaucoup son efficacité et court-circuite la voie normale de pénétration. C'est la première fois qu'une fusion entre liposomes et bactéries basée sur la T_C est démontrée comme cause d'une augmentation de l'efficacité d'un antibiotique avec des souches résistantes (Beaulac *et al.*, 1996 ; 1998a). Habituellement, des agents encapsulés dans des liposomes rigides peuvent avoir une meilleure efficacité *in vivo* que

l'agent libre, mais ils ont généralement une activité bactéricide plus faible contre des bactéries extracellulaires *in vitro* (Bakker-Woudenberg *et al.*, 1995 ; Klemens *et al.*, 1990 ; Webb *et al.*, 1998). Généralement, l'effet thérapeutique supérieur d'agents encapsulés dans des liposomes est dû au fait que les liposomes sont dirigés vers leur cible où ils sont dégradés, libérant ainsi leur contenu. Les liposomes permettent également une persistance de l'antibiotique au site de l'infection et une diminution de la toxicité de la drogue encapsulée. Des modèles expérimentaux d'infection dans lesquels l'agent thérapeutique était encapsulé dans des liposomes rigides n'ont été efficaces que dans des études *in vivo* lorsque l'infection impliquait des cellules du système phagocytaire mononucléaire (SPM) et des pathogènes intracellulaires obligatoires ou facultatifs (Mehta *et al.*, 1993 ; Onyeji *et al.*, 1995). Dans ces études, la prise en charge des liposomes par les phagocytes était essentielle pour l'obtention d'une efficacité accrue. Avec les FluidosomesTM, l'efficacité bactéricide est présente à la fois *in vitro* et *in vivo* contre des infections extracellulaires et ce, sans l'implication des macrophages (Beaulac *et al.*, 1996 ; 1998a).

Les mécanismes d'action des FluidosomesTM permettent de contrecarrer les mécanismes de résistance en trois étapes : 1) en permettant une pénétration plus rapide et accrue de l'antibiotique dans la bactérie, éliminant ainsi le problème de l'imperméabilité membranaire ; 2) de court-circuiter les pompes à reflux dû la quantité importante d'antibiotique qui pénètre à un moment donné et 3) d'outre passé la capacité des enzymes inactivantes à neutraliser l'antibiotique. De cette façon, plusieurs mécanismes de résistance sont éliminés. Une question s'impose donc alors. Faut-il s'attendre à l'émergence de souches résistantes à l'antibiotique ? Étant donné le mécanisme d'action particulier des FluidosomesTM, une résistance à l'antibiotique serait difficile à induire puisqu'en éliminant trois mécanismes de résistance important, il reste peut d'avenues possibles à la bactérie pour résister. Cependant, une possibilité demeure.

7.2 L'immunogénicité des FluidosomesTM

Par eux-mêmes, les liposomes ne sont pas considérés comme immunogéniques sauf exceptions (Desjardins *et al.*, 1995). Cependant, lorsque combinés à des drogues ou à des molécules antigéniques, les liposomes peuvent démontrer un pouvoir d'adjuvant. Plusieurs facteurs peuvent affecter l'immunogénicité des liposomes : la charge, la composition, la taille et la température de transition de phase (section 1.1.3.3). De plus, ces propriétés peuvent influencer les fonctions biologiques de certaines cellules immunitaires. Par conséquent, il est important de vérifier l'immunogénicité des FluidosomesTM avant d'envisager un traitement potentiel chez l'humain. Pour ce faire, nous avons procédé à des immunisations intra-péritoneales (i.p.) et intra-trachéales répétées pour s'assurer de l'absence d'immunogénicité des FluidosomesTM.

Lorsqu'administrés par voie intra-péritoneales les FluidosomesTM n'ont provoqué aucune réaction immunitaire significative contre les phospholipides ou la tobramycine et ce même après 6 immunisations i.p. (Tableau 2, chapitre 3). La présence de tobramycine dans les liposomes n'a pas induit la production d'anticorps contre les liposomes ou la tobramycine, donc les FluidosomesTM n'ont pas eu d'effet adjuvant. Il semble que le seul moyen d'obtenir une réponse immunitaire contre les FluidosomesTM est de les associer par des liens covalents à une substance immunogénique, comme le lipide A. Dans ce cas, une réponse composée en majorité d'IgM (87 %) suivie d'IgG₁ (13%) a été obtenue. Cette technique a été utilisée pour obtenir un contrôle positif (Lakel *et al.*, 1997). La production presque exclusive d'IgM est due au fait que les lipides produisent généralement une réponse immunitaire T-indépendente, donc la production d'IgM.

Parce que les FluidosomesTM devront être administrés par aérosol la vérification de leur immunogénicité au niveau pulmonaire était indiquée. Suite à trois immunisations intra-trachéales et six immunisations intra-péritoneales, aucune réponse significative n'a été obtenue contre les phospholipides et/ ou la tobramycine (chapitre 3 ; Sachelletti *et al.*, 1998b). Les lavages broncho-alvéolaires pratiqués chez les souris

immunisées par voie intra-trachéale n'ont pas permis de détecter la présence d'anticorps.

Le manque d'immunogénicité des FluidosomesTM peut s'expliquer par les phospholipides utilisés dans leur fabrication et leur taille. Comme il a été mentionné dans la revue de la littérature, la composante majeure des FluidosomesTM est la phosphatidylcholine. Celle-ci possède de faibles propriétés antigéniques. Par conséquent, les chances d'induire une réponse sont moindres. Des résultats similaires ont déjà été observés avec des liposomes composés de ce lipide (Cevc et Seddon, 1993). De plus, la taille relativement petite des FluidosomesTM aide également à réduire les chances d'une réponse contre ceux-ci. Ces deux facteurs combinés réduisent le potentiel immunogénique des FluidosomesTM.

7.3 Développement d'un nouvel ELISA utilisant l'Alcian bleu pour la quantification de la tobramycine

Les méthodes de détection et de quantification d'antibiotiques sont des outils importants en recherche. Jusqu'à ce jour, les seules techniques décrites sont le HPLC, les tests microbiologiques et celles utilisées couramment dans les hôpitaux comme le test AMES (« fluorescent immunoassay ») et le TDx (« fluorescent polarization immunoassay ») (section 1.3.2) (Jandreski et Garbinclus, 1993; Stobberingh *et al*, 1982). Le test le plus couramment utilisé en laboratoire est le test microbiologique. Ce test est cependant long à effectuer et est plus qualitatif que quantitatif. Le HPLC est une méthode très précise mais qui demande l'achat d'équipements coûteux et la dérivatisation des échantillons avant l'analyse. L'utilisation de tests immunoenzymatiques conventionnels pour la détection d'aminoglycosides était impossible parce que des petites molécules comme la tobramycine, ne s'absorbent pas ou très faiblement aux micro-plateaux ELISA. Pour cette raison, les tests ELISA courants, utilisent l'absorption des anticorps contre l'antibiotique aux micro-plateaux pour capturer l'antigène au lieu de l'antigène lui-même. Cependant, la capture de

Dans le but de développer une méthode rapide, précise et peu dispendieuse, nous avons développé un test ELISA pour la quantification de la tobramycine en tirant profit d'une méthode utilisant l'Alcian bleu pour la fixation et la détection de peptides synthétiques et de phospholipides (Lagacé *et al.* 1994 ; Laakel *et al.*1996). Les résultats de cette nouvelle méthode sont présentés au chapitre 4 (Sachetelli *et al.*, 1998c). L'étape significative de la méthode repose sur le pré-traitement des micro-plateaux avec l'Alcian bleu. Ce traitement permet à la tobramycine d'adhérer efficacement à la micro-plaque et par conséquent, rend possible sa quantification. En utilisant une concentration appropriée d'Alcian bleu (0.05%), il est possible de détecter de 0.025 jusqu'à 6 µg/ml de tobramycine et ce, avec une bonne reproductibilité (chapitre 4, tableau 2). À des concentrations supérieures à 6 µg/ml, l'échantillon doit être dilué pour maintenir la précision du test. Dans la fenêtre quantitative du test ELISA, une moyenne de 0.99 et 0.97 des coefficients de corrélation calculés indépendamment pour chaque série d'expérience ont été obtenus pour les variations intra et inter journée, indiquant que ce test est reproductible à l'intérieur de cette fenêtre (voir Tableaux I et II, chapitre 4).

Nous avons également comparé le test ELISA avec les méthodes couramment utilisées telles le HPLC et le test microbiologique. L'ELISA et le HPLC donnent des résultats comparables, bien que l'ELISA présente une sensibilité légèrement plus grande que le HPLC dont le niveau de sensibilité se situe aux environs de 1 µg/ml. Le test ELISA est beaucoup plus sensible que le test microbiologique. Le mécanisme expliquant l'effet de l'Alcian bleu est inconnu. Il est possible que parce que cette molécule possède plusieurs groupements fonctionnels pouvant interagir avec plusieurs types de molécules dans les conditions d'absorption à pH élevé (pH 9.6), des interactions comme des liens hydrogène, électrostatiques et même covalents se produisent.

7.4 L'efficacité bactéricide *in vitro* et *in vivo* des FluidosomesTM sous forme de poudre

Suite à la démonstration de l'activité bactéricide supérieure des FluidosomesTM sous forme liquide *in vitro* et *in vivo* contre *P.aeruginosa* et d'autres bactéries (Beaulac *et al.*, 1996 ; Beaulac *et al.*, 1998a), il était intéressant de déterminer si les FluidosomesTM conservent leur activité bactéricide lorsqu'administrés sous forme lyophilisée *in vitro* et *in vivo*. La lyophilisation constitue une étape intermédiaire dans la fabrication des FluidosomesTM. Les tests *in vitro*, effectués avec les mêmes souches que lors de l'étude précédente soit, *P.aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* et *S. aureus* (Beaulac *et al.*, 1998a), ont démontré que l'efficacité bactéricide des FluidosomesTM sous forme lyophilisée était maintenue contre les bactéries gram-négatives bien que leur efficacité ait diminué (chapitre 5; Beaulac *et al.*, 1998b). Cependant, parce qu'il est impossible de déterminer la quantité d'antibiotique qui est encapsulée versus la quantité non encapsulée suite à son administration à l'état de poudre sèche, la comparaison des résultats entre ces deux formes d'administration des FluidosomesTM est difficile. Les résultats obtenus démontrent que des concentrations de l'antibiotique sous forme lyophilisée sous la CMI des bactéries, lorsqu'ajoutées aux cultures, réduisent après 16 h d'incubation le nombre de UFC de *P.aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* et *E. coli* par un facteur de 17, 40, 47 et 50 fois en comparaison avec la même quantité d'antibiotique libre lyophilisé (Figures 1a à 1e, chapitre 5). De plus, l'antibiotique est efficace seulement s'il est encapsulé dans les FluidosomesTM tel que démontré par le contrôle liposomes vide associé avec de la tobramycine libre qui se comporte exactement comme le contrôle d'antibiotique libre. Ceci démontre que les phospholipides ont un rôle à jouer dans l'efficacité des FluidosomesTM.

Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus avec les FluidosomesTM sous forme liquide (Beaulac *et al.*, 1998a), la forme lyophilisée semble moins efficace. La plus grande efficacité de la forme liquide des FluidosomesTM comparativement à la forme lyophilisée peut s'expliquer par différents facteurs. Les quantités réduites d'antibiotique encapsulés dans la poudre sèche et les différences de morphologie des

liposomes entre la forme liquide et lyophilisée pourraient joué un rôle. La préparation habituelle de la forme liquide des FluidosomesTM comprend une étape de réhydratation et d'extrusion (400 nm) suivie de lavages pour éliminer l'antibiotique non encapsulé. Par conséquent, une préparation liquide composée entièrement d'antibiotique encapsulé et de liposomes d'une taille précise sont utilisés dans ces expériences. Pour préparer les FluidosomesTM sous forme lyophilisée, une quantité précise de tobramycine doit être ajoutée avant l'étape de la lyophilisation lors du processus de fabrication des FluidosomesTM. De plus, parce qu'elles sont utilisées sous forme de poudre, les préparations liposomales ne sont pas sujettes aux étapes suivantes (extrusion et lavages). La tobramycine non encapsulée n'est donc pas éliminée et doit être calculée dans la dose thérapeutique totale. En plus, lorsque de telles préparations sont réhydratées, elles forment des dispersions composées de liposomes de différentes tailles, quantités et possiblement contenant moins d'antibiotique encapsulé. Donc, lorsque les liposomes sont administrés, le pourcentage d'antibiotique qui est encapsulé ne peut être contrôlé directement. Des études effectuées pour déterminer la quantité effectivement encapsulée de tobramycine dans les liposomes suite à une incorporation directe de FluidosomesTM-tobramycine lyophilisés dans du PBS, ont démontré une encapsulation moyenne de 73.5 % pour des doses de 600 µg de tobramycine.

Cependant, le pourcentage d'efficacité d'encapsulation dans le milieu de culture n'a pu être directement mesuré à cause des petites doses d'antibiotique lyophilisé utilisées dans cette étude et du fait que l'antibiotique ne peut être quantifié dans ce milieu de culture. Conséquemment, il nous a été impossible dans cette études de vérifier avec certitude le pourcentage d'encapsulation dans le milieu de culture. Néanmoins, l'efficacité devrait être similaire à celle obtenue avec le PBS puisque les mêmes procédures expérimentales ont été suivies. Il est important de mentionner qu'en clinique, les doses requises d'antibiotique seront suffisamment élevées pour éviter ce problème. Malgré cette différence entre la forme liquide et lyophilisée, les FluidosomesTM en poudre restent plus efficaces que l'antibiotique libre vis-à-vis les bactéries gram-négatives. Ce resultat est très encourageant pour le traitement éventuel d'infections avec *P. aeruginosa* et autres bactéries d'importance médicale. Des

améliorations seront effectuées de façon à optimiser l'effet obtenu avec les FluidosomesTM sous forme de poudre. Ceci pourrait se traduire par une certaine modification de la formulation pour augmenter le taux d'encapsulation, de modifier la méthode de fabrication pour obtenir une préparation d'excellente qualité ou d'augmenter la dose contenue dans les préparations. Cette augmentation de concentration d'antibiotique n'aura pas beaucoup d'impact sur la toxicité puisque l'administration locale du traitement réduit de beaucoup l'absorption systémique.

L'efficacité *in vivo* des FluidosomesTM sous forme lyophilisée a également été déterminée chez un modèle animal d'infection chronique à *P. aeruginosa* (Chapitre 6, Beaulac *et al.*, 1998c). Une fois l'infection pulmonaire implantée, les animaux ont été traités avec des FluidosomesTM- tobramycine, FluidosomeTM- PBS, tobramycine libre et PBS sous forme lyophilisée. Une dose équivalente en tobramycine (soit encapsulée ou libre) de 600 µg a été administrée aux rats infectés à l'aide d'un inhalateur de poudre sèche (microsprayer) de façon intra-trachéale. Seize heures après le traitement, les FluidosomesTM-tobramycine ont démontré un effet bactéricide 300 fois supérieur à la tobramycine libre lyophilisée (chapitre 6, Beaulac *et al.*, 1998c ; Figure 1). Lorsqu'encapsulée, l'antibiotique persistait jusqu'à 16 h tandis que l'antibiotique libre n'était présent que jusqu'à 3 h après le traitement (chapitre 6, Beaulac *et al.*, 1998c ; Figure 2). La persistance de l'antibiotique encapsulé au niveau pulmonaire contribue certainement à augmenter l'efficacité bactéricide de la préparation. De plus, il faut considérer que dans les poumons la présence de fluides et d'une humidité ambiante d'environ 98 % (Johnson *et al.*, 1996) permettent une réhydratation des liposomes lyophilisés et leur interaction avec les bactéries.

Les études de rendement et d'efficacité d'administration ont démontré qu'il y avait une grande différence entre la quantité de FluidosomesTM et d'antibiotique libre administrés. Seulement 57.3 % des liposomes déshydratés ont été éjectés du nébulisateur, comparativement à 97.1 % pour l'antibiotique libre. Ceci suggère que seulement 236.8 µg d'antibiotique encapsulé ont été administrés contre 582.6 µg pour

l'antibiotique libre. L'efficacité réduite du nébulisateur (microsprayer) à livrer les FluidosomesTM comparativement à l'antibiotique libre peut être due aux propriétés hygroscopiques de la préparation de liposomes, tel que suggéré par l'apparence des liposomes demeurés dans l'appareil. En se basant sur les analyses HPLC des niveaux d'antibiotique présents dans les poumons, il faut considérer que seulement de petites quantités de tobramycine se sont rendues dans les poumons suite à l'administration des FluidosomesTM. Malgré cette différence, une réduction de 300 fois du nombre de UFC a été observée avec l'antibiotique encapsulé comparativement à la quantité d'antibiotique libre administrée.

7.5 L'interaction de la tobramycine avec les phospholipides des FluidosomesTM

Les FluidosomesTM sont composés de deux phospholipides: le dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), un lipide neutre, et le dimyristoyl phosphatidylglycérol (DMPG), un lipide chargé négativement. Comme il a été présenté à la section 1.3.4, la tobramycine peut interagir avec les phospholipides chargés négativement. L'objectif était d'étudier l'interaction de la tobramycine avec les deux phospholipides constitutifs des FluidosomesTM et de vérifier si une telle interaction était impliquée dans le mécanisme de fusion. Pour ce faire, des expériences d'affinité et des études de spectrométrie infrarouge ont été effectuées.

7.5.1 Expériences d'affinité

Pour étudier les interactions de la tobramycine avec les FluidosomesTM, la liaison de la tobramycine avec les phospholipides constitutifs a été étudiée à l'aide d'une expérience d'affinité. Les résultats sont présentés à l'annexe II. La figure 1 montre l'interaction de la tobramycine avec le DPPC, les FluidosomesTM et le DMPG à un rapport molaire de 300 molécules de lipides par molécule de tobramycine. Les résultats démontrent que la tobramycine n'a pas d'affinité pour le DPPC, une affinité intermédiaire pour les FluidosomesTM et une forte affinité pour le DMPG. Ceci indique que l'interaction est de nature électrostatique, puisque la tobramycine est chargée positivement et le DMPG négativement. Il n'y a pas d'interaction avec le

DPPC puisque celui-ci est neutre. Sous forme liposomale, le niveau d'interaction peut être expliqué par la quantité relativement faible de DMPG dans les liposomes. Dans la formulation 18-1, le DMPG est plus « dilué » dans les membranes et par conséquent, la charge est moins grande. Il y a donc moins de molécules de tobramycine qui peuvent interagir avec celui-ci. Dans la formulation 10-1, la charge est plus grande. Donc, il y a plus de molécule de tobramycine qui peuvent interagir avec le lipide. Ceci se traduit par une augmentation de la tobramycine liée aux liposomes.

7. 5. 2 Études de spectrométrie infrarouge

Suite aux résultats obtenus dans les expériences d'affinité, une caractérisation plus approfondie de l'effet de la tobramycine sur l'organisation des différentes bicouches lipidiques était nécessaire. Pour ce faire, nous avons utilisé la spectrométrie infrarouge à transformation de Fourier. Les résultats sont présentés à l'annexe II. Nous avons débuté l'analyse des phospholipides par les têtes polaires. La figure 2 montre le spectre infrarouge de l'élongation dans la région des carbonyles du DMPG en phase gel (20°C) et en phase fluide (50°C) pour le DMPG seul (traits pointillés) et le DMPG incubé avec de la tobramycine (traits pleins). Les résultats démontrent que dans les deux phases, la tobramycine cause une diminution dans la proportion des groupements carbonyles qui participent à des liens hydrogène. Par conséquent, ceci suggère que la tobramycine interagit avec le DMPG causant une déshydratation à l'interface lipidique. La tobramycine prend donc la place de l'eau dans les membranes. Ce déplacement de l'eau est plus important en phase fluide qu'en phase gel puisque qu'en phase gel, le lipide est moins hydrater. Le lipide est donc plus hydrater en phase fluide qu'en phase gel et par conséquent, l'effet est plus important en phase fluide.

La figure 3 est le spectre infrarouge de l'élongation dans la région carbonyle du DPPC en phase gel (20°C) et en phase fluide (50°C) pour le DPPC seul (traits pointillés) et le DPPC incubé avec de la tobramycine (traits pleins). Les résultats

démontrent que dans des conditions favorisant une interaction lipides/ tobramycine, l'antibiotique induit une augmentation de la proportion de carbonyles lipidiques formant des liaisons hydrogènes. Ceci suggère que la tobramycine cause des perturbations à l'interface DPPC/eau permettant une plus grande pénétration de l'eau au niveau de l'interface de la bicouche. Les résultats présentés démontrent donc que la tobramycine agit à la surface des lipides en déplaçant l'eau à l'interface, tout en perturbant quelque peu la membrane. Donc, même s'il ne semble pas y avoir de liaison du DPPC avec la tobramycine, en spectrométrie infrarouge un effet de la tobramycine sur le DPPC peut qu'en même être observé. Ceci est dû au fait qu'en spectrométrie infrarouge, les interactions entre la tobramycine et le DPPC sont favorisées par les fortes concentrations utilisées. On force donc la tobramycine à interagir avec le lipide.

Pour vérifier si l'interaction de la tobramycine avec les lipides affectait plus profondément ceux-ci, les chaînes acyles des phospholipides ont été étudiées. La figure 4 représente une courbe de transition de phase pour le DMPG seul et le DMPG incubé avec de la tobramycine. Comme indicateur d'interaction, les vibrations symétriques des liaisons C-H associées au niveau des chaînes acyles du lipide ont été analysées. La présence de tobramycine n'affecte pas la température de transition de phase de l'état gel à l'état fluide du lipide. De plus, la tobramycine n'a que très peu d'effet sur l'ordre des chaînes acyles du lipide en phase gel et fluide supportant l'observation que l'interaction entre le DMPG et la tobramycine a lieu essentiellement au niveau de l'interface.

La figure 5 (annexe II) représente une courbe de transition de phase pour le DPPC seul et le DPPC incubé avec la tobramycine. Encore une fois comme indicateur d'interaction, nous avons utilisé la vibration symétrique des liaisons C-H associées aux chaînes acyles du lipide. Le même effet qu'avec le DMPG a été observé, soit que la présence de tobramycine ne semble pas affecter la température de transition de phase du lipide et qu'elle n'a que très peu d'effet sur l'ordre des chaînes acyles du lipide en phases gel et fluide. Ceci démontre que si une interaction entre le DPPC et la

tobramycine a lieu, l'interaction ainsi induite se produit essentiellement au niveau de l'interface eau/lipide. Ces résultats impliquent donc que la tobramycine s'intercale à l'interface eau-lipide des membranes liposomales et qu'elle n'affecte pas les propriétés physico-chimiques des FluidosomesTM, puisque la température de transition de phase n'est pas modifiée. De plus, aucun autre effet visible n'a pu être observé. Cette interaction pourrait être impliquée dans le mécanisme d'action des FluidosomesTM. Lorsque des FluidosomesTM contenant de la tobramycine sont mis en contact avec des bactéries, ceux-ci s'accrochent à la surface de la bactérie. La tobramycine présente à l'interface pourrait donc interagir avec les ions divalents présents dans la paroi externe de la bactérie. Il y aurait alors déstabilisation de la membrane externe ce qui créerait une brèche dans celle-ci. Les phospholipides, aidés par la tobramycine, peuvent commencer à s'incorporer dans la membrane, initiant donc le processus de fusion. La tobramycine pourrait donc aider au phénomène de fusion. Cependant, la tobramycine ne semble pas essentielle à l'initiation de ce phénomène puisque les expériences de fusion effectuées avec des FluidosomesTM marqués au PKH mais ne contenant pas de tobramycine ont démontré une forte intégration des phospholipides marqués dans la bactérie.

Les travaux de recherche réalisés jusqu'à maintenant suggèrent que les FluidosomesTM ont le potentiel pour devenir une avenue thérapeutique efficace pour le traitement des infections chroniques qui résistent à l'antibiothérapie conventionnelle. Ce travail suggère fortement que le processus de fusion entre les liposomes et les membranes bactériennes est responsable de l'activité bactéricide des FluidosomesTM. De plus, les FluidosomesTM ne démontrent pas un effet adjuvant vis-à-vis la drogue encapsulée et ne sont pas immunogéniques par eux-mêmes. Ils conservent une activité bactéricide importante même lorsqu'utilisés sous forme de poudre. Le processus pour la réalisation des études pré-cliniques et cliniques a été enclenché.

Ce travail présente une utilisation possible des FluidosomesTM. Cependant, les FluidosomesTM peuvent être utilisés comme véhicules pour d'autres agents

thérapeutiques comme des anti-fongiques, d'autres types antibiotiques et du matériel génétique comme des plasmides, élargissant leur potentiel comme nouvel agent thérapeutique dans le traitement de diverses infections causées par une multitude de pathogènes. Ces possibilités sont présentement sous investigation ou le seront prochainement.

Bibliographie

Abra, R.M., Hunt, C.A. (1981) Liposome disposition in vivo. III. Dose and vesicle-size effects. *Biochim. Biophys. Acta*, **660**, 493-503.

Ackerman, B.H., Dellobuono, F.A. (1996) In vitro testing of antibiotics. *Pharmacotherapy*, **16**, 201-222.

Allen, T. M. (1994) Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmac. Sci.*, **15**, 215-220.

Allen, T.M., Austin, G.A., Chonn, A., Lin, L., Lee, K.C. (1991) Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**, 56-64.

Allen, T.M., Hansen, C.B., Guo, L.S.S. (1993) Subcutaneous administration of liposomes: a comparison with the intravenous and intraperitoneal routes of injection. *Biochim. Biophys. Acta*, **1150**, 9-16.

Allen, T.M., Hong, K., Papahadjopoulos, D. (1990) Membrane contact, fusion, and hexagonal (HII) transitions in phosphatidylethanolamine liposomes. *Biochemistry*, **29**, 2976-2985.

Allen, T.M., Williamson, P., Schlegel, R.A. (1988) Phosphatidylserine as a determinant of reticuloendothelial recognition of liposome models of the erythrocyte surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 8067-8071.

Allison, A.C., Gregoriadis, G. (1974) Liposomes as immunological adjuvants. *Nature*, **252**, 252.

Alving, C.R. (1990) Antibodies to liposomes, phospholipids and cholesterol: Implication for autoimmunity, atherosclerosis, and aging, *Horizons in membrane biotechnology*, C. Nicolau and D. Chapman eds., Wiley-Liss, New York, p 41.

Alving, C. R. (1984) Natural antibodies against phospholipids and liposomes in humans, *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 342-344.

Antos, M., Trafny, E.A., Grzybowski, J. (1995) Antibacterial activity of liposomal amikacin against *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. *Pharm. Res.*, **32**, 85-87.

Antos, M., Trafny, E.A., Grzybowski, J. (1996) The influence of *Pseudomonas aeruginosa* on liposomes. *Folia Microbiol.*, **41**, 29-32.

Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., Ten Kate, M.T., Stearne-Cullen, L.E.T., Woodle, M.C. (1995) Efficacy of gentamicin or ceftazidime entrapped in liposomes with prolonged blood circulation and enhanced localization in *Klebsiella pneumoniae*-infected lung tissue. *J Of Infec. Dis.*, **171**, 938-947.

Bally, M.B., Nayan, R., Masin, D., Hope, M.J., Cullis, P.R., Mayer, L.D. (1990) Liposomes with entrapped doxorubicin exhibit extended blood residence times. *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 133-139.

Banerji, B., Kenny, J.J., Scher, I, Alving, C.R. (1982) Antibodies against liposomes in normal and immune- deficient mice. *J. Immunol.*, **128**, 1603-1607.

Bangham, A. D., Standish, M.M., Watkins, J.C. (1965) Diffusion of univalent Ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252.

- Barclay, M.L., Begg, E.J., Chambers, S.T., Thornley, P.E., Pattemore, P.K., Grimwood, K. (1996) Adaptive resistance to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis, *J Antimicrob. Chemother.*, **37**, 1155-1164.
- Barclay, M.L., Begg, E.J., Chambers, S.T. (1992) Adaptive resistance following single dose of gentamicin in a dynamic in vitro model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**, 1951-1957.
- Barends, D.M., Swaan, A., Hulshoff, A. (1981a) Improved microdetermination of gentamicin and sisomicin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.*, **222**, 316-323.
- Barends, D.M., Zwaan, C.L., Hulshoff, A. (1981b) Micro-determination of tobramycin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.*, **225**, 417-426.
- Barenholz, Y., Gibbes, D., Litman, B.J., Goll, J., Thompson, T.E., Carlson, F.D. (1977) A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles, *Biochemistry*, **10**, 2806-2810.
- Beaulac, C., Clément-Major, S., Hawari, J., Lagacé, J (1996) Eradication of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 665-669.
- Beaulac, C., Clément-Major, S., Hawari, J., Lagacé, J. (1997) In vitro kinetics of drug release and pulmonary retention of microencapsulated antibiotic in liposomal formulation in relation to the lipid composition. *J. Microencapsulation*, **14**, 335-348.
- Beaulac, C., Sachtelli, S., Lagacé, J. (1998a) In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentration of liposome-encapsulated antibiotic against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, **41**, 35-41.

Beaulac, C., Sachetelli, S., Lagacé, J. (1998b) In vitro bactericidal evaluation of low phase transition temperature liposomal tobramycin as dry powder preparation against gram-negative and gram-positive bacteria. Article soumis à J. Liposome Research.

Beaulac, C., Sachetelli, S., Lagacé, J. (1998c) Aerosolization of low phase transition temperature liposomal tobramycin as dry powder in an animal model of chronic pulmonary infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Article accepté pour publication dans J. Drug Targeting.

Bellido, F., Martin, N.L., Siehnel, R.J., Hancock R.E.W. (1992) Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. J. Bacteriol., **174**, 5196-5203.

Beaumier, P.L., Hwang, K.J. (1983) Effects of liposome size on the degradation of bovine brain sphingomyelin/cholesterol liposomes in the mouse liver. Biochim. Biophys. Acta, **731**, 23-30.

Betageri, G.V., Jenkins, S.A., Parsons, D.L. (1993a) Preparation of liposomes dans Liposome drug delivery systems, Betageri, G.V., Jenkins, S.A., Parsons, D.L. eds., Technomic Pub., Lancaster, PA, p 1-4.

Betageri, G.V., Jenkins, S.A., Parsons, D.L. (1993b) Targeting of liposomes dans Liposome drug delivery systems, Betageri, G.V., Jenkins, S.A., Parsons, D.L. eds., Technomic Pub., Lancaster, PA, p 100-101.

Betageri, G.V., Jenkins, S.A., Parsons, D.L. (1993c) Pharmacokinetics of liposome products dans Liposome drug delivery systems, Betageri, G.V., Jenkins, S.A., Parsons, D.L. eds., Technomic Pub., Lancaster, PA, p 57-72.

Betageri, G.V., Jenkins, S.A., Parsons, D.L. (1993d) Pharmacokinetics of liposome products dans Liposome drug delivery systems, Betageri, G.V., Jenkins, S.A., Parsons, D.L. eds., Technomic Pub., Lancaster, PA, p 53.

Brady, M.S. Kats, S.E. (1988) Microbial diffusion assay for antibiotics in feeds using a simplified design. *J. Assoc. Off. Anal. Chemists*, **71**, 717-720.

Briles, D. E., Hanh, M., Schroer, K., Davies, J., Baker, P., Kearney, J., Barletta, R. (1981) Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*, *J Exp. Med.*, **153**, 694-705.

Bryan, L.E. (1989) Two forms of antimicrobial resistance : bacterial persistence and positive function resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, **23**, 817-823.

Cevc, G., Seddon, J.M. (1993) Physical characterization dans Phospholipids Handbook, G. Cevc ed., Marcel Dekker, New York, p372-373.

Chen, S. S. H. and Keenan, R. (1977) Effect of phosphatidylcholine liposomes on the mitogen-stimulated lymphocyte activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 852-858.

Chin, D., R.M. Straubinger, S. Acton, I. Nathke, F.M. Brodsky (1989) 100-kDa polypeptides in peripheral clathrin-coated vesicles are required for receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 9289-9293.

Chu, C., Dijkstra, J., Lai, M., Hong, K., Szoka, F.C. (1990) Efficacy of cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes to cells in culture. *Pharm. Res*, **7**, 824-834.

- Chung, L., Kaloyanides, G., McDaniel, R., McLaughlin, A. McLaughlin, S. (1985) Interaction of gentamycin and spermine with bilayer membranes containing negatively charged phospholipids. *Biochemistry*, **24**, 442-452.
- Conway, S.P., Watson, A., Pond, M.N., Bayston, S., Booth, R., Ghoneim, A. (1993) Sputum gentamicin (G) levels after delivery by rotahaler and nebulizer. *Ped. Pulmonol.*, **Suppl 9**, 250.
- Crystal, R.G., McElvaney, N.G., Rosenfeld, M.A., Chu, C.S., Mstrangeli, A., Hay, J.G., Brody, S.L., Jaffe, H.A., Eissa, N.T., Danel, C. (1994) Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis *Nature Genetics*, **8**, 42-51.
- Dabrowski, M.P., Peel, W.E. and Thomson, A. E. R. (1980) Plasma membrane cholesterol regulates human lymphocyte cytotoxic function. *Eur. J. Immun*, **10**, 821-827.
- Daikos, G.L., Jackson, G.G., Lolans, V.T., Livermore, D.M. (1990) Adaptive resistance to aminoglycosides antibiotics from first exposure down-regulation. *J. Infect. Dis.*, **162**, 414-420.
- Dal Monte, P., Szoka, F (1989). Effect of liposomes encapsulation on antigen presentation in vitro : comparison of presentation by peritoneal macrophages and B cells tumors, *J. Immunol.* **142**, 1437-1440.
- Daleke, D., Hong, K., Papahadjopoulos, D. (1990) Endocytosis of liposomes by macrophages : binding, acidification, and leakage of liposomes monitored by a new fluorescences assay. *Biochim. Biophys. Acta*, **1024**, 352-366.
- Davies, J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, **264**, 277-282.

- Davis, D., Gregoriadis, G. (1989) Primary immune response to liposomal tetanus toxoid in mice: the effect of mediators. *Immunology*, **68**, 277-282.
- Dees, C., Schultz, R.D. (1990) The mechanism of enhanced intraphagocytic killing of bacteria by liposomes containing antibiotics. *Vet. Imm. And Immunopath.*, **24**, 135-146.
- Desjardins, R., Krzystyniak, K., Thérien, H.M., Banska, W., Tancrede, P., Fournier, M. (1995) Immunoactivating potential of multilamellar liposomes vesicles (MLV) in murine popliteal lymph node (PLN) test. *Int. J. Immunopharmac.*, **17**, 367-374.
- Elwell, L.P., Fling, M.E. (1989) in *Handbook of experimental pharmacology*, Bryan, L.E., ed., Springer-Verlag, Berlin, **Vol 91**, p 291-312.
- Fiel, S.B. (1995) Aerosol delivery of antibiotics to the lower airways of patients with cystic fibrosis. *Chest*, **107**, 61S-64S.
- Fraley, R.T., Fornari, C.S., Kaplan, S. (1979) The physical state of the intracytoplasmic membrane of *Rhodospseudomonas sphaeroides* and its relationship to the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 3348-3352.
- Francis, M.J. Fry, C.M., Rowlands, D. (1985) Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol.*, **66**, 2347-2354.
- Friede, M. (1994) Liposomes as carriers of antigen dans Liposomes as tools in basic research and industry. J.R. Philippot and F. Schuber eds., CRC Press, Boca Raton, FL., p 171.
- Geiger, K., Gallagher, M.L., Hedley-White, J. (1975) Cellular distribution and clearance of aerosolized dipalmitoyl lecithin., *J Appl. Physiol.*, **39**, 759-766.

Gilbert, D.N. (1995) Aminoglycosides dans Principles and practice of infectious diseases. Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. eds., New York : Churchill Livingstone, p 279-306.

Goldman, J.M., Boyston, S.M., O'Connor, S., Meigh, R.E. (1990) Inhaled micronised gentamicin powder : a new delivery system. *Thorax*, **45**, 939-940.

Gonzales-Rothi, R.J., Straub, L., Cacace, J.L., Schreier, H., (1991) Liposomes and pulmonary alveolar macrophages : functional and morphologic interactions. *Exp. Lung Res.*, **17**, 687-705.

Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J.-I., Nishino, T. (1995) The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *MexA-MexB-OprM* multidrug operon. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2567-2569.

Gregoriadis, G. (1990a) Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today*, **11**, 215-220.

Gregoriadis, G. (1990b). Immunological adjuvants : a role for liposomes. *Immunol. Today*, **11** , 89-97.

Gregoriadis, G. (1988) Fate of injected liposomes : Observations on entrapped solutes retention, vesicles clearance and tissue distribution *in vivo* dans Liposomes as drug carriers. G. Gregoriadis ed, New York, N.Y., J. Wiley and Sons, p 3-18.

Gregoriadis, G (1976) The carrier potential of liposomes in biology and and medecin. *N. Engl. J. Med.*, **295**, 704-710.

Gregoriadis, G., Davis, D., Davies, A. (1987) Liposomes as immunological adjuvants : antigen incorporation studies, *Vaccine*, **5**, 145-151.

Gregoriadis, G., Panagiotidi, C. (1989) Immunoadjuvant action of liposomes: comparison with other adjuvants. *Immun. Lett.*, **20**, 237-240.

Griesenbach, U., Chonn, A., Cassady, R., Hannam, V., Ackerley, C., Post, M., Tanswell, A.K., Olek, K., O'Brodovich, H., Tsui, L.-C. (1998) Comparison between intratracheal and intravenous administration of liposomes-DNA complexes for cystic fibrosis lung gene therapy. *Gene Therapy*, **5**, 181-188.

Hancock, R.E.W. (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentive gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis.*, **27(suppl 1)**, S93-99.

Hancock, R.E.W., Bell, A. (1988) Antibiotic uptake in gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **7**, 713-720.

Hancock, R.E.W., Piers, K., Brown, M., Falla, T., Gough, M., Wu, M., Fidai, S. (1996) Cationic peptides : a class of antibiotics able to access the self-promoted uptake pathway across the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane dans *Molecular biology of Pseudomonads*, T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Hass eds., ASM Press, Washington, D.C., p 442.

Hancock, R.E.W., Speert, D.P. (1996) Antibiotics for *Pseudomonas aeruginosa* and related infections dans : Dodge, J.A., Brock, D.J.H., Widdicome, J.H. eds., *Cystic Fibrosis : current topics*. New York, John Wiley & Sons Inc., p 245-266.

Heath, T.D., Edwards, D.C., Ryman, B.E. (1976) The adjuvant properties of liposomes. *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 129-133.

- Hoekstra, D., de Boer, T., Klappe, K., Wilschut, J. (1984) Fluorescent method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry*, **23**, 5675-5681.
- Hwang, K.J. (1987) Liposomes Pharmacokinetics dans Liposomes : From biophysics to therapeutics. M.J. Ostro editeur, New York, N.Y. : Marcel Dekker, Inc., pp 109-156.
- Jandreski, M.A., Garbincius, J. (1993) Measurement on antimicrobial agents in cerebrospinal fluid using the Abbott TDx analyzer, *J. Clinical Lab. Anal.*, **7**, 263-268.
- Jenkinson, H.F. (1996) Ins and outs of antimicrobial resistance : era of the drug pumps, *J. Dent. Res.*, **75**, 736-742.
- Jiang, L., Patel, D.J. (1998) Solution structure of the tobramycin-RNA aptamer complex. *Nature Struc. Bio.*, **5**, 760-774.
- Johnson, D.L., Wenger, E.N., Polikandritou-Lambros, M. (1996) Aerosolization and hygroscopic growth evaluation of lyophilized liposome aerosols under controlled temperature and relative humidity. *Aerosol Sc. and Tech.*, **25**, 22-30.
- Jones, M.N., Kaszuba, M., Hill, K.J., Song, Y.-H., Creeth, J.E. (1994) The use of phospholipid liposomes for targeting to oral and skin associated bacteria. *J. Drug Targeting*, **2**, 381-389.
- Jones, N.C., M.J. Osborn. (1977a) Interaction of *Salmonella typhimurium* with phospholipid vesicles. Incorporation of exogenous lipids into intact cells. *J Biol. Chem.*, **252**, 7398-7404.
- Jones, N.C., M.J. Osborn. (1977b) Translocation of phospholipids between the outer and inner membranes of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, **252**, 7405-7412.

Karlowsky, J.A., Hoban, D.J., Zelenitsky, S.A., Zhanel, G.G. (1997b) Altered *denA* and *anr* gene expression in aminoglycoside adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother., **40**, 371-376.

Karlowsky, J.A., Saunders, M.H., Harding, G.A.J., Hoban, D.J., Zhanel, G.G. (1996) In vitro characterization of aminoglycoside adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., **40**, 1387-1393.

Karlowsky, J.A., Zelenitsky, S.A., Zhanel, G.G. (1997a) Aminoglycoside adaptive resistance. Pharmacotherapy, **17**, 549-555.

Kellaway, I.W., Farr, S.J. (1990) Liposomes as drug delivery systems to the lung. Adv. Drug Delivery Rev., **5**, 149-161.

Kirby, C., J. Clark, G. Gregoriadis (1980) Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. Biochem J., **186**, 591-598.

Klemens, S.P., Cynamon, M.H., Swenson, C.E., Ginsberg, R.S. (1990) Liposome-encapsulated-gentamicin therapy of *Mycobacterium avium* complex infection in beige mice. Antimicrob. Agents Chemother., **34**, 967-970.

Köhler, T., Kok, M., Michea-Hamzehpour, M., Plesiat, P., Gotoh, T., Nishino, L., Curty, L.K., Pechere, J.-C. (1996) Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., **40**, 2288-2290.

Krzystyniak, K., Desjardins, R., Thérien, H.M., Banska, W., Tancrede, P. and Descotes, J. (1994) Lymphocyte activation by liposome-trapped streptozotocin in murine popliteal lymph node (PLN) test. II. Comparative analysis with acute Graft-Versus-Host reaction in H-2 incompatible F1 hybrids. *J. Immunotoxic. Immunopharmac.*, **16**, 817-824.

Laakel, M., Bouchard, M., Lagacé, J. (1996) Measurement of mouse anti-phospholipid antibodies to solid-phase microspheres by both flow cytometry and Alcian blue-pretreated microtitre plates in an ELISA. *J. Immun. Methods*, **190**, 267-273.

Lagacé, J., Arsenault, S., Cohen, E.A. (1994) Alcian blue-treated polystyrene microtiter plates for the use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J. Immunol. Methods*, **175**, 131-135.

Latif, N.A., Bachhawat, B.K. (1987) Liposome as an adjuvant for the production of estradiol antibodies. *Immunol. Lett.*, **15**, 45-51.

Laurent, G., Carlier, M.B., Rollman, B., Van Hoof, F., Tulken, P. (1982) Mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipodosis : In vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3861-3870.

Laurent, G., Kishore, B.K., Tulken, P.M. (1990) Aminoglycoside-induced phospholipodosis and nephrotoxicity (commentary). *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 2383-2392.

Le Conte, P., Potel, G., Peltier, P., Horeau, D., Caillon, J., Juvin, M.-E., Kerguéris, M.-F., Bugnon, D., Baron, D. (1993) Lung distribution and pharmacokinetics of aerosolized tobramycin. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **147**, 1279-1282.

Ledley, F.D. (1996) Pharmaceutical approach to somatic gene therapy. *Pharm. Res.*, **13**, 1595-1614.

Lee, K.-D., Hong, K., Papahadjopoulos, D. (1992) Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochim Biophys Acta*, **1103**, 185-97.

Lee, K.D., Nir, S., Papahadjopoulos, D. (1993) Quantitative analysis of liposome-cell interactions in vitro : Rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J744 cells and human monocytes. *Biochemistry*, **32**, 889-899.

Lelkes, P.I., L. Klein, Y. Marikovsky, M. Eisenbach (1984) Liposome-mediated transfer of macromolecules into flagellated cell envelopes from bacteria. *Biochemistry*, **23**, 563-568.

Li, X.-Z., Nikaido, H., Poole, K. (1995) Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 1948-1953.

Li, X.-Z., Zhang, L., Srikumar, R. Poole, K. (1998) Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, **42**, 399-403

Majumdar, S., Flasher, D., Friend, D.S., Nassos, P., Yajko, D., Hadley, W.K., Düzgünes, N. (1992) Efficacies of liposome-encapsulated streptomycin and ciprofloxacin against *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex infections in human peripheral blood monocytes/ macrophages. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **36**, 2808-2815.

Mansour, S., Thibobeau, L., Perrin, P., Sureau, P., Mercier, G., Joffret, M.L., Oth, D. (1988) Enhancement of antigen-specific interleukin-2 production by adding liposomes to rabies antigens for priming. *Immun. Lett.*, **18**, 33-36.

- Maxwell, A. (1992) The molecular basis of quinolone action. *J. Antimicrob. Chemother.*, **30**, 409-414.
- Mayhew E., Ito, E., Lazo, R. (1987) Toxicity of non-drug containing liposomes for cultured human cells. *Exp. Cell Res.*, **171**, 195-202.
- Mehta, R.T., Keyhani, A., McQueen, T.J., Rosebaum, B., Rolston, K.V. and Tarrand, J.J. (1993) *In-vitro* activities of free and liposomal drugs against *Mycobacterium avium-M. intracellular complex* and *M. tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 2584-7.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Brasseur, R., Schanck, A. (1995) Molecular parameters involved in aminoglycoside nephrotoxicity. *J. Tox. Environ. Health*, **44**, 263-300.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Laurent, G., Kishore, B.K., Tulken, P.M. (1991) Aminoglycosides nephrotoxicity. *Life Sci, Adv. (Biochem. Pharmacol.)*, **10**, 113-141.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Piret, J. Brasseur, R., Tulken, P.M. (1990) Effect of acidic phospholipids on the activity of lysosomal phospholipases and on their inhibition by aminoglycosides antibiotics. I. Biochemical analysis. (*Biochem. Pharmacol.*), **40**, 489-497.
- Mukhopadhyay, S., Singh, M., Ogston, S., Ryan, G., Symth, R. (1998) Systematic review of nebulized antibiotics in cystic fibrosis : evolution of protocol. *J. R. Soc. Med.*, **91**, Suppl 34, 25-29.
- New, R.R.C., Black, C.D.V., Parker, R.J., Puri, A., Scherphof, G.L. (1990) Liposomes in biological systems dans *Liposomes. A practical approach*. R.R.C. New ed., Oxford university press, Oxford, p 221-253.

- New, R.R.C. (1995) Influence of liposome characteristics on their properties and fate dans Liposomes as tools in basic research and industry, Philipot, J.R., Schuber, F. eds., CRC Press, Boca Raton, Fl, p 3-20.
- Nicholov, R., Khoury, A.E., Bruce, A.W., Dicosmo, F. (1993) Interaction of ciprofloxacin loaded liposomes with *Pseudomonas aeruginosa* cells. Cell & Materials, **3**, 321-326.
- Nicolau, C., S. Rotten.(1982) Expression of a beta-lactamase activity in Mycoplasma capricolum transfected with the liposome-encapsulated *E.coli* pBR 322 plasmid. Biochem. Biophys. Res. Commun., **108**, 982-986.
- Nikaido, H., Hancock, R.E.W. (1988) Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa* dans Sokatch J., ed. The bacteria. Vol 10. Orlando, Florida : Academic Press, p 145-193.
- Nikaido, H., Nikaido K., Harayama, S. (1991) Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem., **266**, 770-779.
- Nikaido, H., Okusu, H., Ma, D., Li., X.-Z. (1996) Multidrug efflux pumps make a major contribution to drug resistance in Pseudomonads dans Molecular biology of Pseudomonads, T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Hass eds., ASM Press, Washington, D.C., p 357.
- Nordera, P., Serra, M.D., Menestrina, G. (1997) The adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A to phospholipid monolayers is controlled by pH and surface potential. Biophys. J., **73**, 1468-1478.
- Okii, M., Iyobe, S. Mitsuhashi, S. (1983) Mapping og the gene specifying aminoglycoside 3'- phosphotransferase II of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. J. Bacteriol., **155**, 643-649.

- Onyeji, C.O., Nightingale, C.H, Tessier, P.R., Nicolau, D.P. , Bow, L.M. (1995) Activities of clarithromycin, azithromycin, and ofloxacin in combination with liposomal or unencapsulated granulocytes-macrophage colony-stimulating factor against intra-macrophage *Mycobacterium avium*- *Mycobacterium intracellulare*. J. Infec. Dis., **172**, 810-816.
- Onyeji, C.O., Nightingale, C.H., Marangos, M.N. (1994) Enhanced killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human macrophages by liposomes-entrapped vancomycin and teicoplanin. Infection, **22**, 338-342.
- Patel, H.M., Ryman, B.E. (1981) Systemic and oral administration of liposomes dans Liposomes : From physical structure to therapeutic applications. C.G. Kinght ed, Amsterdam, Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, p. 409-441.
- Pedersen, S. (1987) Inhaler use in children with asthma. Danish. Med. Bull., **34**, 234-249.
- Pederson, S. (1996) Inhalers and nebulizers : which to choose and why. Respiratory Medecine, **90**, 67-77.
- Philips, N.C., Major, P.P. Ishida, M. and Sikorska, H. (1987) Liposomal incorporation and immunogenicity of carcinoembryonic antigen. J. Biol. Resp. Modif., **6**, 581-586.
- Phillips, N., Emili, A. (1992) Enhanced antibody response to liposome-associated protein antigens : preferential stimulation of IgG_{2a}/ production, Vaccine, **10**, 151-158.
- Phillips, N.C., Gagné, L., Ivanoff, N., Riveau, G. (1995) Influence of phospholipid composition on antibody responses to liposome encapsulated protein and peptide antigens. Vaccine, **14**, 898-904.

- Poole, K., Krebs, K., Mc Nally, C., Neshat, S. (1993) Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.*, **175**, 7363-7372.
- Poste, G., Kirsh, R., Koestler, T. (1984) The challenge of liposome targeting in vivo dans Liposome technology : Targeted drug delivery and biological interaction. G. Gregoriadis ed, Boca Raton, Fl, CRC Press, p 1-28.
- Price, C.I., Horton, J.W., Baxter, C.R. (1992) Liposome delivery of aminoglycosides in burn wounds. *Sur. Gynecol. Obst.*, **174**, 414-418.
- Ravaoarinaro. M., A. Omri. (1996) Comparison of the bactericidal action of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation against *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy*, **42**, 170-176.
- Richards, R., Hayne, M., Hockmeyer, W., Alving, C. (1988) Liposomes, lipid A and Alum enhance the immune response to a synthetic malaria sporozite antigen, *Infect. Immun.*, **56**, 682-686.
- Sachetelli, S., Beaulac, C., Sénéchal, S., Lagacé, J. (1998a) Demonstration of a fusion mechanism between a fluid liposomal formulation and bacterial cells. Article soumis à *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Sachetelli, S., Beaulac, C., Riffon, R., Lagacé, J. (1998b) Evaluation of the pulmonary and systemic immunogenicity of FluidosomesTM, a liposomal-tobramycin formulation for the treatment of bacterial infections. Article soumis à *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Sachetelli, S., Beaulac, C., Lagacé, J. (1998c) Aminoglycoside detection using a universal ELISA binding procedure onto polystyrene microtiter plates in comparison

with HPLC analysis and microbiological agar-diffusion assay. *Biochim. Biophys. Acta*, **1379**, 35-41.

Sanderson, N.M., Guo, B., Jacob, A.E., Handley, P.S., Cunniffe, J.G., Jones, M.N. (1996) The interaction of cationic liposomes with skin-associated bacterium *Staphylococcus epidermidis*: effects of ionic strength and temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, **1283**, 207-214.

Schuster, B.G., Neidig, M., Alving, M. and Alving, C. R. (1979) Production of antibodies against phosphocholine, phosphatidylcholine, sphigomyelin, and lipid A by injection of liposomes containing lipidA, *J Immunol.*, **122**, 900-905.

Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H. (1993) Molecular genetics of aminoglycosides resistance genes and familial relationship of the aminoglycosides-modifying enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 13-163.

Silvius, J.R., Leventis, R., Brown, P.M., Zuckermann, M. (1987) Novel fluorescent phospholipids for assays of lipid mixing between membranes. *Biochemistry*, **26**, 4279-4287.

Spartt, B.G. (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, **264**, 388-393.

Spötl, L., Sarti, A., Dierich, M.P., Möst, J. (1995) Cell membrane labeling with fluorescent dyes for the demonstration of cytokine-induced fusion between monocytes and tumor cells. *Cytometry*, **21**, 160-169.

Stobberingh, E.E., Houben, A.W., van Boven, C.P. (1982) Comparison of different tobramycin assays. *J. Clin. Microbiol.*, **15**, 795-801.

Storm, G., Van Etten, E. (1997) Biopharmaceutical aspects of lipid formulations of amphotericin B. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **16**, 64-73.

Strom, G., Crommelin, D.J.A. (1998) Liposomes : quo vadis ? *PSTT*, **1**, 19-31.

Straubiner, R.M., Hong, K., Friend, D.S., Papahadjopoulos, D. (1983) Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles. *Cell*, **32**, 1069-1079.

Su, D., Van Rooijen, N. (1989) The role of macrophages in the immunoadjuvant action of liposomes : liposome associated albumin antigen. *Immunology*, **66**, 466-470.

Szenbeni, J. (1998) The interaction of liposomes with the complement system. *Crit. Rev. Ther. Drug Car. Sys.*, **15**, 57-88.

Szoka, F. (1992) The macrophage as the principal antigen presenting cell for liposomes encapsulated antigen. *Res. Immunol.*, **143**, 186-188.

Then, R.L. (1989) *Handbook of experimental pharmacology*, Bryan, L.E., ed., Springer-Verlag, Berlin, **Vol 91**, p 249-290.

Thérien, H.M., Shahum, E. (1988) Immunopotentiality on the humoral response by liposomes : effect of a T-cell polyclonal activator. *Cell. Immun.*, **116**, 320-330.

Tomlinson, S., Taylor, P. W., Luzio, J.P. (1989) Transfer of phospholipid and protein into envelope of gram-negative bacteria by liposome fusion. *Biochemistry*, **28**, 8303-8311.

Touw, D.J., Brimicombe, R.W., Hodson, M.E., Heijerman, H.G.M., Bakker, W. (1995) Inhalation of antibiotics in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.*, **8**, 1594-1604.

Tulken, P.M. (1986) Experimental studies on nephrotoxicity of aminoglycosides at low doses : Mechanisms and perspectives. *Am. J. Med.*, **80**, 105-114.

Tulken, P.M. (1989) Nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol. Lett.*, **46**, 107-123.

Tulken, P.M., Mingeot-Leclercq, M.P., Laurent, G., Brasseur, R. (1990) Conformational and biochemical analysis of the interactions phospholipids-aminoglycosides antibiotics in relation with their toxicity dans *Molecular description of biological membrane components by computer-aided conformational analysis*, vol. II, R. Brasseur ed., Boca Raton, Fla, CRC Press, p 63-93.

Van Rooijen, N. (1992) Macrophages as accessory cells in the in vivo humoral response : from processing of particulate antigen to regulation by suppression. *Semin. Immunol.*, **4**, 237-45.

Van Rooijen, N., Van Nieuwmegen, R. (1980) Liposomes in immunology: multilamellar phosphatidylcholine liposomes as a simple, biodegradable and harmless adjuvant without any immunogenic activity of its own. *Immunol. Commun.*, **9**, 243-256.

Van Rooijen, N., Van Nieuwmegen, R. (1983) Use of liposomes as biodegradable and harmless adjuvants. *Meth. Enzym.*, **93**, 83-95.

Van Rooijen, N. (1993) Immunoadjuvant activities of liposomes : Two different macrophage mediated mechanisms. *Vaccine*, **11**, 1170-1993.

Voet, D., Voet, J. (1990) Lipids and membranes in *Biochemistry*, D. Voet and J. Voet eds., John Wiley & Sons, New York, p. 283.

Wassef, N. M. and Alving, C.R. (1987) Complement-dependent phagocytosis of liposomes by macrophages. *Methods Enzymol.* **149**, 124.

Webb, M.S., N.L. Boman, D.J. Wiseman, D. Saxon, K. Sutton, K.F. Wong, P. Logan, and M.J. Hope. (1998) Antimicrobial efficacy against an In vivo *Salmonella typhimurium* infection model and pharmacokinetics of a liposomal ciprofloxacin formulation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 45-52.

Wehrli, W. (1983). Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Rev Infect Dis.*, **5** Suppl 3, S407-11.

Weiner, A., Chemistry and biology of immunotargeted liposomes dans targeted therapeutic systems. P. Tyle and B. Ram editeurs, New York : Marcel Dekker, Inc., pp 305-336, 1990

Weinstein, J., Leserman, L. (1984) Liposomes as drug carrier in cancer chemotherapy .*Pharmac. Ther.*, **24**, 207-233.

Wichert, B., Schreier, H., Derendorf, H. (1991) Sensitive liquid chromatography assay for the determination of amikacin in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9**, 251-254.

Woodle, M.C., Lasic, D.D. (1992) Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1113**, 171-199.

Wong, C.H., Hendrix, M., Priestley, E.S., Greenberg, W.A. (1998) Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A-site of the decoding region of ribosomal RNA. *Chem. Biol.*, **5**, 397-406.

- Yamano, Y., Nishikawa, T., Komatsu, Y. (1993) Cloning and nucleotide sequence of anaerobically induced porin protein E1 (OprE) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.*, **8**, 993-1004.
- Yonehama, H., Yamano, Y., Nakae, T. (1994) Role of porins in the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* : construction of mutants with deletion in the multiple porin genes. *Antimicrob. Agents Chemther.*, **38**, 1466-1469.
- Yoshida, H., Nakamura, M., Bokaki, M., Nakamura, S. (1990) Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 1273-1275.
- Yoshihara, E., Nakae, T. (1989) Identification of porin in the outer membrane of *P.aeruginosa* that form small diffusion pores. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6297-6301.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D., Puglisi, J.D. (1998) Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J.*, **17**, 6437-6448.

ANNEXE I- ARTICLE

In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against Gram-negative and Gram-positive bacteria

Christian Beaulac, Sébastien Sachetelli et Jacqueline Lagacé

Département de Microbiologie et Immunologie

Université de Montréal

Montréal, Canada

Journal of Antimicrobial Chemotherapy **41**, 35-41, 1998

In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against Gram-negative and Gram-positive bacteria

C. Beaulac, S. Sachetelli and J. Lagace*

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal,
Case postale 6128, succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

It has been shown previously that tobramycin encapsulated in fluid liposomes (composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG)) eradicated mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in an animal model of chronic pulmonary infection. Exponential cultures of *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were treated with (i) free tobramycin, (ii) sub-MIC tobramycin encapsulated in DPPC/DMPG liposomes, (iii) control liposomes without antibiotic or (iv) control liposomes combined with free tobramycin. Bacterial colonies were counted 0, 1, 3, 6 and 16 h after addition of antibiotic. After 3 h, the growth of *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* was reduced 129, 84 and 566 times respectively in cultures treated with encapsulated antibiotic compared with those treated with free antibiotic. Six hours and 16 h after treatment, the maximal reduction of growth between strains treated with liposome-encapsulated tobramycin and free tobramycin was 84, 129, 166, 10⁵ and 10⁴ times respectively for *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *E. coli*, *S. maltophilia* and *S. aureus*. The liposomes were stable at 4°C and at room temperature for the whole period studied. At 37°C, equivalent stability was observed for the first 16 h of the study. Administration of antibiotic encapsulated in DPPC/DMPG liposomes may thus greatly improve the management of resistant infections caused by a large range of microorganisms. The strong bactericidal activity of the encapsulated antibiotic at sub-MIC doses of the strains tested cannot be explained only as a result of prolonged residence time of liposome-encapsulated tobramycin and the resulting release of entrapped antibiotic at the bacterial site; rather, direct interaction of chemoliposomes and bacteria, probably by a fusion process, may explain the bactericidal effect of the sub-MIC antibiotic doses used.

Introduction

The emergence of antimicrobial resistance among microorganisms is a serious medical problem attributed in large part to the misuse and overuse of antimicrobials.¹ In the last 15 years, development and marketing of novel antimicrobial agents have become very expensive,² making it imperative that new approaches to the therapy of infectious diseases be tried. Development of potentiators of known antimicrobials would be an appealing approach if it allowed increased efficacy of antibiotics and a reduction in doses, thus also reducing the likelihood of resistance development and reducing toxicity problems.

Liposomes, the most studied colloidal drug delivery systems, could be one way of improving the effectiveness of antibiotics. The best known advantages of liposomes are altered pharmacokinetics and biodistribution of the encapsulated drug molecules, giving rise to improved efficacy and/or reduced toxicity of chemotherapy.^{3–5} Liposome-encapsulated antimicrobial agents have been successfully used in humans and/or in animal models against protozoal,^{6,7} fungal^{8–10} and bacterial^{11–13} infections. Such experimental studies have been performed with 'rigid' liposomes, composed primarily of natural phospholipids and cholesterol, which can be polymer-coated. Liposomal formulations that include cholesterol neces-

*Corresponding author. Tel: +1-514-3432180; Fax: +1-514-343-5701; E-mail: Lagacej@ere.umontreal.ca

sarily have a high phase transition temperature (T_C), which makes the liposomes rigid and strong. Drugs entrapped in rigid liposomes may be more effective than free drugs *in vivo*, but they have generally low bactericidal activity against extracellular bacteria *in vitro*.^{12,13} The superior therapeutic effect of liposome-encapsulated drugs may result from the liposomes being delivered to the infection site and then degraded, releasing the entrapped antibiotic. Experimental models of infections in which antimicrobial agents encapsulated in rigid liposomes have been successful in both in-vivo and in-vitro studies all involved infections of cells of the mononuclear phagocyte system (MPS) by facultative or obligate intracellular pathogens.^{14,15} In these studies, uptake of rigid liposomes by phagocytes was essential to obtain a superior therapeutic effect.

Recently, the potential to deliver antibiotic to extracellular infections using rigid and fluid liposomal formulations was investigated in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* chronic pulmonary infection in rats.^{16,17} Eradication of the infection was observed with antibiotic encapsulated in a fluid liposomal preparation, while antibiotic encapsulated in rigid liposomal preparations, and free antibiotic and controls, were not bactericidal.¹⁷ The aim of the present study was to test the bactericidal efficacy of the fluid liposomal preparation: (i) against other bacteria that are particularly difficult to treat and related to *P. aeruginosa*, in this instance *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* and (ii) against other unrelated but common causes of infection, notably *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and to evaluate the long-term stability of liposome-associated antibiotic at 4°C, room temperature and 37°C.

Materials and methods

Bacterial strains

Clinical isolates of *P. aeruginosa* (PA 429), *S. maltophilia* (C6R9) *B. cepacia* (PD-428) and *E. coli* (EC HB 101 NM 88) were isolated from the sputum of patients with cystic fibrosis (Sainte-Justine Hospital, Montréal, Québec, Canada). *S. aureus* (LSPQ 2499) a clinically derived strain, was a generous gift from the Laboratoire de Santé Publique du Québec. Bacteria were stored at -70°C in Brain Heart Infusion broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 20% glycerol.

Antibiotics and susceptibility testing

Tobramycin was obtained from Eli Lilly (Toronto, Ontario, Canada). All bacterial strains were tested for antibiotic susceptibility by an agar dilution method and a broth dilution method according to the protocols of the National Committee for Clinical Laboratory Standards.^{18,19} The MIC was defined as the lowest concentration of tobra-

mycin at which there was no visible growth of test bacteria. All MICs were confirmed by Etest (AB Biodisk, Unipath, Nepean, Canada).

Liposomes

Liposomes were prepared by a dehydration-rehydration vesicle method as previously described.¹⁷ The liposome preparation consisted of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) (Avanti Polar Lipids, Inc., Birmingham, AL, USA) in a molar ratio of 15:1, which corresponds to a global T_C of 29°C.²⁰ Tobramycin in liposomal preparations was quantified by HPLC as previously described.¹⁷

Long-term release studies

Antibiotic release over a period of 28 days was studied to measure the stability of the fluid liposomal preparation, i.e. the relative quantity of the drug found in liposomes as a function of time and temperature. DPPC/DMPG liposome-encapsulated tobramycin (888 µg) and an equivalent quantity of free tobramycin, used as a control, were suspended in tubes containing 12 mL of sterile PBS and shaken slowly (100 rpm) at 4°C, room temperature or 37°C for 28 days. The study was done in triplicate. Samples of 500 mL were collected at 16 h and on days 1, 2, 14, 21 and 28 and centrifuged at 5000g for 20 min in an Eppendorf centrifuge (Fisher, Montréal, Canada). After supernatant collection, the pellet was resuspended in 500 mL of PBS. Afterwards, 100 mL samples of supernatants and resuspended pellets were subjected to HPLC analysis for tobramycin determination as previously described.¹⁷

Experimental design

In-vitro killing curves were performed in the presence of sub-MIC concentrations of free or encapsulated tobramycin and controls consisting of free antibiotic combined with empty liposomes, liposomes containing PBS or PBS alone. Volumes of 250 mL of Proteose Peptone Broth no. 2 (Difco) were inoculated with a 17 h pre-culture of each bacterium to give a stock preparation containing a log-phase cell density of approximately 10⁷ cfu/mL as evaluated initially by optical density at 660 nm. For more precise evaluation of the number of bacteria, culture dilutions were plated in triplicate and the number of cfu was counted for final evaluation of the results.

All the killing tests were performed in triplicate as follows: to 29 mL of the cultures described above was added 1 mL of either free antibiotic, liposome-encapsulated tobramycin, or controls. Quantities of tobramycin contained in liposomes were first determined by HPLC analysis after methanol extraction.¹⁷ A second HPLC analysis was performed after the final dilutions to compare free and encapsulated antibiotic preparations. *P. aeru-*

ginosa, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* cultures received respectively 30, 1, 3, 0.75 and 1.55 mg/L of free tobramycin and 29.4, 1, 2.95, 0.75 and 1.57 mg/L of encapsulated tobramycin as determined by HPLC analysis. These values were lower than the MICs for each bacterial strain. The cultures were then incubated on a shaker at 37°C for 16 h. Samples of 1.5 mL were collected after 0, 1, 3, 6 and 16 h of incubation. One millilitre was read at 660 nm and 0.5 mL was used immediately for serial dilutions in cold sterile PBS. Appropriate dilutions were plated and cultured in triplicate on Proteose Peptone no. 2 agar (Difco). After overnight incubation at 37°C in 5% CO₂, the number of cfu was determined.

Data analysis

All the data were analysed using Excel (Microsoft Corporation), and the results were expressed as mean values \pm S.E.M.

Results

Stability of antibiotic-containing liposomes

The long-term release study showed that, in spite of their relative fluidity, the liposomes retained >66% of the encapsulated drug until day 28 at 4°C and room temperature (Figure 1). About 16% of the antibiotic was found in the supernatant from the first sample collection and reached a steady state of about 21% for the whole study. The mean loss of antibiotic was approximately one-

third of the initial encapsulated drug which comprised the released antibiotic detected in the supernatant and a loss of about 12% due to handling. Though the results obtained at 4°C and at room temperature were statistically comparable, larger fluctuations were observed with liposome-encapsulated tobramycin maintained at room temperature (Figure 1). Analysis of the samples collected at 16 h from liposome preparations maintained at 37°C showed that the amount of antibiotic released during this time was comparable to that observed in the same time at 4°C and room temperature. After 16 h, though, liposomes maintained at 37°C showed sustained significant release of tobramycin, so that by the end of the study, only 8% of the drug was still encapsulated in the liposomes incubated at 37°C (Figure 1). Free tobramycin used as a reference showed that the measure of tobramycin by HPLC was not significantly influenced by temperature variations over the whole test period (data not shown).

In-vitro bactericidal efficacy of liposome-encapsulated versus free tobramycin

The MICs of tobramycin for *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* were 60, 2, 5, 1.5 and 2 mg/L respectively. As indicated in Materials and methods, the doses of encapsulated tobramycin were equivalent to or lower than the doses of free tobramycin and lower than the MIC for the five bacterial strains tested. Killing curves of bacteria were evaluated by counting cfu on agar plates (Figure 2a–e). Controls

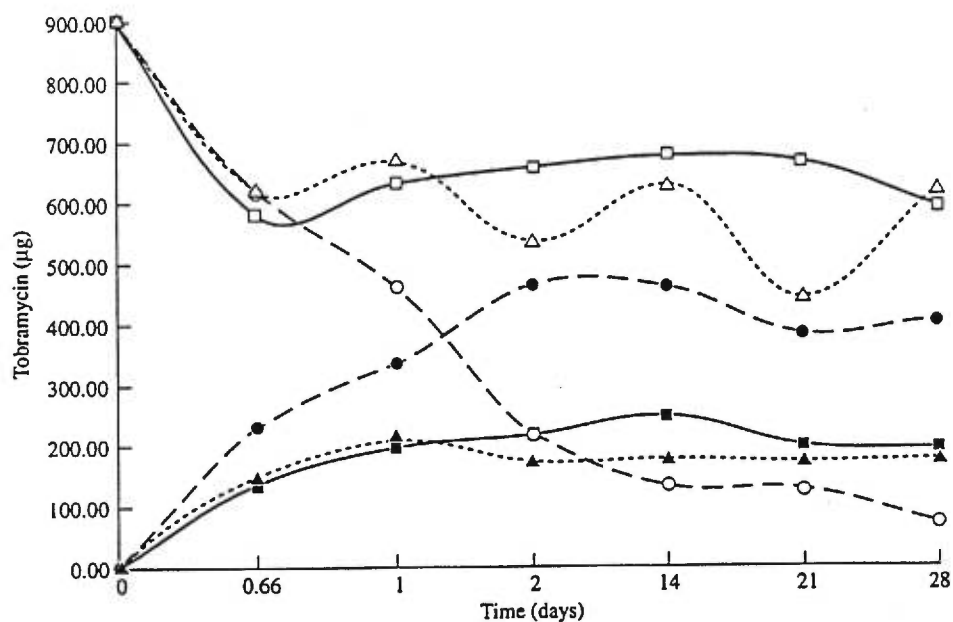


Figure 1. Investigation of the stability of fluid liposomes containing antibiotic (888 µg) still encapsulated after incubation at 4°C (□), room temperature (△) or 37°C (○). Antibiotic discharge from liposomes at 4°C (■), room temperature (▲) or 37°C (●). The results are expressed as the arithmetic mean of three samples \pm S.E.M.

consisting of liposomes without antibiotic and liposomes combined with free antibiotic are not included in the figures because of the superimposition of these results with PBS controls and free tobramycin.

Three hours after treatment of *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* cultures with liposome-encapsulated antibiotic, the reduction in growth was respectively of 129, 84 and 566 times greater than that in cultures treated with free antibiotic (Figure 2c, d and e). At 6 h and/or 16 h after treatment, a decrease in cfu/mL was observed for all the strains treated with liposome-encapsulated tobramycin (Figure 2a–e) while bacterial growth reached approximately 10^8 – 10^9 cfu/mL in PBS control cultures. Following the addition of free antibiotic, the growth of the *P. aeruginosa* group was minimally affected whereas a considerable decrease in growth was observed between 1 h and 6 h for *E. coli* and *S. aureus* (Figure 2d and e). However, the same quantity of encapsulated antibiotic showed cfu decreases of *S. aureus* and *E. coli* of more than 10^4 times and 166 times respectively compared with free antibiotic (Figure 2e).

Sixteen hours after treatment, a significant increase in growth of *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* cultures was noted for those cultures treated with encapsulated antibiotic were noted, but the cfu counts were still 35, 166 and 163 times lower respectively than the cfu counts in cultures treated with free antibiotic (Figure 2c, d and e).

Discussion

In previous studies, in-vitro drug release kinetics and pulmonary retention of encapsulated antibiotic in liposomes and the effect of their lipid composition in terms of bilayer fluidity and charge were investigated.²⁰ Fluid liposomes composed of DPPC and DMPG showed modulated release of antibiotic *in vitro* while maintaining good pulmonary persistence of the drug. Later, tobramycin encapsulated in liposomes with a T_C of 29°C or 32°C, as opposed to more rigid liposomes, was shown to eradicate mucoid *P. aeruginosa* in an animal model of chronic pulmonary infection.¹⁷ The present in-vitro study showed that liposomes with this formulation ($T_C = 29^\circ\text{C}$) and containing a sub-MIC tobramycin concentration, were markedly bactericidal, not only against *P. aeruginosa* but also against all other strains tested. Broad antibacterial activity of liposomes was demonstrated by the efficacy of the encapsulated antibiotic against *E. coli* and *S. aureus*, whose cell walls are structurally very different from those of *Pseudomonas* spp.

To ensure that the doses of tobramycin administered in this study were accurate and reliable, two independent HPLC analyses were performed on free and encapsulated tobramycin before and after final dilutions. The results obtained following the use of sub-MIC quantities of encapsulated tobramycin against three related strains of

the *Pseudomonas* group are striking since this group is recognized for its very low nonspecific permeability and/or the presence of an efflux pump in its external membrane.^{21–23} The maximal bactericidal activity of the encapsulated antibiotic was observed at 6–16 h for *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* (Figure 2a and b). The bactericidal effect occurred more quickly (between 1 and 3 h) in *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* (Figure 2c, d and e). This may be explained at least in part by the remarkable impermeability of the *Pseudomonas* outer membrane, which is a major obstacle to antibiotic penetration.²³ The lipopolysaccharide side chains of Enterobacteriaceae such as *E. coli* are crosslinked, conferring an intermediate degree of impermeability to their outer membrane,²⁴ while the peptidoglycan layer of Gram-positive bacteria generally is not a significant barrier to antibiotic entry.²³ This, together with shorter generation times,²⁵ can also explain why these differences are seen.

The fact that sub-MIC concentrations of encapsulated antibiotic reduced the growth of bacteria by 35– 10^5 times in comparison with cultures treated with the same quantity of free antibiotic suggests a direct interaction of liposomes with bacteria. It is possible that, due to the fluidity or plasticity of the DPPC/DMPG liposomal formulation, the liposomes could fuse with the bacterial cells. Such a fusion process would increase the amount of antibiotic that penetrated bacterial cell walls. Preliminary findings from studies under way in our laboratory seem to support this hypothesis (data not shown).

The results of the long-term release study indicate that antibiotic-containing liposomes are relatively stable at 4°C and room temperature. Indeed, more than 66% of the antibiotic was recovered from the liposomes at the end of the 28 day period (Figure 1). However, at room temperature, some instability seemed to occur (Figure 1), perhaps because this temperature is close to the T_C of the liposomes (29°C), so fluctuation in room temperature might have caused transitions between the solid and liquid-crystalline phases. Consequently, at room temperature the phospholipids seemed to be shifting continuously between the two states (Figure 1). The study performed at 37°C, 8° above the T_C of the liposomes, showed that until 16 h, liposomes still retained the same quantity of the drug as noted for liposomes maintained at 4°C and room temperature (Figure 1). Thus, despite being highly labile, liposomes can retain the drug for a sufficient period of time to allow effective interactions. As noted above, this liposomal plasticity could promote fusion with bacterial cell walls. The plausibility of such a process is in accordance with the fact that the liposomes, even if they contained sub-MIC concentrations of tobramycin, showed significant bactericidal activity at 37°C against a broad range of bacteria.

The major mechanisms conferring antibiotic resistance are: preventing the drug from entering the cell, rapid extrusion of the drug, or enzymatic inactivation of the

Bactericidal liposome with sub-MIC antibiotic

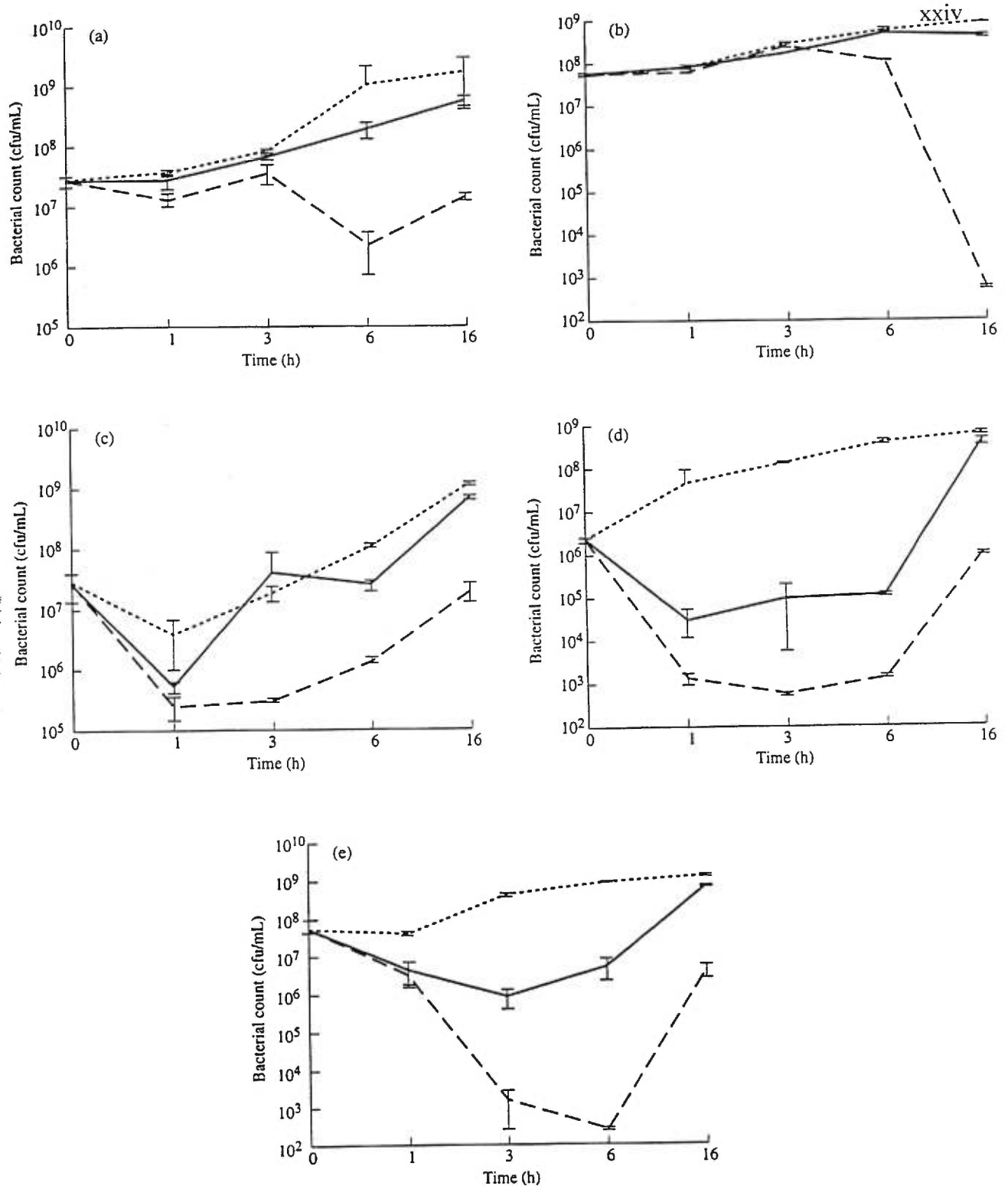


Figure 2. Killing curves of bacteria exposed to sub-MIC of free and encapsulated tobramycin respectively for (a) *P. aeruginosa*, 30 and 29.4 mg/L, (b) *S. maltophilia*, 1.00 and 1.00 mg/L, (c) *B. cepacia*, 3.00 and 2.95 mg/L, (d) *E. coli*, 0.75 and 0.75 mg/L and (e) *S. aureus*, 1.57 and 1.55 mg/L. The growth of bacteria was evaluated by counting cfu at 0, 1, 3, 6 and 16 h. —, bacteria exposed to free tobramycin; ---, bacteria exposed to PBS (controls); - - - -, bacteria exposed to liposome-entrapped tobramycin. MICs of tobramycin for *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *E. coli* and *S. aureus* were found to be 60, 2, 5, 1.5 and 2 mg/L respectively. Results are expressed as the arithmetic mean of the three samples \pm S.E.M.

drug or alteration of its molecular target.²³ Recent studies suggest that mechanisms of resistance work synergistically, with decreased permeability and/or the presence of membrane-associated energy driven efflux systems playing an important role in the phenomenon.^{23,26,27} For example, it is well known that in Gram-negative bacteria, both enzymatic modification of the drug and impermeability of the outer membrane contribute to resistance.^{24,28} Low affinity for the molecular target of the drug or accelerated penetration of the drug reduce the capacity of enzymes to protect the bacteria.²⁴ If we consider the importance of the penetration barrier in antibiotic resistance in bacteria, the data obtained with the DPPC/DMPG liposomal formulation suggest that the liposome-encapsulated antibiotic described could not only increase the efficacy of antibiotic treatments with non-resistant strains but could also contribute to overcoming bacterial resistance. Work is in progress to measure the efficacy of this liposomal formulation against multidrug-resistant mutants.

Acknowledgement

This study was supported by a grant from the Canadian Cystic Fibrosis Foundation.

References

1. Levy, S. B. (1992). *The Antibiotic Paradox: how Miracle Drugs are Destroying the Miracle*. Plenum Press, New York.
2. Billstein, S. A. (1994). How the pharmaceutical industry brings an antibiotic drug to market in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 2679–82.
3. Fountain, M. W., Weiss, S. J., Fountain, A. G., Shen, A. & Lenk, R. P. (1985). Treatment of *Brucella canis* and *Brucella abortus* *in vitro* and *in vivo* by stable plurilamellar vesicle-encapsulated aminoglycosides. *Journal of Infectious Diseases* **152**, 529–36.
4. Price, C. L., Horton, J. W. & Baxter, C. R. (1992). Liposome delivery of aminoglycosides in burn wounds. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* **174**, 414–8.
5. Price, C. L., Horton, J. W. & Baxter, C. R. (1994). Liposome encapsulation: a method for enhancing the effectiveness of local antibiotics. *Surgery* **115**, 480–7.
6. Alving, C. R., Steck, E. A., Chapman, W. L., Waits, V. B., Hendricks, L. D., Swartz, G. M. *et al.* (1978). Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **75**, 2959–63.
7. Berman, J. D., Ksionski, G., Chapman, W. L., Waits, V. B. & Hanson, W. L. (1992). Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphocil) in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 1978–80.
8. Lopez-Berestein, G., Hopfer, R. L., Mehta, R., Mehta, K., Hersh, E. M. & Juliano, R. L. (1984). Liposome-encapsulated amphotericin B for treatment of disseminated candidiasis in neutropenic mice. *Journal of Infectious Diseases* **150**, 278–83.
9. Van Etten, E. W. M., van den Heuvel-de Groot, C. & Bakker-Woudenberg, I. A. J. M. (1993). Efficacies of amphotericin B-desoxycholate (Fungizone), liposomal amphotericin B (AmBisome), and fluconazole in the treatment of systemic candidosis in immunocompetent and leucopenic mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **32**, 723–39.
10. Ng, T. T. & Denning, D. W. (1995). Liposomal amphotericin B (AmBiosome) therapy in invasive fungal infections. Evaluation of United Kingdom compassionate use data. *Archives of Internal Medicine* **155**, 1093–8.
11. Klemens, S. P., Cynamon, M. H., Swenson, C. E. & Ginsberg, R. S. (1990). Liposome-encapsulated-gentamicin therapy of *Mycobacterium avium* complex infection in beige mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**, 967–70.
12. Bakker-Woudenberg, I. A. J. M., ten Kate, M. T., Stearne-Cullen, L. E. T. & Woodle, M. C. (1995). Efficacy of gentamicin or ceftazidime entrapped in liposomes with prolonged blood circulation and enhanced localization in *Klebsiella pneumoniae*-infected lung tissue. *Journal of Infectious Diseases* **171**, 938–47.
13. Grayson, L. S., Hansbrough, J. F., Zapata-Sirvent, R., Roehrborn, A. J., Kim, T. & Kim, S. (1995). Soft tissue infection prophylaxis with gentamicin encapsulated in multivesicular liposomes: results from a prospective, randomized trial. *Critical Care Medicine* **23**, 84–91.
14. Mehta, R. T., Keyhani, A., McQueen, T. J., Rosebaum, B., Rolston, K. V. & Tarrand, J. J. (1993). *In-vitro* activities of free and liposomal drugs against *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex and *M. tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 2584–7.
15. Oneyeji, C. O., Nightingale, C. H., Tessier, P. R., Nicolau, D. P. & Bow, L. M. (1995). Activities of clarithromycin, azithromycin, and ofloxacin in combination with liposomal or unencapsulated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against intramacrophage *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*. *Journal of Infectious Diseases* **172**, 810–6.
16. Omri, A., Beaulac, C., Bouhajib, M., Montplaisir, S., Sharkawi, M. & Lagacé, J. (1994). Pulmonary retention of free and liposome-encapsulated tobramycin after intratracheal administration in uninfected rats and infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 1090–5.
17. Beaulac, C., Clément-Major, S., Hawari, J. & Lagacé, J. (1996). Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 665–9.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1990). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Testing for Bacteria that Grow Aerobically—2nd edition: Approved Standard M2-A4*. NCCLS, Villanova, PA.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1992). *Development of In-vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters—2nd edition: Tentative Guideline M23-T2*. NCCLS, Villanova, PA.
20. Beaulac, C., Clément-Major, S., Hawari, J. & Lagacé, J. (1997). *In-vitro* kinetic of drug release and pulmonary retention of encapsulated antibiotic in liposomal formulations in relation to the lipid composition of liposomes. *Journal of Microencapsulation* **14**, 335–48.
21. Angus, B. L. & Hancock, R. E. (1983). Outer membrane porin proteins F, P, and D1 of *Pseudomonas aeruginosa* and *PhoE* of

Bactericidal liposome with sub-MIC antibiotic

xxvi

Escherichia coli: chemical cross-linking to reveal native oligomers. *Journal of Bacteriology* **155**, 1042–51.

22. Nikaido, H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**, 1831–6.

23. Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382–8.

24. Nikaido, H. & Normark, S. (1987). Sensitivity of *Escherichia coli* to various beta-lactams is determined by the interplay of outer membrane permeability and degradation by periplasmic beta-lactamases: a quantitative predictive treatment. *Molecular Microbiology* **1**, 29–36.

25. Regnault, J. P. (1990). Développement microbien. In *Microbiologie Générale* (Regnault, J. P.), pp. 351–95. Décarie, Montréal.

26. Chen, H. Y., Yuan, M. & Livermore, D. M. (1995). Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *Journal of Medical Microbiology* **43**, 300–9.

27. Fontana, R., Altamura, M., Arcamone, F., Cornaglia, G., Morandotti, G., Sperring, R. *et al.* (1995). Structure–activity relationship of new 2-substituted penem antibiotics. *Journal of Antibiotics* **48**, 1488–93.

28. Vu, H. & Nikaido, H. (1985). Role of β -lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of a β -lactamase-constitutive *Enterobacter cloacae* strain to expanded-spectrum β -lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**, 393–8.

Received 22 April 1996; returned 27 June 1996; revised 6 April 1997; accepted 28 August 1997

ANNEXE II- L'interaction de la tobramycine avec les phospholipides des FluidosomesTM

2.1 Méthodologie et Résultats

2.1.1 Expériences d'affinité

La liaison de la tobramycine avec les phospholipides constitutifs des FluidosomesTM a été étudiée à l'aide d'une expérience d'affinité. Brièvement, une dispersion multilamellaire de DPPC, DMPG ou de FluidosomesTM a été préparée dans du PBS pour obtenir une solution de 130 μ mole/ml. Une concentration croissante de lipide a ensuite été incubée avec une concentration fixe de tobramycine, soit 2.14 μ mole. Trois cycles de gel-dégel ont ensuite été effectués pour permettre aux lipides et à la tobramycine d'être mélangés de façon à avoir une interaction optimale. Suite à cette incubation, les échantillons ont été centrifugés (14 000 RMP, 30 min, 4°C) pour recueillir les lipides. La concentration résiduelle de tobramycine libre et de lipides dans le surnageant a ensuite été déterminée par HPLC (Beaulac *et al.*, 1996) et par colorimétrie (Stewart, 1980) respectivement. La figure 1 montre l'interaction de la tobramycine avec le DPPC, les FluidosomesTM (recette 10-1 et 18-1) et le DMPG à un ratio molaire de 300 molécules de lipides par molécule de tobramycine. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen d'antibiotique lié +/- la déviation standard.

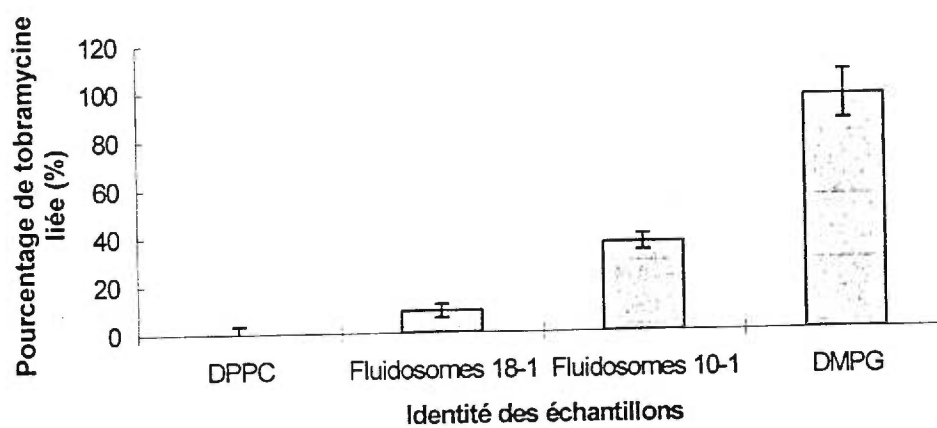


Figure 1. Interaction de la tobramycine avec le DPPC, FluidosomesTM recettes 18-1 et 10-1 et le DMPG à un ratio molaire de 300 molécules de lipides par molécule de tobramycine.

2.1.2 Études de spectrométrie infrarouge

L'effet de la tobramycine sur l'organisation des différentes bicouches lipidiques des FluidosomesTM a été caractérisé de façon plus approfondie par spectrométrie infrarouge à transformation de Fourier. Brièvement, ces études consistaient à hydrater soit du DPPC ou DMPG avec de la tobramycine à 20% (p/v) dans du PBS. Les solutions étaient ensuite chauffées au dessus de leurs T_C respectifs (46°C pour le DPPC et 35 °C pour le DMPG) pour obtenir un mélange homogène et par la suite analysées en les plaçant entre deux plaques de fluorure de calcium séparées par un espaceur en téflon de 5 μm . Cent balayages par spectre ont été récoltés. La figure 2 montre le spectre infrarouge de l'élongation dans la région carbonyle du DMPG en phase gel (20 °C) et en phase fluide (50°C) pour le DMPG seul (traits pointillés) et le DMPG incubé avec de la tobramycine (traits solides). La figure 3 montre le spectre infrarouge de l'élongation dans la région carbonyle du DPPC en phase gel (20°C) et en phase fluide (50°C) pour le DPC seul (traits pointillés) et le DPPC incubé avec de la tobramycine (traits solides).

Pour vérifier si l'interaction de la tobramycine avec les lipides affecte plus profondément les lipides, les chaînes acyles des phospholipides ont été étudiées. La figure 4 représente une courbe de transition de phase pour le DMPG seul et le DMPG incubé avec de la tobramycine. Comme indicateur d'interaction, nous avons utilisé la vibration symétrique des liaisons C-H associés au niveau des chaînes acyles du lipide. La figure 5 représente une courbe de transition de phase pour le DPPC seul et le DPPC incubé avec de la tobramycine. Encore une fois comme indicateur d'interaction, nous avons utilisé la vibration symétrique des liaisons C-H associés au niveau des chaînes acyles du lipide.

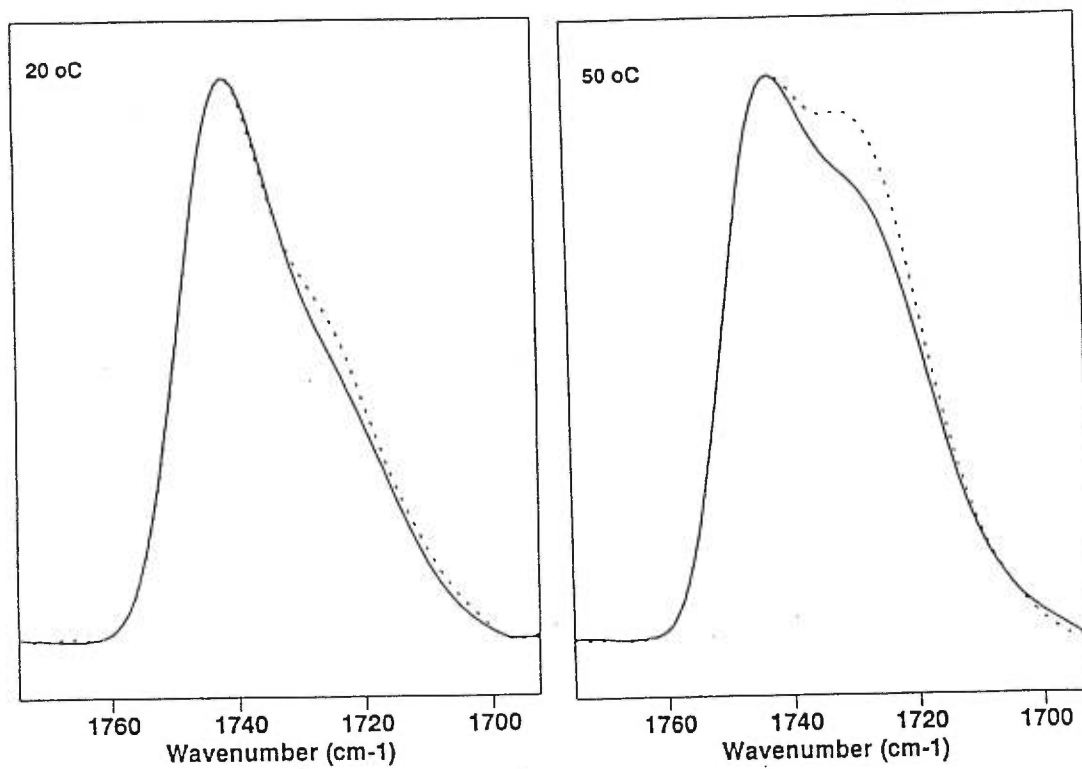


Figure 2. Spectres infrarouge de la région carbonyle du DMPG en phase gel (20 °C) et en phase fluide (50 °C) pour le lipide seul (traits pointillés) et le lipide incubé avec de la tobramycine (traits pleins). L'absorbance est exprimée en unités arbitraires.

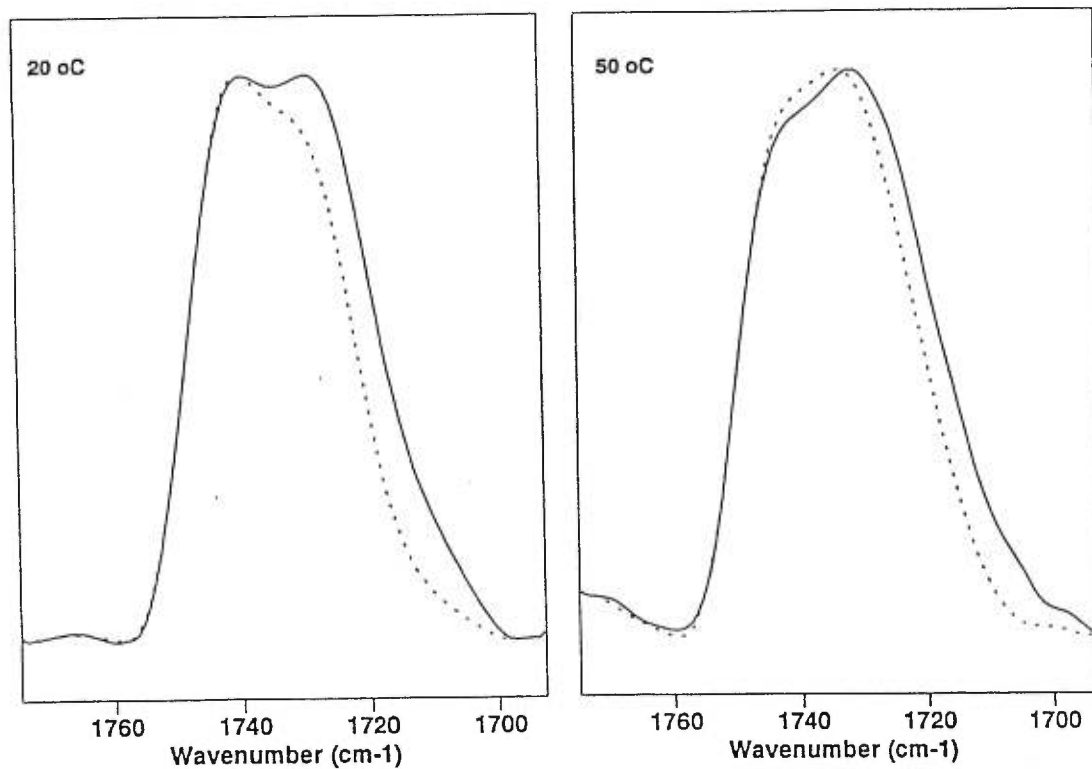


Figure 3. Spectres infrarouge de la région carbonyle du DPPC en phase gel (20 °C) et en phase fluide (50 °C) pour le lipide seul (traits pointillés) et le lipide incubé avec de la tobramycine (traits pleins). L'absorbance est exprimée en unités arbitraires.

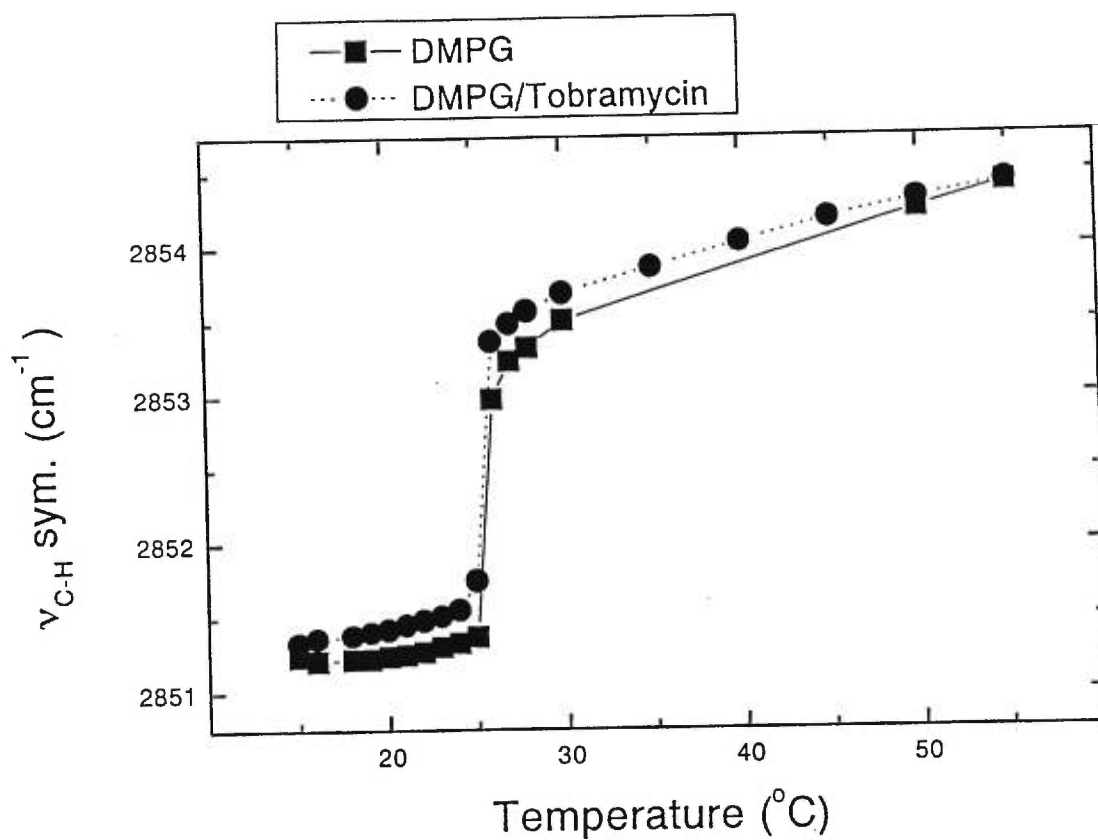


Figure 4. Courbes de transition de phase du DMPG (carrés noirs) et du DMPG incubé avec de la tobramycine (cercles noirs). L'élongation symétrique des liens C-H des chaînes acyles des phospholipides a été choisie comme indicateur de l'effet de la tobramycine. Les courbes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

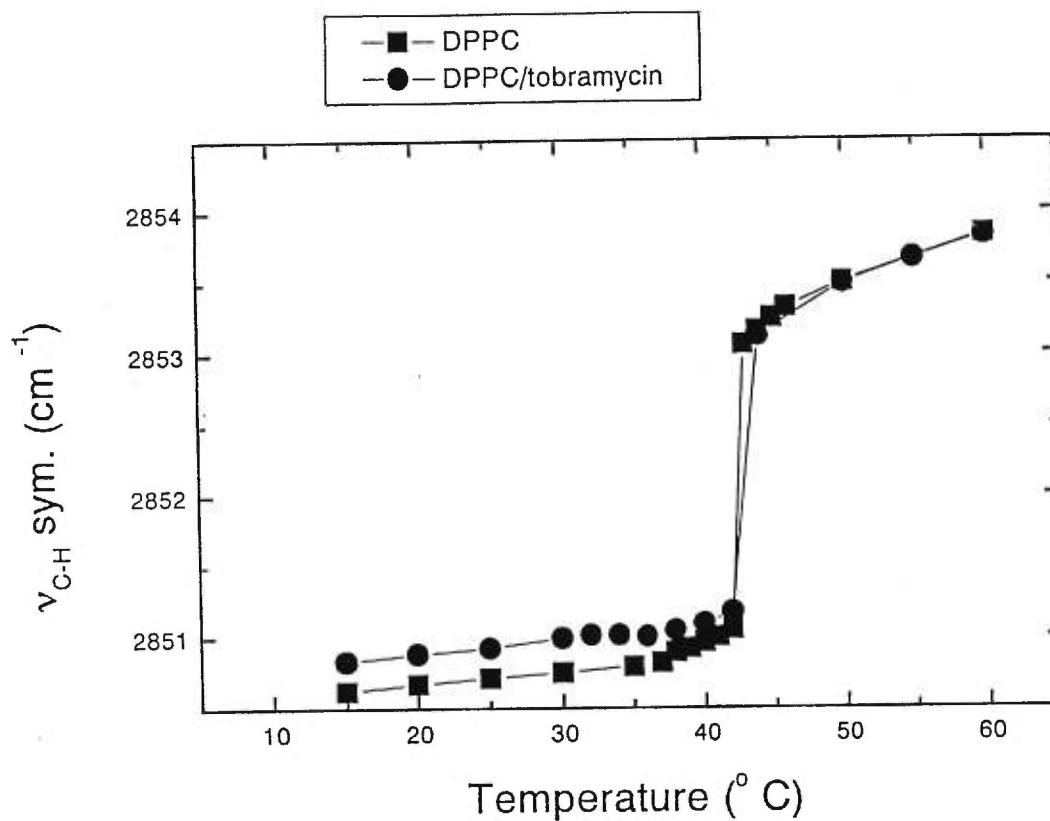


Figure 5. Courbes de transition de phase du DPPC (carrés noirs) et du DPPC incubé avec de la tobramycine (cercles noirs). L'élongation symétrique des liens C-H des chaînes acyles des phospholipides a été choisie comme indicateur de l'effet de la tobramycine. Les courbes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.