

Université de Montréal

Démonstration de l'absence d'interaction des Fluidosomes™
avec les cellules épithéliales de mammifère
et étude comparative avec les bactéries

par

Annie Desjardins
Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Août, 2001

© Annie Desjardins, 2001

W

4

U58

2002

v.003

Identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Démonstration de l'absence d'interaction des Fluidosomes™
avec les cellules épithéliales de mammifère
et étude comparative avec les bactéries

présenté par:

Annie Desjardins

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury:

Dr. Marc Drolet

Directrice et membre du jury:

Dre. Lagacé

Membre du jury:

Dr. Michel Lafleur



Sommaire

Les liposomes sont des structures lipidiques utilisées comme véhicules pour le transport d'agents bioactifs. Ils peuvent augmenter l'index thérapeutique des substances encapsulées et en diminuer la toxicité; ils ont aussi la capacité d'accroître l'action du médicament en ciblant le site désiré tout en le protégeant de l'environnement. Le potentiel thérapeutique des liposomes a été démontré par le traitement expérimental de nombreux types d'infections telles que les infections fongiques, parasitaires, virales et bactériennes.

En raison de leur capacité d'augmenter l'index thérapeutique des médicaments, différentes formulations liposomales ont été développées dans notre laboratoire afin d'améliorer le traitement des infections pulmonaires chroniques causées par *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de fibroses kystiques. Une formulation de liposomes fluides contenant de la tobramycine, appelée Fluidosomes™, a permis d'augmenter de façon substantielle, lors d'expériences *in vitro* et *in vivo*, l'activité bactéricide de l'antibiotique. À l'aide d'études effectuées par cytométrie en flux, microscopie électronique et association lipidique (*lipid mixing assay*), il a été démontré que l'amplification de l'effet bactéricide des Fluidosomes™ était due à un phénomène de fusion des liposomes avec la membrane bactérienne. Ceci augmentait la pénétration de la substance bioactive dans la cellule bactérienne. Une première étude effectuée pour évaluer la toxicité potentielle des Fluidosomes™ a permis de démontrer que leur administration intratrachéale et intrapéritonéale répétée chez la souris BALB/c n'induisait pas la production d'anticorps muqueux et sériques contre les liposomes et l'antibiotique (Sachetelli *et al.*, 1999).

Étant donné que les Fluidosomes™ ont été développés pour être administrés par aérosols chez les patients atteints de fibrose kystique, le but premier de ce travail était de vérifier la toxicité potentielle des Fluidosomes™ vis-à-vis les cellules épithéliales pulmonaires humaines. Le paramètre mesuré dans cette étude était la capacité de fusion des Fluidosomes™ avec des cellules épithéliales pulmonaires comparativement à celle observée avec les cellules bactériennes. Afin de réaliser cette étude, des tests d'association lipidique basés sur la transmission d'énergie de fluorescence par résonance entre un donneur, le 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-PE) et un accepteur le 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl) (Rh-PE) ont été effectués. En pratique, des liposomes dont la membrane contient ces deux marqueurs fluorescents sont mis en contact avec des liposomes ou des cellules non marqués. Lorsque les liposomes marqués fusionnent avec la membrane des cellules non marquées, il se produit une dilution de la concentration totale des deux marqueurs fluorescents dans la membrane fusionnée, ce qui résulte dans une diminution de l'absorption de fluorescence (*quenching*), donc en une augmentation de la fluorescence d'un marqueur au détriment du second. Ces tests, contrairement à ceux effectués en cytométrie, permettent de différencier de façon sûre entre un phénomène d'agglutination et un phénomène de fusion.

Comme les Fluidosomes™ sont administrés directement dans les voies respiratoires, l'étude a été réalisée sur une lignée de cellules épithéliales de poumons d'un embryon humain, celles-ci transformées par le virus SV-40. Les bactéries *P. aeruginosa* et *E. coli* ont été utilisées à titre de contrôles positifs. Les études d'association lipidique ont démontré : 1) qu'il n'y a pas de transfert d'énergie de fluorescence par résonance entre les Fluidosomes™ et les cellules épithéliales contrairement à ce qui est observé à 37°C entre les

Fluidosomes™ et les bactéries *P. aeruginosa* et *E. coli*; le pourcentage de fusion après 120 minutes de contact à 37°C atteint 71% avec *E. coli* et 33% avec *P. aeruginosa* alors que l'on n'observe pas de fusion à 4°C avec ces mêmes cellules; 2) une seule valeur de fusion d'environ 9% a été observée avec les cellules épithéliales durant toute la durée de l'expérience et cela aussi bien à 4°C qu'à 37°C, indiquant que le pourcentage de fusion obtenu correspondait au bruit de fond; 3) une étude cinétique basée sur l'élévation continue de la température entre 4 et 37°C montre que la baisse d'émission de rhodamine, qui correspond au début du phénomène de fusion, est initiée entre 28 et 31°C.

En conclusion, nos résultats suggèrent que les cellules épithéliales humaines ne possèdent pas les caractéristiques qui permettent aux cellules bactériennes de fusionner avec les Fluidosomes™. Conséquemment, les agents bioactifs encapsulés dans les Fluidosomes™ ne présentent pas un potentiel toxique amplifié, car les liposomes ne favorisent pas leur pénétration dans les cellules environnantes, en l'occurrence les cellules épithéliales du système respiratoire. De plus, en raison de leur encapsulation, le potentiel toxique des agents bioactifs se trouve à être diminué de façon substantielle. Finalement, ces résultats suggèrent que les substances bioactives encapsulées dans les Fluidosomes™ sont par le fait même ciblées en direction des cellules bactériennes. Les résultats présentés dans l'article en annexe sur l'encapsulation d'ADN ont permis de démontrer qu'il était possible d'encapsuler entre 30 et 45% (dépendant du type d'ADN) de la quantité initiale d'ADN dans les Fluidosomes™, et ce sans que l'ADN ait dû subir des modifications ou qu'un tampon autre que celui utilisé normalement soit nécessaire.

Table des matières

<i>Sommaire</i>	<i>i</i>
<i>Table des matières</i>	<i>iv</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>vi</i>
<i>Liste des sigles et abréviations</i>	<i>vii</i>
<i>Remerciements</i>	<i>viii</i>
CHAPITRE 1 – Revue de la littérature	1
1.1 Fibrose Kystique	1
1.1.1 La maladie	1
1.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.1.3 Traitement	2
1.2 Résistance aux antibiotiques	3
1.2.1 Historique	3
1.2.2 Mécanismes de résistance et solutions possibles	4
1.3 Les liposomes	5
1.3.1 Historique	5
1.3.2 Types de liposomes	6
1.3.3 Composition	7
1.3.4 Utilisation comme véhicule pour les médicaments	9
1.3.5 Ciblage	10
1.3.5.1 Ciblage par compartimentation	11
1.3.5.2 Ciblage naturel	11
1.3.5.3 Ciblage par association d'un ligand	12
1.3.5.4 Ciblage physique	13
1.3.6 Interaction des liposomes avec les cellules	13
1.3.7 Applications	15
1.3.7.1 Infections virales	15
1.3.7.2 Infections fongiques	16
1.3.7.3 Infections causées par des protozoaires	17
1.3.7.4 Infections bactériennes	18
1.3.7.5 Autres maladies	20
1.4 Les Fluidosomes TM	21
1.4.1 Caractéristiques et activité bactéricide	21
1.4.2 Mécanisme d'action des Fluidosomes TM	22
1.4.2.1 Test d'association lipidique	24
1.5 Membranes cellulaires et fusion	26
1.6 Objectifs du présent travail de recherche	31
CHAPITRE 2 – Article	34
Differential Behaviour of Fluid Liposomes Toward Mammalian Epithelial Cells and Bacteria:	
Restriction of Fusion to Bacteria	35
Abstract	36
Introduction	37
Materials and methods	39
Bacterial Strains	39
Cell Culture	39
Fluid Liposomes	40
Fusion	40
Kinetic Study: Increasing Temperature during Fusion Time-Drive	43
Results	43

Production of fluid liposomes and RET measurement	43
Fusion measured by lipid-mixing: monitoring and quantification of RET	43
Effect of temperature on the fusion process between liposomes and cell preparations of <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> and epithelial cells (WI-38 VA13 2RA)	44
Kinetic study: resonance energy transfer in relation with the initiation and the progress of fusion in function of the temperature.	45
Discussion	45
Acknowledgment	48
References	49
Figure Legends	53
Figure 1	54
Figure 2	55
Figure 3	56
Figure 4	57
CHAPITRE 3 – Article deuxième auteur	58
Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated antisense oligonucleotides	59
Abstract	60
Introduction	61
Materials and Methods	62
Bacterial strain and antisenses	62
Fluid liposomes	63
Encapsulation and quantification of the enclosed DNA	64
Monitoring DNA localization	65
UV absorbance measurements of DNA	65
Delivery of the encapsulated antisense oligonucleotides in <i>E. coli</i>	66
Determination of β -galactosidase activity	67
Results	67
DNA encapsulation with the different encapsulation solutions	67
Delivery of the encapsulated antisense oligonucleotides in bacteria	68
Determination of the β -galactosidase activity	69
Discussion	70
Acknowledgment	74
Titles and legends to figures	79
Figure 1	81
Figure 2	82
Figure 3	83
Figure 4	84
Figure 5	85
CHAPITRE 4 – Discussion	86
4.1 Les liposomes et la résistance bactérienne aux antibiotiques	86
4.2 Les Fluidosomes TM et les cellules épithéliales de mammifères	88
4.3 Mécanisme d'action des Fluidosomes TM	90
4.4 Déstabilisation des membranes liposomales et phénomène de fusion	91
4.5 Importance de l'absence de fusion des Fluidosomes TM avec les cellules de mammifères	92
4.6 L'Encapsulation des antisens et leur internalisation dans la bactérie	93
4.7 Conclusion	96
Bibliographie	98

Liste des tableaux

Tableau I. Composition phospholipidique des membranes.....	26
--	----

Liste des sigles et abréviations

°C	Degré celcius
Å	Angström
ADN	acide deoxyribonucléique
AmpB	Amphotéricine B
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i> – Régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique
CMI	concentration minimale inhibitrice
DMPG	dimyristoylphosphatidylglycérol
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine
DPTA	Dipropylène-tri-amine
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> – calorimétrie différentielle à balayage
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylène-diamine-tetra acide acetique
FK	fibrose kystique
LPS	lipopolysaccharides
LUV	<i>large unilamellar vesicle</i> – Grosse vésicule unilamellaire
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
MLV	<i>multi-lamellar vesicle</i> - Vésicule multilamellaire
NBD	7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampon phosphate
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEG	Poly-[éthylèneglycol]
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PKH-2GL	Molécule fluorescente sous brevet
PS	Phosphatidylsérine
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SME	Sphingomyéline
SSPE	<i>subacute sclerosing panencephalitis</i> - panencéphalite sclérosante sub-aiguë
SUV	<i>small unilamellar vesicle</i> – Petite vésicule unilamellaire
SV-40	<i>Simian virus 40</i> – Virus Simien 40
T _c	température de transition de phase
MAF	<i>Macrophage Activating Factor</i> – facteur d'activation des macrophages
mg	milligramme
kg	kilogramme

Remerciements

Je tiens à remercier ma famille qui a su me supporter tout au long de mes études. Je tiens à remercier mon conjoint, François, pour son support tout au long de ma maîtrise qui n'a pas toujours été facile. Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire qui ont toujours été là lorsque j'avais besoin d'aide, soit au niveau technique ou théorique, lorsque que j'arrivais à un problème ou simplement lorsque j'étais débordée.

Je tiens finalement à remercier Dre. Jacqueline Lagacé pour m'avoir accepté comme étudiante dans son laboratoire. Elle a su m'aider à accomplir les nombreux buts de mon travail de maîtrise.

CHAPITRE 1 – Revue de la littérature

1.1 Fibrose Kystique

1.1.1 La maladie

La fibrose kystique (FK) est une maladie autosomale récessive qui affecte un enfant d'origine caucasienne sur 2000 à 4500 (Koch et Hoiby, 1993; Hilman, 1997). Différentes mutations au niveau du gène codant le régulateur de conductance trans-membranaire de la fibrose kystique (CFTR pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) résultent en l'absence de la production de la protéine, en l'élimination de la protéine lors du transport vers la membrane cellulaire épithéliale ou simplement en une protéine membranaire inactive (Welsh et Smith, 1995). Le gène CFTR est responsable du transport des ions sodium et chlore à travers la membrane des cellules épithéliales ainsi qu'au niveau des glandes exocrines. L'absence de ce transport ionique cause une déshydratation du mucus présent en surface des cellules suite à une absorption excessive de l'eau par les cellules épithéliales (Kumar *et al.*, 1997). Les effets les plus néfastes de cette déshydratation sont observés au niveau pulmonaire où il y a accumulation d'un mucus épais et visqueux qui diminue la capacité pulmonaire et le mouvement mucociliaire responsable de l'expulsion du mucus et des agents microbiens (Denton et Wilcox, 1997). La cause principale de morbidité et de mortalité est attribuée à l'infection chronique des voies respiratoires, suite généralement à la colonisation par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Hoiby, 1977; Willmott *et al.*, 1985; Wood *et al.*, 1976). Même si différents traitements médicaux ont amélioré grandement le pronostic de la maladie, la fibrose kystique reste la maladie génétique la plus mortelle et les personnes atteintes ont une

espérance de vie tout au plus de trente à quarante années, dans les meilleurs des cas (Dodge *et al.*, 1993).

1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste qui ne cause généralement pas de maladie chez le patient sain (Wilson et Dowling, 1998). Cependant, chez les patients atteints de fibrose kystique ou les patients immunosupprimés, ce bâtonnet Gram négatif peut être très nuisible. *P. aeruginosa* est très présent dans l'environnement et peut être retrouvé dans les éviers, les respirateurs et même sur les mains du personnel médical (Pitt, 1986). Cette omniprésence favorise la colonisation des poumons de patients susceptibles. Une infection chronique peut alors se développer, car il est très rare que chez les patients atteints de fibrose kystique, la bactérie soit éliminée des poumons, même suite à des traitements d'antibiothérapie agressifs (Denton et Wilcox, 1997; Macleod *et al.*, 2000; Webb, 1995; Dodge *et al.*, 1993). La cause principale de cette chronicité est la grande capacité d'adaptation et la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* aux antibiotiques (Franklin, 1992; Govan et Harris, 1986). Sans même avoir été mise en contact avec un antibiotique, l'imperméabilité membranaire de *P. aeruginosa* est très élevée et augmente, souvent de façon transitoire, en présence de l'antibiotique (Angus *et al.*, 1982; Franklin, 1992; Yoshimura et Nikaido, 1982; Büscher *et al.*, 1987; Godfrey *et al.*, 1984; Lynch *et al.*, 1987; Yoneyama *et al.*, 1986; Gilleland *et al.*, 1989).

1.1.3 Traitement

Les traitements disponibles pour la fibrose kystique ont le potentiel de retarder l'établissement de l'infection chronique dans le cas où les antibiotiques seraient donnés dès la détection de la bactérie (Velerius *et al.*,

1991). Cependant, il existe beaucoup de controverse sur le type de traitement à administrer, notamment l'antibiotique à utiliser, le mode de traitement, que celui-ci soit systémique ou pulmonaire, ainsi que la période à laquelle on doit administrer le traitement, de façon préventive ou traiter les exacerbations (Beaudry *et al.*, 1980; Marks, 1980). Jusqu'à présent, les traitements disponibles agissent plutôt de façon palliative, donc non-curative, et ne font que diminuer les symptômes et augmenter la survie de quelques années (Webb, 1995). Un problème majeur survient lorsque les bactéries deviennent résistantes aux antibiotiques. Des doses plus grandes sont alors nécessaires, mais un certain niveau ne peut être dépassé puisqu'à doses élevées, la majeure partie des antibiotiques, comme les aminoglycosides, sont toxiques (Webb, 1995; Fee et Lathrop, 1978; Schentag *et al.*, 1978; Smith *et al.*, 1988). Par contre, il a été démontré qu'un traitement local au niveau des bronches était une approche favorable pour augmenter l'effet bactéricide des antibiotiques et diminuer ainsi les effets secondaires de ceux-ci (Thys et Klastersky, 1988; Macleod *et al.*, 2000).

1.2 Résistance aux antibiotiques

1.2.1 Historique

Au moment de leur découverte, les antibiotiques ont été perçus comme la solution miracle et définitive pour toutes les infections bactériennes. Cependant, avec le temps, la sur-utilisation et le mauvais usage de ceux-ci ont favorisé le développement de bactéries résistantes et ont exigé le développement de nouvelles classes d'antibiotiques (Levy, 1997; Mazel et Davis, 1998). La plupart des modifications chimiques possibles ont été apportées pour développer de nouveaux antibiotiques, néanmoins la résistance reste un problème d'envergure (Pelczar *et al.*, 1993b). Certaines

infections sont aujourd'hui intraitables, car les bactéries impliquées sont résistantes à tous les antibiotiques connus. Des maladies comme la tuberculose refont surface sans qu'on soit en mesure de les traiter et des infections qui étaient autrefois bénignes peuvent être mortelles aujourd'hui (Pelczar *et al.*, 1993c). Ce problème de résistance oblige les chercheurs à tenter de trouver de nouveaux moyens de combattre les infections.

1.2.2 Mécanismes de résistance et solutions possibles

La compréhension des mécanismes de résistance est un outil important lors du développement de nouveaux traitements. Plusieurs mécanismes de résistance existent et peuvent être divisés en plusieurs catégories: intrinsèque versus acquis, enzymatique ou non-enzymatique, transférable ou non. Généralement, la résistance intrinsèque est due à la faible perméabilité de la membrane bactérienne, à la présence de pompes à reflux, à l'absence de la cible pour l'antibiotique ou à la présence d'un mécanisme complémentaire à celui ciblé (Wright *et al.*, 1998; Van Veen et Konings, 1998). Pour ce qui est de la résistance acquise, elle est due à la modification de la cible, à la production d'enzymes qui inactivent l'antibiotique, à l'accroissement de la perméabilité membranaire et à un nombre accru de pompes à reflux (Wright *et al.*, 1998; Van Veen et Konings, 1998). Dans le cas des infections causées par *P. aeruginosa* chez les patients atteints de la fibrose kystique, le mécanisme principal de résistance est l'imperméabilité membranaire associée à la présence de pompes à reflux qui diminuent l'entrée de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie (Poole *et al.*, 2001).

En considérant que la résistance de *P. aeruginosa* n'est généralement pas causée par une modification de la cible ou une production d'enzyme affectant l'antibiotique, les antibiotiques actuels peuvent être utilisés si leur entrée dans la bactérie est favorisée (Struck *et al.*, 1981). Un des moyens envisagé est

l'utilisation d'un véhicule de transport pour l'antibiotique. Certains de ces véhicules pourraient être des molécules qui englobent l'antibiotique et favorisent sa pénétration dans la cellule bactérienne (Kellaway et Farr, 1990). Les liposomes représentent le type de véhicule le plus étudié.

1.3 Les liposomes

1.3.1 Historique

Les liposomes ont été décrits pour la première fois dans la littérature en 1965 par Bangham et ses collègues (Bangham *et al.*, 1965). L'utilisation première des liposomes visait l'étude des propriétés et du comportement des membranes. Les liposomes servaient de membranes artificielles qui ont permis d'élaborer plusieurs théories concernant le mouvement des molécules à l'intérieur et à travers les membranes ainsi que les interactions entre deux membranes lors de l'endo- et l'exocytose (Gregoriadis, 1988). Ce n'est que depuis une vingtaine d'années que l'idée de l'utilisation des liposomes comme véhicule pour le transport de médicaments a fait surface pour traiter les infections ou autres maladies (Betageri *et al.*, 1993b). Les premiers espoirs étaient que les liposomes pourraient servir de boulet magique (*magic bullet*) et pourraient traiter de façon spécifique toutes les maladies (Ostro, 1987). Cet espoir était basé sur la nécessité d'avoir de nouveaux types de traitements qui seraient plus efficaces comportant moins d'effets secondaires (Cullis *et al.*, 1987).

Aujourd'hui, la plupart des traitements disponibles sont administrés systématiquement sans aucune spécificité pour l'infection ou la maladie. De plus grandes doses de médicaments sont nécessaires car il n'y a seulement qu'une quantité minime qui se rend à l'endroit désiré. De plus, un problème

majeur avec le traitement systémique est la toxicité associée à plusieurs médicaments. Les organes sensibles ne sont protégés d'aucune façon et le fait de diminuer la dose totale diminue l'efficacité du traitement (Ostro, 1987). Les liposomes ont le potentiel de diminuer la toxicité des médicaments et dans certains cas d'augmenter l'efficacité de ceux-ci. De plus, les liposomes peuvent être administrés au site désiré, ce qui diminue les doses totales nécessaires pour l'obtention d'un traitement efficace (Popescu *et al.*, 1987; Betageri *et al.*, 1993b).

1.3.2 Types de liposomes

Les liposomes se forment spontanément lorsque des phospholipides sont mis en contact avec une solution aqueuse (Bangham *et al.*, 1974). Les régions hydrophobes interagissent ensemble en exposant la région hydrophile (la tête du phospholipide) à la solution aqueuse, formant ainsi une micelle ou une bicouche (Vemuri et Rhodes, 1995). Pour les liposomes, on obtient une structure avec un centre aqueux entouré d'une ou plusieurs bicouches. Entre celles-ci, il y a un espace aqueux plus ou moins étroit (Taylor et Newton, 1994). La taille du liposome est déterminée par la dimension du centre aqueux, de l'espace entre les bicouches et du nombre de bicouches. Il existe plusieurs types de liposomes basés sur leur composition (lipides ou autres molécules), la charge de surface, la taille et la méthode de production (Betageri *et al.*, 1993b). La classification proposée par Betageri et ses collègues est basée sur la taille et le nombre de bicouches (lamellarité) des liposomes. La première classification repose sur la lamellarité : unilamellaire ou multilamellaire. Les liposomes unilamellaires sont sous-divisés en deux groupes, les unilamellaires de petite taille (entre 20 et 100 nm) et ceux de grande taille (plus de 100 nm). Cette première classification détermine plusieurs des particularités des liposomes. Les différents types de liposomes

sont généralement obtenus suite à des méthodes de production différentes (Betageri *et al.*, 1993b).

Les liposomes multilamellaires (MLV pour *multilamellar vesicle*) sont les liposomes les plus faciles à produire et les premiers décrits par Bangham et ses collègues en 1965 (Bangham *et al.*, 1965). Les MLV sont généralement composés de 5 lamelles ou plus et ont un diamètre de 100 nm à 1 μm (Betageri *et al.*, 1993b). Plusieurs types de molécules peuvent être encapsulés dans les MLV, ce qui les rend très polyvalents. Toutefois, leur capacité d'encapsulation est beaucoup plus faible que les liposomes unilamellaires de grande taille (Betageri *et al.*, 1993b). Pour leur part, les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV pour *small unilamellar vesicle*) forment généralement une population homogène qui peut être séparée des autres types de liposomes (Barenholz *et al.*, 1977). Par contre, leur utilité est plus restreinte. En effet, leur capacité d'encapsulation est très faible et le ratio entre la substance encapsulée et les lipides est très bas. Un faible ratio augmente les coûts de production. Il y a aussi la possibilité d'une distribution asymétrique des lipides dans la bicouche, ce qui diminue la reproductibilité des SUV (Betageri *et al.*, 1993b). Le dernier groupe, les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV pour *large unilamellar vesicle*) ont la plus grande capacité d'encapsulation, un haut ratio de substance encapsulée versus les lipides, toutefois ils sont les plus difficiles à produire (Betageri *et al.*, 1993b).

1.3.3 Composition

Les liposomes sont principalement composés de phospholipides, mais peuvent aussi contenir des lysophosphatides, du cholestérol ou d'autres molécules amphiphiliques. Le phospholipide le plus commun est la phosphatidylcholine (PC) qui est présente dans presque toutes les

membranes cellulaires. Elle est très utilisée puisqu'elle est neutre, très peu coûteuse et pratiquement inerte chimiquement. Une des particularités de la molécule de PC est qu'elle forme une bicouche au lieu de former des micelles comme plusieurs molécules de détergents. Comme mentionné précédemment, la formation de bicouches favorise la formation de liposomes (Betageri *et al.*, 1993b). La deuxième molécule la plus utilisée est le cholestérol qui généralement stabilise le liposome et modifie les propriétés thermiques de celui-ci, dépendamment de la concentration utilisée (Betageri *et al.*, 1993b).

Des phospholipides avec une charge négative peuvent être ajoutés aux liposomes. Un exemple de phospholipide négatif est le phosphatidylglycérol (PG). L'incorporation de phospholipides négatifs augmente l'espace entre les bicouches des liposomes multilamellaires, ce qui favorise une plus grande encapsulation de solution aqueuse et de molécules désirées (Vemuri et Rhodes, 1995; Betageri *et al.*, 1993b). La présence de phospholipides négatifs diminue aussi les chances d'agrégation entre les liposomes, ce qui pourrait causer une perte d'efficacité lors du traitement (Betageri *et al.*, 1993b). Des phospholipides chargés positivement peuvent aussi être ajoutés, on obtient alors des liposomes cationiques. Ceux-ci sont principalement utilisés pour la thérapie génique, car ils forment des complexes avec l'ADN qui peut ensuite être introduit dans les cellules ciblées (Audouy et Hoekstra, 2001; Felgner *et al.*, 1995; Farhood *et al.*, 1994).

La composition des liposomes affecte la température de transition de phase (T_c) de ceux-ci. Tous les phospholipides ont une T_c qui correspond à la température à laquelle ils passent de l'état ordonné (gel ou solide) à l'état désordonné (liquide, cristalline ou fluide). Dépendamment des proportions de chacun des types de phospholipides, le liposome changera de phase à une certaine température. Cet aspect du liposome affecte sa perméabilité et sa

stabilité (Vemuri et Rhodes, 1995). La composition, la taille et le mode de préparation affectent donc les caractéristiques des liposomes, ce qui peut les rendre très polyvalents pour différents types de traitements (Betageri *et al.*, 1993b).

1.3.4 Utilisation comme véhicule pour les médicaments

Plusieurs caractéristiques sont requises lors du développement d'un liposome pour la libération de médicament. Cependant, il est très difficile de prévoir les propriétés finales lors de la sélection des lipides et de la méthode de production. C'est pourquoi plusieurs essais doivent être réalisés avant d'obtenir toutes les propriétés désirées (Betageri *et al.*, 1993b). Les caractéristiques de base les plus recherchées sont la capacité d'encapsulation, la capacité de rétention du médicament et le ratio lipide-médicament. Un ratio lipide-médicament élevé n'est pas recommandé car le coût final augmente proportionnellement (Betageri *et al.*, 1993b). L'utilisation locale, comparativement à celle systémique, est un autre aspect très recherché. La possibilité de cibler les liposomes à un endroit précis a le potentiel de diminuer l'effet toxique du médicament (Popescu *et al.*, 1987; Taylor et Newton, 1994; Betageri *et al.*, 1993b; Kellaway et Farr, 1990). La diminution de la toxicité peut augmenter l'index thérapeutique qui est le ratio entre la dose toxique moyenne et la dose effective moyenne (Betageri *et al.*, 1993b). Les liposomes ont aussi le potentiel de protéger le médicament encapsulé de l'environnement contenant des substances telles que des enzymes comme les β -lactamase qui détruisent les antibiotiques de la classe des β -lactames (Popescu *et al.*, 1987; Nacucchio *et al.*, 1990). Les liposomes peuvent également protéger le médicament contre le système immunitaire ou le changement de pH du milieu (Taylor et Newton, 1994).

Une autre propriété recherchée est l'augmentation de l'entrée du médicament à l'intérieur de la cellule ciblée (Betageri *et al.*, 1993b), associée à la capacité des liposomes de se rapprocher des cellules ciblées et même d'interagir avec celles-ci (Taylor et Newton, 1994). Les liposomes peuvent être construits de façon à libérer le médicament très lentement, augmentant ainsi la période de traitement et créant un réservoir de médicament disponible (Popescu *et al.*, 1987; Kellaway et Farr, 1990; Taylor et Newton, 1994; Betageri *et al.*, 1993b). La propriété amphiphilique des liposomes permet l'utilisation de médicaments hydrophiles ou lipophiles. Finalement, la grande diversité de taille des liposomes permet l'utilisation de médicaments de poids moléculaire élevé. Le liposome peut favoriser l'entrée de ces médicaments dans la cellule que ce soit par phagocytose-endocytose ou par fusion (Popescu *et al.*, 1987; Taylor et Newton, 1994). Toutes les caractéristiques doivent être vérifiées lors du développement d'un nouveau type de liposome.

1.3.5 Ciblage

Les traitements conventionnels sont généralement systémiques, impliquant qu'une petite partie seulement du médicament se rende au site désiré. Ce type de traitement est limité par la quantité du médicament qui peut être utilisée puisque la possibilité de toxicité est très souvent présente (Ostro, 1987). Pour résoudre ce problème, le ciblage du médicament à un endroit spécifique semble la solution la plus efficace. La possibilité de cibler les liposomes, que ce soit vers un organe, un type de cellule ou même un compartiment cellulaire, justifie leur utilisation (Betageri *et al.*, 1993b). Plusieurs conditions doivent être rencontrées pour que les liposomes puissent servir au ciblage. Premièrement, le liposome doit avoir accès à la cellule cible. Deuxièmement, il doit y avoir une interaction spécifique entre le liposome et la cellule cible, que ce soit par la reconnaissance du liposome par la cellule ou vice versa. Troisièmement, le liposome ne doit pas interagir avec les cellules

non-ciblées. Finalement, le liposome doit interagir suffisamment longtemps avec la cellule ciblée pour qu'il y ait libération d'une concentration suffisante de médicament. (Weinstein et Leserman, 1984)

Il existe quatre classes de ciblage divisées en deux groupes: le ciblage passif ou actif. Le ciblage passif comprend le ciblage par la compartimentation et le ciblage naturel. Le ciblage actif est pour sa part divisé en ciblage par association de ligand et ciblage physique (Betageri *et al.*, 1993c; Weinstein, 1987). Ces différentes possibilités permettent l'utilisation de différents liposomes et dépendent de la composition, de la taille, du mode de préparation et du mode d'administration du liposome (Hwang, 1987).

1.3.5.1 Ciblage par compartimentation

Le traitement local est une des possibilités les plus avantageuse des liposomes. L'opportunité de traiter localement la maladie a pour effet de diminuer la dose systémique normalement requise et ainsi de protéger les organes susceptibles contre la toxicité. Le ciblage par compartimentation peut être effectué par injection directe dans les poumons, les jointures ou tout autre organe dans lequel on peut injecter une solution ou pour le traitement au niveau cutané ou de la cornée (Kimelberg et Mayhew, 1979). Le ciblage par compartimentation est donc un des plus simple, mais un des moins spécifique en ce qui a trait au type de cellule ciblée.

1.3.5.2 Ciblage naturel

Le ciblage naturel est basé sur la tendance des liposomes à s'accumuler dans certains tissus ou certains types de cellules (Betageri *et al.*, 1993c; Weinstein, 1981). La plupart des liposomes de grande taille, lorsque injectés dans le sang, sont éliminés par le système réticuloendothélial, principalement par

les monocytes et les macrophages (Hwang, 1987; Gregoriadis et Ryman, 1972; Gregoriadis et Neerunjun, 1974; Poste *et al.*, 1984; Rahman *et al.*, 1974). Ce type de ciblage peut être très utile pour le traitement des tumeurs cancéreuses ou des infections impliquant les macrophages. Pour le traitement du cancer, l'activation des macrophages par des immuno-stimulateurs encapsulés peut aider à l'élimination des métastases. Les macrophages activés sont en mesure de distinguer les cellules cancéreuses des cellules non cancéreuses (Fidler, 1989). Pour ce qui est de l'infection des macrophages causée par *Leishmania* ou *Mycobactérium* par exemple, le ciblage naturel permet la libération du médicament encapsulé directement à l'intérieur de la cellule infectée (Betageri *et al.*, 1993c).

1.3.5.3 Ciblage par association d'un ligand

L'association par ligand est une des voies les plus étudiées pour le ciblage des liposomes car cette technique est très précise (Leserman et Machy, 1987). Des ligands spécifiques pour une molécule à la surface de la cellule ciblée sont insérés à la surface des liposomes, soit par des liens covalents ou par interactions hydrophobes/hydrophiles. En général, les ligands utilisés sont des anticorps monoclonaux sélectionnés pour leur spécificité et leur facilité de production (Betageri *et al.*, 1993c). Certaines études ont même démontré que seulement 10 anticorps monoclonaux à la surface d'un liposome étaient suffisants pour l'interaction spécifique avec la cellule ciblée (Leserman et Machy, 1987). D'autres molécules peuvent aussi être utilisées comme ligand, tel que les hormones, les lectines, les glucides ou autres protéines (Weinstein, 1987).

1.3.5.4 Ciblage physique

Le ciblage physique est basé sur la modification de la composition du liposome pour obtenir des caractéristiques changeantes selon les conditions environnementales. Ce type de modification inclut les liposomes sensibles à la température, au pH, à la lumière ou les liposomes magnétiques (Weinstein, 1987). La sensibilité à la température et au pH sont les modifications les plus utilisées. Les liposomes ont une température de transition de phase à laquelle la structure des phospholipides passe de l'état gel ou stable à l'état fluide ou instable (Vemuri et Rhodes, 1995). À l'état gel, la solution encapsulée reste à l'intérieur du liposome. Lorsque la température augmente, le liposome devient instable et libère la solution. En utilisant un liposome avec une température de transition de phase un peu au-dessus de la température du corps, un réchauffement local où le traitement est désiré favoriserait la libération du médicament à cet endroit seulement (Betageri *et al.*, 1993c). Les liposomes sensibles au pH peuvent être utiles lors d'une infection locale, car la région infectée devient quelque peu acide. Les liposomes sont développés pour être stable à un pH de 7,4, qui est le pH normal du corps et instable à un pH plus bas. Il y aurait relâchement du médicament seulement dans la région à plus faible pH, la région de l'infection (Betageri *et al.*, 1993c).

1.3.6 Interaction des liposomes avec les cellules

Les liposomes peuvent interagir de plusieurs façons avec les cellules afin de leur apporter le médicament encapsulé. Les moyens utilisés sont l'adsorption des liposomes à la surface des cellules, le relâchement par contact, le transfert inter-membranaire, la phagocytose-endocytose et la fusion (Betageri *et al.*, 1993a). Lors du transfert inter-membranaire, il y a un échange de lipides entre le liposome et la cellule lors du contact. Cet échange n'affecte pas l'intégrité du liposome ou de la cellule (Betageri *et al.*, 1993a). Ce mécanisme

peut être utile pour le transfert d'un médicament lipophile présent dans la bicouche phospholipidique du liposome, qui pourrait ainsi être transféré d'une membrane à l'autre sans avoir à traverser le milieu aqueux. Pour ce qui est du relâchement par contact, le mécanisme pour le transfert du contenu aqueux est très peu compris jusqu'à maintenant. L'hypothèse proposée est une augmentation de la perméabilité du liposome suite au contact, ce qui permettrait un déversement du contenu aqueux en grande quantité à un endroit précis de la cellule. Le médicament, sous certaines conditions, peut traverser la membrane pour entrer à l'intérieur de la cellule (Betageri *et al.*, 1993a).

L'adsorption des liposomes sur la membrane cellulaire est un des mécanismes les plus communs étant donné qu'elle est une des étapes nécessaires pour la phagocytose-endocytose, la fusion et possiblement pour le relâchement par contact. L'adsorption survient suite à une force d'attraction physique ou par une association avec un ligand (Betageri *et al.*, 1993a). Cependant, celle-ci n'est pas nécessairement accompagnée de l'internalisation du liposome entier, des phospholipides ou du contenu aqueux (Poste, 1980). Lors de l'adsorption, si le contact entre le liposome et la cellule est assez long, il peut y avoir diffusion lente de la solution encapsulée à travers la membrane liposomale et la membrane cellulaire (Taylor et Newton, 1994). Pour ce qui est des deux autres mécanismes, les facteurs déterminants dans le cas de l'internalisation du liposome par phagocytose-endocytose ou fusion suite à l'adsorption ne sont pas complètement connus (New *et al.*, 1990; Leserman *et al.*, 1980). Malgré cela, il est connu que suite à la phagocytose-endocytose, le contenu du liposome est relâché dans le lysosome par l'action des enzymes et du pH acide, ce qui cause la destruction du liposome (Betageri *et al.*, 1993a). Les hypothèses pour le mécanisme de fusion entre les liposomes et les cellules

seront expliquées dans une section subséquente étant donné qu'il s'agit d'un des principaux aspects du présent travail.

1.3.7 Applications

Tel que mentionné précédemment, les liposomes peuvent être utilisés pour différents types de traitements à cause de leur très grande polyvalence en ce qui a trait à leur composition, à leur taille et leur mode de ciblage. Voici quelques exemples d'applications, classés selon le type de maladie.

1.3.7.1 Infections virales

Les virus sont des parasites intracellulaires contre lesquels il n'existe pas un grand nombre de traitements comparativement à la gamme très élaborée d'antibactériens. Pour pouvoir éliminer un virus, il faut arrêter la multiplication de celui-ci en inhibant son mécanisme de réplication ou en tuant les cellules infectées. Plusieurs études impliquant l'utilisation des liposomes ont été publiées et différents mécanismes ont été proposés (Popescu *et al.*, 1987). Un des premiers mécanismes utilisait des liposomes dans lesquels le fragment A de la toxine diphtérique avait été encapsulée afin de tuer la cellule infectée. Ces liposomes interagissaient de façon spécifique avec les cellules infectées qui exprimaient au niveau de la membrane la protéine virale de fusion du virus infectant, le virus de la panencéphalite sclérosante sub-aiguë (SSPE pour *subacute sclerosing panencephalitis*). Les cellules infectées interagissent donc avec les liposomes qui transfèrent la toxine, tuant les cellules et limitant la propagation du virus (Ueda *et al.*, 1981). Un autre mécanisme proposé était l'utilisation d'anticorps monoclonaux liés la surface des liposomes contenant l'antiviral. Des cellules, infectées par le virus de l'herpès simplex, exprimaient à leur surface la glycoprotéine virale D

vers laquelle l'anticorps monoclonal était dirigé. De cette façon, seules les cellules infectées recevaient l'antiviral. (Norley *et al.*, 1986)

Un type de cellule très important lors de la réaction antivirale est le macrophage. Il est connu que plusieurs liposomes sont détruits suite à la phagocytose par des macrophages (Fidler *et al.*, 1981; Juliano, 1982; Poste *et al.*, 1982; Alving, 1983). Koff et ses collègues ont utilisé cette propriété pour développer un traitement antiviral. Ils ont encapsulé le facteur d'activation des macrophages (MAF pour *Macrophage Activating Factor*) dans des liposomes multilamellaires. Ces liposomes étaient capables d'activer les macrophages et de stimuler la destruction des cellules infectées par le virus de l'herpès simplex 2 (Koff *et al.*, 1983). Leurs résultats sont très prometteurs puisque le facteur d'activation des macrophages, lorsque donné sous la forme libre, ne stimulait pas les macrophages et ne favorisait pas l'élimination du virus (Koff *et al.*, 1984; Koff *et al.*, 1985). Finalement, plusieurs chercheurs ont tenté d'encapsuler des interférons, médiateurs très importants dans la réaction antivirale du système immunitaire; cependant les résultats n'ont pas été très concluants et plusieurs études restent à faire (Gurari-Rotman et Lelkes, 1982; Anderson *et al.*, 1981; Eppstein et Stewart, 1981; Gruner *et al.*, 1985).

1.3.7.2 Infections fongiques

L'utilisation la plus courante des liposomes pour traiter les infections concerne les infections fongiques traitées avec l'amphotéricine B (Amp B). De tels liposomes sont d'ailleurs déjà commercialisés (Lopez-Berestein *et al.*, 1985). L'amphotéricine B est un médicament toxique dont les effets secondaires peuvent s'étaler sur une longue période de temps. L'utilisation de liposomes avait comme but premier la diminution de la toxicité (New et Chance, 1980; Graybill *et al.*, 1982). Plusieurs essais cliniques ont en effet

démontré une diminution de la toxicité. Lors d'un essai avec 49 enfants neutropéniques, lesquels ne répondaient pas au traitement conventionnel avec l'Amp B libre ou avaient développé une néphrotoxicité suite au traitement, on a observé des résultats très prometteurs. Dans 52,4% des cas avec l'Amp B libre, il y a eu développement de toxicité comparativement à 12% avec l'Amp B encapsulé. De plus, des doses 5 fois plus élevées étaient utilisées avec les liposomes-Amp B (Sandler *et al.*, 2000). Lors d'un autre essai clinique lors duquel 687 patients ont été traités avec l'Amp B libre ou encapsulé, les deux traitements ont produit un effet thérapeutique équivalent. Toutefois, il y a eu une diminution significative de la toxicité et de la néphrotoxicité lors de l'injection avec l'Amp B encapsulé (Walsh *et al.*, 1999).

1.3.7.3 Infections causées par des protozoaires

L'infection parasitaire la plus ciblée est celle causée par les organismes de la famille des *Leishmania* qui sont des parasites intracellulaires infectant les macrophages et ayant des conséquences très désastreuses pour le patient (Reed, 1988). Les médicaments utilisés, les antimoine, sont très toxiques pour le foie, le tractus intestinal, le cœur et les reins, rendant leur utilisation très limitée (Shek et Barber, 1986). Très tôt dans le développement des liposomes, plusieurs scientifiques ont étudié l'utilisation des liposomes pour diminuer cette toxicité (Popescu *et al.*, 1987). Les résultats obtenus sont très encourageants, car ils diminuent la toxicité tout en conservant l'activité anti-parasitaire, ce qui résulte en une augmentation de l'indice thérapeutique (Alving et Steck, 1979; Steck, 1981; Alving *et al.*, 1984; Alving, 1983). Comme mentionné précédemment, les macrophages sont ciblés naturellement par les liposomes de grande taille et l'antimoine encapsulé peut donc être libéré directement à l'intérieur de la cellule. De plus, les liposomes multilamellaires semblent se diriger naturellement vers les vacuoles contenant le parasite (Alving, 1983; Weldon *et al.*, 1983). Il a même été démontré qu'une

combinaison de liposomes contenant l'antimoine et des liposomes contenant des immuno-stimulateurs avaient un effet très considérable pour l'élimination de l'infection (Adinolfi *et al.*, 1985; Mehta *et al.*, 1984).

Un autre parasite d'importance, *Cryptococcus meningitidis*, cause des méningites principalement chez les patients atteints du SIDA. Pour ces infections, le traitement conventionnel est l'Amp B. Lors d'un essai clinique pour comparer l'effet du médicament libre avec celui encapsulé, 28 patients sidéens atteints de méningite cryptococcale ont été divisés en deux groupes. Le premier était traité avec 0,7 mg/kg d'Amp B et le deuxième avec 4 mg/kg d'Amp encapsulé. Les patients traités avec les liposomes ont présenté une conversion plus rapide à l'état non-infecté tel que démontré par la culture de leur liquide céphalorachidien. La néphrotoxicité a également diminué chez ces même patients (Landers *et al.*, 1997).

1.3.7.4 Infections bactériennes

Plusieurs études ont été effectuées afin de déterminer s'il était possible d'augmenter l'efficacité des antibiotiques en utilisant des liposomes (Vladimiski et Ladigina, 1982; Fountain *et al.*, 1985b; Tadakuma *et al.*, 1985; Desiderio et Campbell, 1983; Bakker-Woudenberg *et al.*, 1985; Milward *et al.*, 1984; Popescu *et al.*, 1987). Ces études ont principalement porté sur les bactéries intracellulaires facultatives qui réussissent à survivre à l'intérieur de certaines cellules de l'hôte, particulièrement les macrophages. La plupart de ces études ont démontré une augmentation de l'efficacité de l'antibiotique encapsulé versus l'antibiotique libre (Bonventre et Gregoriadis, 1978; Stevenson, 1983; Fountain *et al.*, 1985b; Fountain *et al.*, 1985a; Dees *et al.*, 1985). Par exemple, il a été démontré lors d'expériences *in vitro* que l'utilisation de SUV contenant du di-hydro-streptomycine était 40 fois plus efficace contre *S. aureus* que l'antibiotique libre (Bonventre et Gregoriadis, 1978). Un autre

exemple est l'utilisation de liposomes contenant de la streptomycine et qui était 12 fois plus efficace que l'antibiotique libre contre *E. coli* (Stevenson, 1983). D'autres études *in vitro* ont porté sur d'autres antibiotiques de la famille des aminoglycosides et des céphalosporines (Fountain *et al.*, 1985b; Fountain *et al.*, 1985a; Dees *et al.*, 1985). Une étude a aussi porté sur l'utilisation du chloramphénicol contre *E. coli*. Le chloramphénicol, qui est lipophile, était inséré dans la membrane du liposome et non dans le milieu aqueux. Ce type de liposomes a eu 10 à 12 fois plus d'effet que l'antibiotique libre (Stevenson, 1983). Plusieurs études avaient comme contrôles négatifs des liposomes vides seuls ou de l'antibiotique libre. Les liposomes vides n'augmentaient pas l'effet de l'antibiotique libre et n'avaient aucun effet par eux-mêmes. Ces résultats indiquaient que les liposomes ne présentaient pas d'effet toxique qui pourraient augmenter l'effet bactéricide (Popescu *et al.*, 1987; Stevenson, 1983; Bonventre et Gregoriadis, 1978; Fountain *et al.*, 1985b). Le mécanisme d'action le plus probable des liposomes est l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'antibiotique dans la cellule infectée et/ou une distribution plus favorable de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule (Popescu *et al.*, 1987). Pour ce qui est des études *in vivo* avec des modèles animaux, les résultats sont controversés, certaines études ont eu un effet positif et d'autres aucun effet (Popescu *et al.*, 1987). En ce qui concerne les infections extracellulaires, l'effet des liposomes serait plutôt le résultat d'une augmentation de la concentration à l'endroit désiré suite à l'administration locale (Popescu *et al.*, 1987). Il est également possible que les liposomes protègent l'antibiotique contre des enzymes produits par les bactéries (Nacucchio *et al.*, 1985; Nacucchio *et al.*, 1986). Par contre, très peu d'études ont porté sur des infections bactériennes extracellulaires et l'utilisation des liposomes.

1.3.7.5 Autres maladies

Le traitement des infections et du cancer sont les cibles principales pour les liposomes et plusieurs résultats prometteurs ont été publiés, que ce soit pour les infections virales (Betageri *et al.*, 1993b; Watari *et al.*, 1990; Popescu *et al.*, 1987; Eppstein et Felgner, 1988; Koff et Fidler, 1985), parasitaires (Patterson et Andriole, 1989; New *et al.*, 1978; Davidson *et al.*, 1991; Zonneveld et Crommelin, 1988; Alving *et al.*, 1980; Alving et Swartz, 1985), bactériennes (Ashketar *et al.*, 1991; Gangadharam *et al.*, 1991; Fountain *et al.*, 1985a; Vladimiski et Ladigina, 1982; Graybill *et al.*, 1982; Desiderio et Campbell, 1983; Bakker-Woudenberg *et al.*, 1985; Fountain *et al.*, 1985b; Tadakuma *et al.*, 1985; Beaulac *et al.*, 1998; Beaulac *et al.*, 1996), fongiques (Lopez-Berestein *et al.*, 1985; Zonneveld et Crommelin, 1988) ou le cancer (Weinstein et Leserman, 1984; Weinstein, 1984; Poznansky et Juliano, 1984; Koff et Fidler, 1985). Toutefois, il existe d'autres utilisations moins communes mais tout aussi importantes. Il y a les liposomes contenant des anti-inflammatoires pour le traitement local de l'arthrite (Zonneveld et Crommelin, 1988). Dans certaines maladies génétiques comme la maladie de Gauche ou de Pompe où un enzyme lysosomal n'est pas produit, celui-ci pourrait être apporté par des liposomes. Les enzymes donnés sous la forme libre sont détruits avant même de se rendre à la cellule (Zonneveld et Crommelin, 1988). De plus, certains chercheurs tentent de remplacer le système de transport de l'oxygène des érythrocytes par des liposomes, ce qui diminuerait le besoin de transfusions sanguines humaines (Djordjevich et Ivankovich, 1988; Rudolph *et al.*, 1991). Une autre utilisation des liposomes serait pour les empoisonnements avec des métaux lourds. Des substances comme l'EDTA (Ethylène-diamine-tétra acide acétique) et le DPTA (Dipropylène-tri-amine) sont capables de chélater les métaux. Toutefois, ils sont incapables de traverser la membrane cellulaire, sont détruits dans le sang et sont très toxiques. Les liposomes seraient en mesure de résoudre tous ces problèmes (Rahman, 1988). Finalement, les

liposomes pourraient être utilisés pour la vaccination. Les nouveaux types de vaccins, les vaccins sous-unitaires ou peptidiques sont très encourageants. Néanmoins, les vaccins sont généralement très peu immunogènes lorsqu'ils sont injectés seuls, l'ajout d'adjuvants étant nécessaire pour initier une réaction immunitaire. Par contre, si ces petites molécules sont couplées avec des liposomes, les macrophages ingèrent les liposomes et stimulent une réaction immunitaire très soutenue contre l'antigène encapsulé (Gregoriadis, 1990).

1.4 Les Fluidosomes™

1.4.1 Caractéristiques et activité bactéricide

Les Fluidosomes™ sont des liposomes qui ont été développés dans notre laboratoire. Ils sont composés de deux types de phospholipides: dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et dimiristoylphosphatidylglycérol (DMPG) dans un ratio molaire de 10:1 à 18:1. La molécule de DPPC est neutre tandis que le DMPG est chargé négativement, ce qui donne un liposome anionique. Ces deux phospholipides ensemble dans les Fluidosomes™ ont une température de transition de phase se situant autour de 37 °C et, à partir de 29-33 °C on observe un début de déstabilisation membranaire, ce qui leur confère leur caractéristique principale: un état instable à la température normale du corps. Les Fluidosomes™ ont été développés pour encapsuler un aminoglycoside, la tobramycine, dans le but de traiter les infections pulmonaires causées par *P. aeruginosa*, cause principale de décès chez les patients atteints de fibrose kystique (Hoiby, 1977; Willmott *et al.*, 1985; Wood *et al.*, 1976). Contrairement à plusieurs liposomes

utilisés pour des infections bactériennes intracellulaires, les Fluidosomes™ ont été développés pour les infections extracellulaires.

L'efficacité des Fluidosomes™ a été vérifiée *in vitro* contre plusieurs types de bactéries incluant *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et plusieurs souches de *Pseudomonas aeruginosa*, dont une très résistante à la tobramycine. Dans tous les cas, il y a eu une action supérieure de la tobramycine encapsulée comparativement à la tobramycine libre (Beaulac *et al.*, 1996; Beaulac *et al.*, 1998). Il a aussi été démontré que les Fluidosomes™ contenant de la tobramycine étaient efficaces contre les bactéries testées, et ce, à des concentrations sous la concentration minimale inhibitrice, ce qui démontre un effet augmenté de l'action antibactérienne de l'antibiotique encapsulé (Beaulac *et al.*, 1998).

Des tests réalisés sur un modèle animal d'infection chronique causée par *P. aeruginosa* ont démontré que les rats infectés au niveau pulmonaire et traités avec des Fluidosomes™ contenant de la tobramycine ont été capables d'éradiquer l'infection comparativement à un effet très faible de la tobramycine libre (Beaulac *et al.*, 1996). Les résultats obtenus avec les Fluidosomes™ vides ou avec de la tobramycine à l'extérieur des liposomes ont montré que ce n'étaient pas les Fluidosomes™ qui étaient toxiques ou qui agissaient comme cofacteur. Il a également été démontré que les Fluidosomes™ n'étaient pas immunogéniques suite à des inoculations intra-péritonéales et intra-trachéales répétées chez la souris (Sachetelli *et al.*, 1999).

1.4.2 Mécanisme d'action des Fluidosomes™

Pour déterminer le mécanisme d'action des Fluidosomes™, plusieurs études ont été effectuées. Une étude d'immunocytochimie a été réalisée pour déterminer s'il y avait une augmentation de la pénétration de la tobramycine

dans les bactéries lorsque l'antibiotique était encapsulé dans les FluidosomesTM. Sur les épreuves d'immunoélectromicroscopie, une augmentation importante de la quantité de tobramycine marquée à l'or colloïdal était présente dans les bactéries traitées avec les FluidosomesTM contenant la tobramycine comparativement à la tobramycine libre (Sachetelli *et al.*, 2000). Suite à la coloration négative de *P. aeruginosa* traité avec les FluidosomesTM, des épaisissements de la paroi membranaire pouvaient être observés ainsi que la présence de FluidosomesTM adhérents à la paroi cellulaire bactérienne. Ces images suggéraient une fusion entre les FluidosomesTM et *P. aeruginosa* (Sachetelli *et al.*, 2000). Pour être en mesure de quantifier la proportion de bactéries qui fusionnent avec les FluidosomesTM, une technique de cytométrie en flux a été développée. Les FluidosomesTM étaient marquées au niveau de la membrane avec du PKH-2GL, un marqueur lipidique fluorescent. Ce marqueur ne peut être transféré via le milieu aqueux. Il a été démontré qu'après 30 minutes, 61,7% des *P. aeruginosa* 25619 (souche non-résistante) avaient interagi avec les FluidosomesTM, puisqu'ils étaient devenus fluorescents. Avec la souche résistante de *P. aeruginosa* 429, il fallait 5 heures pour atteindre un niveau de 38,60% d'interaction. Ces résultats ont démontré qu'il y avait bel et bien une interaction entre les FluidosomesTM et les bactéries et que la composition membranaire avait un effet sur le niveau d'interaction (Sachetelli *et al.*, 2000).

Les résultats de cytométrie en flux ne peuvent toutefois permettre de discerner sans équivoque entre une agglutination et un phénomène de fusion. Pour résoudre ce problème, une méthode permettant de déterminer avec certitude le taux de fusion membranaire a été utilisée. Cette méthode appelée test d'association lipidique (*lipid mixing assay*) qui est basée sur la transmission d'énergie de résonance ne peut confondre fusion et agglutination. Elle permet l'observation du transfert des phospholipides

entre les FluidosomesTM et la membrane bactérienne cible. Avec cette méthode, une simple adhérence ne peut causer de faux positifs. Les résultats obtenus ont confirmé ceux obtenus en cytométrie en flux en démontrant qu'il y avait bien et bien une fusion entre les FluidosomesTM et les bactéries (Sachetelli *et al.*, 2000). De plus, cette méthode a permis de déterminer les différents paramètres qui influencent le phénomène de fusion : le pH, la composition en cations divalents du milieu, la température et la nature lipidique des membranes (Sachetelli *et al.*, 2000). Il a été démontré que la fusion s'intensifiait avec l'augmentation de la concentration de calcium du milieu. Parmi les cations divalents testés, le fer induisait le plus haut niveau de fusion suivi par le magnésium, le calcium et le barium (Khalil *et al.*, 2001). Finalement, il a été démontré que la température avait un effet marqué sur le degré de fusion. À 4°C, il n'y avait pratiquement pas de fusion pour les deux souches testées, soit *E. coli* K12 (wt) et *P. aeruginosa* 25619. À 25 °C, il y avait une légère augmentation et à 37 °C, le taux de fusion atteignait 45% (Khalil *et al.*, 2001).

1.4.2.1 Test d'association lipidique

Cette méthode, la plus reconnue et la plus sûre pour vérifier la présence de fusion entre deux membranes, est basée sur le principe de la transmission d'énergie de résonance (Kumar *et al.*, 1982; Struck *et al.*, 1981; Nichols et Pagano, 1983; Chen *et al.*, 1999; Wilschut et Hoekstra, 1986; Garret *et al.*, 1999). Avec cette méthode, l'extinction ou plutôt transfert d'énergie de la fluorescence émise par les molécules est utilisée pour déterminer s'il y a eu un transfert entre la membrane contenant les phospholipides fluorescents et la membrane ciblée. Pour les études de l'absorption, deux marqueurs fluorescents sont incorporés dans une des deux membranes à l'étude, généralement dans les liposomes où les marqueurs peuvent être incorporés au moment de la production. Le premier marqueur (donneur) est excité par

une lumière d'une certaine longueur d'onde et utilise cette énergie pour émettre à une longueur d'onde plus élevée. Cette longueur d'émission se situe dans la région d'excitation du deuxième marqueur (accepteur). Lorsque l'accepteur reçoit l'énergie émise par le donneur, il l'utilise pour émettre à son tour à une longueur d'onde plus élevée. Lorsque les deux marqueurs sont à proximité l'un de l'autre, seulement la longueur d'onde d'émission de l'accepteur peut être détectée car la lumière émise par le donneur est immédiatement utilisée par l'accepteur. Ce phénomène ne se produit que lorsque les deux molécules sont assez près l'une de l'autre, donc en concentration assez élevée dans la membrane. (Struck *et al.*, 1981; Jones et Cossins, 1990)

Lorsqu'il y a fusion entre un liposome doublement marqué et une membrane cible, les deux molécules fluorescentes se retrouvent diluées dans cette nouvelle association de membranes et donc plus éloignées l'une de l'autre. Le phénomène d'absorption ne se produit plus. Il y a augmentation de l'émission du donneur et diminution de l'émission de l'accepteur. En observant soit la diminution ou l'augmentation de l'une ou l'autre des molécules, il est possible de déterminer le taux de fusion entre les deux membranes (Struck *et al.*, 1981). Pour s'assurer qu'il n'y a pas seulement transfert des marqueurs fluorescents entre deux membranes, ceux-ci sont attachés à un phospholipide qui s'insère dans la membrane. Il est bien connu que deux de ces molécules, le 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-PE) et le 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl) (Rh-PE) sont incapables de s'échanger en absence de fusion (Struck *et al.*, 1981).

Pour quantifier le taux de fusion, l'interaction entre les liposomes et les bactéries (ou un autre type de cellules) est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre qui émet de la lumière pour exciter le donneur, soit le NBD dans notre cas, et reçoit la lumière émise par l'accepteur, la rhodamine. Une diminution de l'émission de la rhodamine peut être observée lorsqu'il y a fusion. Pour déterminer le pourcentage de fusion, un détergent est ajouté à la fin de la réaction, ce qui a pour effet de lyser les liposomes et de maximiser la dilution des deux marqueurs tout en minimisant le transfert d'énergie de résonance (Struck *et al.*, 1981; Jones et Cossins, 1990). Cette méthode permet donc de suivre dans le temps la fusion entre les liposomes et la membrane cible.

1.5 Membranes cellulaires et fusion

Tableau I. Composition phospholipidique des membranes

	PC	PE	PI	PS	PG	SME
MDCK ^{1,2} (membrane cellulaire)	53%	27%	7%	5%		8%
<i>E. coli</i> ³ (membrane externe)		91%			9%	
<i>P. aeruginosa</i> ⁴ (membrane externe)		80%			12%	

PC Phosphatidylcholine PS phosphatidylsérine
 PE Phosphatidyléthanolamine PG Phosphatidylglycérol
 PI Phosphatidylinositol SME Sphingomyéline

¹Madin-Darby canine Kidney, cellules épithéliales de reins

²Hanssar *et al.*, 1986

³Lugtenberg et Peters, 1976

⁴Anwar *et al.*, 1983

Les études portant sur la fusion membranaire ont généralement comme but premier la compréhension des processus d'exocytose et de fusion entre les endosomes et les lysosomes (Gregoriadis, 1988). Plusieurs études ont tenté d'expliquer les mécanismes de fusion entre deux membranes phospholipidiques. Cependant, jusqu'à maintenant, peu d'hypothèse ont été démontrées complètement car peu d'expériences sont en mesure d'étudier les

structures intermédiaires qui se produisent. La réaction de fusion est très rapide et l'endroit d'initiation est très petit (White et Helenius, 1983). Malgré cela, plusieurs conditions nécessaires à la fusion ont pu être étudiées, ce qui a amené plusieurs chercheurs à postuler différents mécanismes.

Pour qu'il y ait fusion, il doit y avoir rapprochement des deux membranes et lorsque ceci se produit, il y a plusieurs forces d'attraction et de répulsion qui entrent en ligne de compte. Il y a l'attraction par les forces de Van der Waals, l'attraction ou la répulsion électrostatique dépendant des charges des membranes et la répulsion par la force d'hydratation (Wilschut et Hoekstra, 1986). Lorsque les deux membranes sont à plusieurs dizaines d'Angström (Å) l'une de l'autre, la force nette est généralement près de zéro. Lorsque les membranes sont à environ 20 à 30 Å l'une de l'autre, il existe une faible attraction de Van der Waals, ce qui permet l'agrégation des vésicules (liposomes et cellules). Cependant, lorsqu'il y a un rapprochement à moins de 20 Å, la répulsion occasionnée par la force d'hydratation augmente de façon exponentielle et la force de Van der Waals devient négligeable par rapport à cette nouvelle force (White et Helenius, 1983). Pour qu'il y ait fusion, la force de répulsion (hydratation) doit donc être éliminée (Wilschut et Hoekstra, 1986; Portis *et al.*, 1979).

La force d'hydratation est une des raisons principales qui expliquerait qu'il n'y a pas beaucoup de fusion spontanée entre les cellules ou les liposomes (White et Helenius, 1983). Cette force de répulsion est le résultat de l'hydratation de la tête des phospholipides et cette eau doit être enlevée pour qu'il y ait un contact moléculaire entre les deux membranes et que la fusion se produise (Wilschut et Hoekstra, 1986; Ohki, 1982). Il a été démontré que la fusion dépendait de la composition des liposomes et des cellules impliquées (White et Helenius, 1983). Ceci peut être expliqué en partie par le fait que

chaque type de phospholipides est hydraté de façon différente (New, 1990; Wilschut et Hoekstra, 1986; Rand, 1981; Lis *et al.*, 1982; Marra et Israelechvili, 1985). Afin de mieux comprendre le processus de fusion, la connaissance de la structure et de la composition des membranes bactériennes et épithéliales est donc essentielle.

La classification la plus courante pour les bactéries est leur caractère Gram. Cette division est basée sur la structure membranaire qui réagit différemment à la coloration Gram. La membrane des bactéries Gram négatives, comme *P. aeruginosa* et *E. coli* est très complexe et est constituée de plusieurs sections bien distinctes: la membrane interne et externe sont séparées par une région appelée espace périplasmique. De l'intérieur vers l'extérieur, on retrouve la membrane cytoplasmique qui est composée d'une bicouche de phospholipides qui contient des protéines. L'espace périplasmique contient une couche de peptidoglycane qui est associée à la membrane externe à l'aide de lipoprotéines qui s'insèrent partiellement dans la couche de phospholipides de la membrane externe. Opposée à la région hydrophobe de la couche de phospholipides de la membrane externe, il y a une couche de LPS (lipopolysaccharides) qui se situe à la surface de la cellule. La membrane externe est traversée par des protéines, quelques-unes appelées porines qui servent à l'échange entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. (Pelczar *et al.*, 1993a) Les phospholipides présents dans la membrane externe sont principalement PE et PG comme mentionné dans le tableau I. PE joue un rôle très important dans le mécanisme de fusion, décrit ultérieurement.

La structure des cellules Gram positives est beaucoup plus simple. La membrane cytoplasmique est identique aux bactéries Gram négatives. Par contre, il n'y a pas d'espace périplasmique ou de membrane externe, seulement une épaisse couche de peptidoglycane qui est attachée à la

membrane cytoplasmique à l'aide de molécules d'acide teichoïque. Il y a quelques molécules de polysaccharides qui traversent la couche de peptidoglycane. (Pelczar *et al.*, 1993a) La membrane phospholipidique des bactéries Gram positives comme *Staphylococcus aureus* est principalement composée de PG.

La composition et la structure membranaire des cellules eucaryotes humaines ressemble à la structure des liposomes. C'est une bicouche de phospholipides dans laquelle des protéines sont insérées. Certains des phospholipides présentent des modifications au niveau de la tête polaire par l'ajout de glycoside, produisant ainsi des glycolipides. (Pelczar *et al.*, 1993a) La membrane épithéliale est principalement constituée de PC et de PE. Cependant, le PE se retrouve dans le feuillet interne de la membrane cellulaire (Eastman *et al.*, 1992; Van Meer et Simons, 1986).

Comme mentionné plus haut, la déshydratation de la tête des phospholipides est une étape cruciale pour la fusion. Plusieurs molécules ont la capacité de déshydrater les phospholipides comme le PEG ou le calcium et ces molécules favorisent la fusion (Boni *et al.*, 1984; Portis *et al.*, 1979; Düzgünes *et al.*, 1981). Il a été démontré dans plusieurs systèmes que le calcium jouait un rôle très important dans la fusion de membranes phospholipidiques. Généralement, en présence de calcium, la fusion était irréversible et suite à l'agrégation des membranes, la fusion était pratiquement immédiate (Wilschut et Hoekstra, 1986). Cet effet de stimulation de fusion est plus marqué avec les membranes contenant des phospholipides chargés négativement car ceux-ci lient fortement les cations (Papahadjopoulos *et al.*, 1978; Betageri *et al.*, 1993a). Le calcium induit l'agrégation des membranes en diminuant les charges à la surface des membranes, en liant les phospholipides ensemble et en déshydratant complètement la région entre les deux membranes. Des

complexes en *trans* entre les phospholipides sur les membranes opposées sont formés par le calcium (Wilschut et Hoekstra, 1986; Portis *et al.*, 1979; Wu *et al.*, 1982). Pour toutes ces raisons, le calcium semble être un effecteur très important dans le mécanisme de fusion.

Néanmoins, la liaison entre les deux membranes n'est pas suffisante pour qu'il y ait fusion de celles-ci. Il semblerait que des facteurs de perturbation des membranes soient nécessaires pour qu'il y ait fusion complète (Papahadjopoulos *et al.*, 1978). Une de ces perturbations serait une fluctuation ou un défaut du compactage des membranes, ce qui causerait une déstabilisation de la bicouche et pourrait favoriser la fusion (Wilschut et Hoekstra, 1986; Hui *et al.*, 1981). Cette déstabilisation pourrait favoriser l'interaction hydrophobe des deux membranes pour qu'il y ait fusion (Wilschut et Hoekstra, 1986). De plus, PE pourrait être enrichi dans une des régions de la membrane, ce qui causerait une déstabilisation de la membrane phospholipidique. La molécule de PE peut former des structures autres que la bicouche, affectant la stabilité membranaire (Cullis et de Kruijff, 1979). Finalement, la température a pour effet de modifier la structure de la membrane. S'il y a une distribution hétérogène des phospholipides à la surface de la membrane, il peut y avoir des régions où les phospholipides sont sous la forme de gel ou la forme fluide, ce qui favorise la fusion selon des études publiées par les laboratoires de Ipsen et celui de Lai (Ipsen *et al.*, 1990; Lai *et al.*, 1988).

En général, le processus de fusion, comme mentionné précédemment, est très faible puisque la force de répulsion entre les deux membranes prévient le contact moléculaire (Wilschut et Hoekstra, 1986; Poste, 1980; Straubinger *et al.*, 1983; Szoka *et al.*, 1980). Notre laboratoire, pour expliquer le processus de fusion entre les Fluidosomes™ et les cellules bactériennes, a proposé le

mécanisme suivant: dans le cas des bactéries Gram négatives, les LPS de surface (chargés négativement) pourraient être réorientés par l'addition de calcium. En réorientant les LPS, la partie des polysaccharides pourrait être couchée et le lipide A serait donc exposé. Le calcium pourrait alors favoriser l'interaction rapprochée des FluidosomesTM avec les bactéries en liant les lipides des membranes opposées. Par la suite, la charge de répulsion serait neutralisée et le calcium pourrait aider la déshydratation de la tête de la molécule de PE, présent en grande quantité à la surface de la bactérie. Cette déshydratation favoriserait un rapprochement et causerait une réorientation des chaînes de PE qui induit un défaut dans la membrane et possiblement l'initiation du processus de fusion des membranes (Khalil *et al.*, 2001). De plus, les LPS ont aussi été décrits comme inducteurs de fusion (Boshoff *et al.*, 1992). Pour ce qui est des bactéries Gram positives, un mécanisme de fusion n'a pas été proposé et plusieurs expériences restent à être accomplies pour clarifier le processus.

Dans le cas des cellules épithéliales, elles ne contiennent pas beaucoup de PE exposé à la surface de la cellule, mais principalement du PC (Eastman *et al.*, 1992). Il a été démontré que le PC était inhibiteur de la fusion (Hui *et al.*, 1981; Cullis et de Kruijff, 1979). La fusion entre les FluidosomesTM et les cellules épithéliales est donc peu probable. De plus, le fait que les FluidosomesTM, composés principalement de PC, ne fusionnent pas entre eux supporte l'hypothèse que le PC n'agit pas comme un élément favorisant la fusion.

1.6 Objectifs du présent travail de recherche

Des travaux réalisés par plusieurs membres de notre équipe ont démontré que les FluidosomesTM ont la capacité de fusionner avec la paroi des cellules

bactériennes ce qui permet à la substance encapsulée de pénétrer plus efficacement dans le cytoplasme de la cellule et d'augmenter ainsi son efficacité, qu'il s'agisse d'antibiotiques ou d'oligonucléotides antisens. Compte tenu de l'importance de ce phénomène au point de vue médical et des possibilités de dérapage si les Fluidosomes™ pouvaient réagir également avec les cellules tapissant les voies respiratoires, il était important de vérifier si ces derniers pouvaient fusionner avec les cellules épithéliales de mammifères.

Le but premier de ce travail était donc de vérifier la toxicité potentielle des Fluidosomes™ vis-à-vis des cellules épithéliales humaines. Le paramètre mesuré dans cette étude était la capacité de fusion des Fluidosomes™ avec les cellules épithéliales comparativement à celle observée avec les cellules bactériennes. Pour réaliser cette étude, des tests d'association lipidique basés sur le transfert d'énergie par résonance entre un donneur et un accepteur ont été utilisés. En fait, des liposomes dont la membrane contient deux marqueurs fluorescents sont mis en contact avec des cellules non marquées. Lorsque les liposomes marqués fusionnent avec les membranes des cellules non marquées, il se produit une dilution de la concentration totale des deux marqueurs fluorescents dans la membrane fusionnée, ce qui résulte en une diminution de l'absorption de fluorescence (*quenching*), donc en une augmentation de la fluorescence d'un marqueur au détriment du second. Ces tests, contrairement à ceux effectués en cytométrie, permettent de discriminer de façon sûre entre un phénomène d'agglutination et un phénomène de fusion. Comme les Fluidosomes™ sont administrés directement dans les voies respiratoires, l'étude a été réalisée sur une lignée de cellules épithéliales de poumons d'un embryon humain transformées par le virus SV-40. Les bactéries *P. aeruginosa* et *E. coli* ont été utilisées à titre de contrôles positifs.

Les objectifs spécifiques de l'étude étaient de: 1) vérifier si les Fluidosomes™ fusionnent avec les cellules épithéliales; 2) déterminer le pourcentage de fusion, en fonction du temps et de la température à 4°C et à 37°C, entre les Fluidosomes™ et les cellules épithéliales pulmonaires humaines, les bactéries *P. aeruginosa* et *E. coli* servant de contrôles positifs; 3) établir les caractéristiques fusogéniques des liposomes à l'aide d'une étude cinétique, basée sur l'élévation continue de la température entre 4 et 37°C et finalement 4) encapsuler des molécules d'ADN dans les Fluidosomes™.

CHAPITRE 2 – Article

Differential Behaviour of Fluid Liposomes Toward Mammalian Epithelial Cells and Bacteria: Restriction of Fusion to Bacteria

Accepté pour publication dans la revue
Journal of drug targeting

Editor-in-Chief: Dr. V.H.L. Lee

Differential Behaviour of Fluid Liposomes Toward Mammalian Epithelial Cells and Bacteria: Restriction of Fusion to Bacteria

Desjardins, A.¹, Chen, T.², Khalil, H.¹, Sayasith, K.¹ and Lagacé, J.^{1*}

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

²Theralipids Inc., 6100 Royalmount Avenue, Montréal, Québec, Canada, H4P 2R2

Running title: Fluid Liposomes–Membrane Interactions

*Corresponding author:

Jacqueline Lagacé, Tel.: (514) 343-2180, Fax: (514) 343-6358,

E-mail: jacqueline.lagace@umontreal.ca

Number of pages: 27

Number of figures: 4

ABSTRACT

Previous work demonstrated that fluid liposomes developed in our laboratory are able to fuse with bacterial outer membranes. This fusion improved the penetration and activity of liposome-encapsulated antibiotics and antisense oligonucleotides into the bacterial cells. Because it is anticipated that fluid liposome encapsulated antibiotics will be administered by aerosols to patients with chronic pulmonary infections or cystic fibrosis (CF), we conducted comparative studies in *E. coli*, *P. aeruginosa* and human lung epithelial cells using lipid-mixing assays to investigate the possibility that fluid liposomes might fuse with surrounding epithelial cells. After a 2 h incubation at 4 and 37°C, no fusion between fluid liposomes and human lung epithelial cells was observed, whereas mean levels of 71% and 37% of fusion were observed at 37°C with *E. coli* and *P. aeruginosa* cells, respectively. No fusion was observed at 4°C in any cells. A kinetic study where temperature was gradually increased from 7 to 37°C indicated that the fusion process in the two bacteria starts between 28 and 31°C with a mean fusion rate of 0.60%/min at 31°C to reach 1.18%/min at 37°C. The present work suggests that it is unlikely that fluid liposomes fuse with host cells lining the human respiratory tract and further elucidates the fusogenic properties of fluid liposomes with respect to prokaryotes and eukaryotes.

Keywords: Bacteria, Cystic fibrosis, Fusion, Lipid-mixing assay, Liposome.

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is one of the most severe inherited genetic disorders and affects 1 in 2000 to 4500 children of Caucasian origin (Koch and Hoiby, 1993; Hilman, 1997; Sferra and Collins, 1993). The defect occurs in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), which causes defective chloride ion absorption and secretion in epithelial cells. This results in dehydration of the pulmonary secretions and decreased mucocilliary clearance of the lungs (Denton and Wilcox, 1997). Patients with CF frequently suffer from chronic infection in the lower respiratory tract caused by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Wolter and McCormack, 1998; Wilson and Dowling, 1998). Once the infection is established in the lungs of CF patients, it is very difficult to eradicate (Denton and Wilcox, 1997; MacLeod et al., 2000) and leads to the progressive deterioration of the lungs and premature death (Donati *et al.*, 1987; Koch and Hoiby, 1993; Wilson and Dowling, 1998; Hoiby, 1977; Willmott et al., 1985; Wood et al., 1976).

The multidrug resistance seen in *P. aeruginosa* is due to drug efflux pumps which work in synergy with the highly impermeable outer membrane (Li *et al.*, 1995; Hancock, 1998; Nikaido, 1998). To increase the penetration of antibiotics, fluid liposomes were developed to enhance drug delivery through bacterial membranes. These negatively-charged liposomal formulations (which do not contain cholesterol) are made by combining dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dimiristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) phospholipids (at a molar ratio of 5:1 to 18:1) to confer a low gel-liquid crystalline transition temperature (T_C) $\leq 37^\circ\text{C}$ (Beaulac et al., 1996; Beaulac et al., 1997). Differential scanning calorimetry (DSC) studies performed using a 10:1 molar ratio of the DPPC/DMPG formulation showed the rise of a first peak beginning at 29.5°C and a more narrow second peak rising at about 37°C (Beaulac, 1995). Previous spectrophotometric and light-scattering studies (US Pharmacopeia) to evaluate the size distribution of the fluid liposomes showed that 80% of the vesicles had a diameter between 200 and 400 nm as determined by a 90

Plus Particle Size Analyser s/n 11191 (Brookhaven Instruments Corporation, NY) (unpublished data). Fluid liposome-encapsulated antibiotics can be directly administered in the pulmonary tract (Beaulac et al., 1996; Beaulac et al., 1999). The direct in situ administration enables delivery of an elevated dose of the drug to the site of infection while it avoids unwanted systemic exposure. Thus, adverse effects and toxicity associated with potent antibiotics like aminoglycosides can be reduced. Tobramycin encapsulated in the fluid liposomal formulation was used successfully to eradicate mucoid *P. aeruginosa* in an animal model of chronic pulmonary infection (Beaulac et al., 1996). These liposomes also showed increased bactericidal efficacy, in vitro, against other related and unrelated bacteria (Beaulac et al., 1998). Fluid liposomes can also be used to deliver specific antisense oligonucleotides into bacteria to inhibit gene inhibition (Fillion et al., 2001). The enhanced bactericidal activity of encapsulated drug in fluid liposomes is mediated by fusion events occurring between the liposomes and the bacterial membranes (Sachetelli et al., 2000).

Because it is anticipated that fluid liposome-encapsulated drugs will eventually be administered by aerosol to patients, it is imperative to test whether the fusion process observed with bacteria can also occur with human lung epithelial cells with possible deleterious effects for host cells. Using a well-characterised lipid-mixing assay conducted at 4 and 37°C, we tested the ability of fluid liposomes to fuse with epithelial cells and compared that to the ability of the liposomes to fuse with bacteria under the same conditions. A kinetic study was also performed to determine the precise temperature at which the fusion process began and to obtain more information about the rate of fusion as a function of temperature.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

Pseudomonas aeruginosa ATCC 25619 (American Type Culture Collection [ATCC], Rockville, MD) and *E. coli* wt (Gift from Dr. Hallenbeck, University of Montreal) were used in this study. The bacteria were stored at -70°C in brain heart infusion broth supplemented with 10% glycerol. An overnight broth culture inoculated with a single colony from a proteose peptone #2 (Difco) agar plate was used. All lipid-mixing assays were also performed in proteose peptone #2 broth. Evaluations of the cell sizes were performed using Polybead polystyrene microspheres (Polyscience Inc., WA).

Cell Culture

The WI-38 VA13 subline 2RA # CCL-75.1 (ATCC, Rockville, MD), a human embryonic lung epithelial cell line transformed with SV-40 was used throughout the study. Embryo-derived cells transformed with SV-40 have a lower membrane structure modification than their tumor-derived counterparts (Cooper, 1995). The cells were stored at -150°C in Eagle minimal essential medium (MEM) (Gibco BRL, Burlington, ON) supplemented with 8% foetal bovine serum (FBS) and 5% dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON). The cells were grown in MEM supplemented with sodium pyruvate and 8% FBS at 37°C, 5% CO₂. The cells were passed every 3 to 4 days by trypsination (0.25%) and restarted at a concentration of 10⁵ cells /ml. For the lipid-mixing assays, the cells were trypsinated, diluted in MEM with 8% FBS, centrifuged, and resuspended in proteose peptone #2 to obtain a final OD₆₆₀ of 0.2.

Fluid Liposomes

Fluid liposomes were composed of DPPC and DMPG (Avanti polar lipids, Alabaster, AL) at a ratio of 9:1 (mol/mol). The liposomes were negatively charged and had an overall low $T_c \leq 37^\circ\text{C}$. They were prepared by a hydration–extrusion method as previously described (Beaulac et al., 1996; Sachtelli et al., 2000). Appropriate amounts of lipid mixtures were dissolved with an organic solvent composed of methanol/chloroform (1:2). The vesicles used in the lipid-mixing assay contained a quenched mixture of fluorescent phospholipids, NBD-PE (N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole-4-yl)-phosphatidylethanolamine), and rhodamine-PE-(N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)-phosphatidylethanolamine), each included as 0.5 mol% of the total phospholipids during preparation of the vesicles as previously described (Sachtelli et al., 2000). The solvents were evaporated under nitrogen stream with a warm water bath until a homogeneous lipid film was produced. The resulting film was dried overnight under vacuum, hydrated with a balanced salt buffer (25 mM HEPES and 150 mM NaCl, pH 7.4) by vigorous mixing, and followed by freeze–thaw 5 times (frozen with dry-ice acetone, thawed in 65°C water). The preparation was then extruded 10 times at 65°C through 2 stacked $0.4\ \mu\text{m}$ polycarbonate filters (Nucleopore), using an extrusion device (Lipex Biomembranes, Inc., Vancouver, BC, Canada).

Fusion

Fusion of liposomes with either bacterial or epithelial cells was determined by the lipid-mixing assay (Struck et al., 1981). This assay is based on the use of two headgroup-labelled phospholipids: Rh-PE and NBD-PE, incorporated into the liposomal membrane as described above. Fusion of fluorescent vesicles to nonfluorescent vesicles or cells reduces concentrations of both NBD-PE and rhodamine-PE in the combined bilayers, which results in dilution of the fluorescent lipid in bulk phospholipid. This in turn results in lower resonance energy transfer

(RET), as a decrease in quenching and a consequent increase in NBD fluorescence at 520 nm, and a decrease in rhodamine fluorescence at 590 nm. RET has been observed only when fusion occurs and not as a consequence of lipid exchange or agglutination (Struck et al., 1981; Kumar et al., 1982; Nichols and Pagano, 1983; Chen et al., 1999; Wilschut and Hoekstra, 1986). All fluorescence measurements were carried out with a Perkin-Elmer LS-50B fluorescence spectrofluorometer equipped with a HAAKE C1 bath to control the temperature. To provide an internal standard for normalised comparison of different fusion reactions, and for the measurement of absolute efficiency, SDS 0.15% was added at the end of the experiment to dissolve the vesicles and maximally dequench the fluorescence of the labelled phospholipids. Fusion can be quantified by monitoring rhodamine emission at 590 nm, using the equation mentioned below. This equation uses the minimal rhodamine emission, which is obtained after completely lysing the liposomes with detergent to maximise dilution of the two fluorochromes (Struck et al., 1981). Of note, the intrinsic fluorescence of *P. aeruginosa* (emission approximately 520 nm) does not confound rhodamine fluorescence readings.

Fresh cultures were started from the overnight cultures and grown to mid-log phase ($OD_{660} = 0.6$). Once the bacterial growth had reached the desired OD, the suspensions were diluted to an OD_{660} of 0.2 with proteose peptone #2. Epithelial cells were prepared by trypsination of the confluent cell layer. The trypsin was inactivated with MEM containing 8% FBS. The cells were centrifuged and the pellet resuspended in proteose peptone #2 to obtain a final OD_{660} of 0.2. This OD value corresponded to 1.5×10^6 epithelial cells/1.95 ml; their mean size was $5 \mu\text{m} \times 7 \mu\text{m}$ for a total cell surface of $2.24 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ [$(\pi \times \text{Diam.} \times \text{Length}) + (\pi \times \text{Diam.}^2 \div 2)$] (Spiegel, 1974). The same OD_{660} of 0.2 corresponded to 1.27×10^8 cells/1.95 ml for *E. coli* wt (mean size of $0.20 \mu\text{m} \times 0.37 \mu\text{m}$) for a total cell surface of $3.78 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ and to 3.27×10^8 cells/1.95 ml for *P. aeruginosa* 25619 (mean size of $0.5 \mu\text{m} \times 1.75 \mu\text{m}$) for a total cell surface of $1.02 \times 10^9 \mu\text{m}^2$. For spectrofluorometry, 1.95 ml of either bacteria or WI-38 VA13 2RA ($O.D._{660}$ 0.2) was placed in a quartz cuvette containing

a stirring bar to ensure constant agitation. The liposomes prepared as described previously were diluted in proteose peptone #2 to a final phospholipid concentration of 800 µg/ml. After 1 min of reading, 50 µl of these diluted liposomes was added to the 1.95 ml of bacteria or epithelial cells for a final concentration of 20 µg/ml of phospholipids. The fluorescence was monitored for rhodamine emission at 590 nm. At the end of the reaction, 30 µl of SDS 10% was added to the mixture of bacteria or epithelial cells and liposomes. The detergent was left for 5 min to lyse the liposomes and obtain the minimal rhodamine fluorescence, maximal lipid-probe dilution, and minimal RET. The temperature of the experiments was adjusted using a HAAKE C1 bath.

The fusion percentage was calculated using the final fluorescence (F_{\max}) obtained after addition of detergent. A 7-min preincubation followed the addition of the liposomes to cells then the initial fluorescence (F_0) was recorded. An artefact resulting from the temperature shift during the preincubation period invariably occurred, as has been previously observed (Chapman et al., 1995) and was present in all experimental samples including the negative controls. The fluorescence obtained at a given time is expressed as F_t beginning at F_0 . The percent of fusion was determined by the following equation:

$$\text{Percent of Fusion} = \frac{F_t - F_0}{F_{\max} - F_0} \times 100$$

Experiments performed at 4°C were done in duplicate and all other experiments were performed in triplicate.

Kinetic Study: Increasing Temperature during Fusion Time-Drive

A kinetic study using the lipid-mixing method to determine the precise temperature of fusion initiation and to obtain more information about the progress of fusion as a function of temperature was performed. Briefly, the reaction was started at 7°C after a 7- min incubation and the temperature was increased by 3°C increments for 7-min intervals until reaching 7 min after the incubation period at 37°C. The reaction was stopped using 30 µl SDS 10% and left to rest for 5 min.

RESULTS

Production of fluid liposomes and RET measurement

In preliminary studies, a 0.5 % (molar) incorporation of the two fluorochromes Rh-PE and NBD-PE into the liposomal membrane was deemed suitable for our purposes. In general, the initial fluorescence fell between 250 and 500 fluorescence units. The increase of rhodamine fluorescence due to NBD emission quenching was determined by emission scans of the fluid liposomes alone in absence of fusion (Data not shown).

Fusion measured by lipid-mixing: monitoring and quantification of RET

The lipid-mixing assay based on RET was selected for this study because it gives a reliable measurement of membrane fusion. The changes in fluorescence are directly related to the distance between NBD and Rh which are incorporated into the liposome membrane, and do not result from vesicular aggregation or lipid exchange (Struck et al., 1981; Kumar et al., 1982; Nichols and Pagano, 1983). This assay has been widely accepted as an efficient method to measure membrane fusion (Chen et al., 1999; Hoekstra *et al.*, 1984; Nickel et al., 1999; Wilschut and Hoekstra, 1986). In preliminary experiments, a mixture of NBD-PE/Rh-PE labelled and unlabeled

liposomes showed no increases in NBD or decreases in Rh fluorescence indicating that the liposomes did not fuse together (Data not shown).

Fig. 1 illustrates the hallmark time-driven decrease in rhodamine fluorescence that occurs during fusion of liposomes at 37°C with *P. aeruginosa* and *E. coli*, compared with the stable rhodamine fluorescence intensity in the epithelial cells obtained up until addition of SDS at 120 min. The unchanging fluorescence intensity indicates the absence of RET and hence the absence of fusion between epithelial cells and liposomes. The percentages of fusion for the 3 types of cells at 37°C, recorded at 5-min intervals for up to 120 min, are seen in Fig. 2. Differences start 15 min after the onset of the reactions and continue to rise for the bacteria attaining $71.2 \pm 0.9\%$ and $38.8 \pm 0.6\%$ after 120 min for *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively. For epithelial cells, a constant percentage of fusion of about 9% was observed for the duration of the assay (Fig. 2). The 7- min preincubation period was not considered in the calculation of fluorescence due to the drop in intrinsic fluorescence that invariably occurred as a result of the temperature shift following the start of incubation as demonstrated by its presence in controls with liposomes alone.

Effect of temperature on the fusion process between liposomes and cell preparations of *E. coli*, *P. aeruginosa* and epithelial cells (WI-38 VA13 2RA)

To validate the results, simultaneous lipid-mixing assays were performed at 4°C and 37°C. Fig. 3 shows the results of fusion between liposomes and bacteria or epithelial cells obtained after 30, 60, 90, and 120 min incubation at both temperatures tested. Liposomes incubated with bacteria at 4°C produced very low levels of fusion ($\leq 5\%$) at all incubation periods, whereas the level of fusion increased as a function of time at 37°C (Fig. 3). For the epithelial cells, the percentage of fusion with liposomes following the 30-120 min incubation periods was inferior to 10% at both 4°C and at 37°C (Fig. 3).

Kinetic study: resonance energy transfer in relation with the initiation and the progress of fusion in function of the temperature.

The objective of this kinetic study was to determine the temperature range that corresponds to the initiation and to the progress of the fusion process. The reaction was started at 7°C and the temperature was increased by 3°C increments for 7-min intervals, then for 7 min after attaining 37°C. At 25°C and less, comparable low rates of fusion (0.18%/min and 0.20%/min for *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively) were observed in the bacteria. Between 28 and 31°C, a marked increase in the rate of fusion was observed for both bacteria (0.39 and 0.66%/min and 0.25 and 0.56%/min, for *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively) but the mean increase was 43% greater for *E. coli* (Fig. 4). At 37°C, the fusion rates reached $1.26 \pm 0.14\%/min$. for *E. coli* and $1.14 \pm 0.15\%/min$. for *P. aeruginosa*.

DISCUSSION

Fluid liposome-encapsulated tobramycin made of DPPC/DMPG can fuse with bacteria (Sachetelli *et al.*, 2000) and increase the bactericidal effect of encapsulated antibiotics (Beaulac *et al.*, 1996; Beaulac *et al.*, 1998). We think that encapsulating antibiotics in fluid liposomes will provide a valuable new tool in the treatment of difficult- to-treat pulmonary infections such as those associated with CF infections. This idea is based on the successful eradication through liposome-delivery of antibiotics of chronic pulmonary infections caused by a mucoid strain of *P. aeruginosa* (Beaulac *et al.*, 1996). Moreover, the efficacy of fluid liposome-encapsulated aminoglycosides was recently supported by an independent group (Schiffelers, *et al.*, 2001). In an animal model, the authors demonstrated that fluid liposome-encapsulated aminoglycoside delivers much more protective and bactericidal action than do free or rigid liposome-encapsulated antibiotics. In their fluid liposomes, cholesterol was omitted and the partially hydrogenated egg phosphatidylcholine (PHEPC) phospholipid was replaced with the egg phosphatidyl (EPC), a phospholipid with a lower degree of hydrogenation that forms less rigid

bilayers. In early studies conducted on the safety of fluid liposomes, it was demonstrated that liposomes containing tobramycin do not induce mucosal and serum immune responses against liposomes or tobramycin following repeated intraperitoneal and intratracheal immunizations of BALB/c mice (Sachetelli et al., 1999). In view of the likelihood of use of fluid liposomes in patients, it was important to investigate whether these liposomes could interact with eucaryotic cells in the same way they interacted with bacterial cells, as this could limit their therapeutic potential. In the present study, human lung epithelial cells were selected because the liposomal-tobramycin aerosol formulation would be administered via the pulmonary tract of patients. The results demonstrate that when lipid-mixing assays were performed at 37°C for two hours, both *E. coli* wt and *P. aeruginosa* 25619 fused with the liposomes at mean levels of 71% and 37%, respectively, whereas only a low fusion value of less than 10% (corresponding to the background) was observed for WI-38 VA13 2RA cells. As seen in Fig. 2, the fusion process is ascendant for both *E. coli* and *P. aeruginosa* cells, but in the epithelial cells, a plateau is observed very soon after the beginning of the assay. Moreover, the low level of fusion in the epithelial cells at 37°C is not significant as the results were comparable at 4°C (Fig. 3), a temperature at which fusion does not occur (as demonstrated with *E. coli* and *P. aeruginosa* after a 2 h incubation). The total surface area of the epithelial cells ($2.24 \times 10^8 \mu\text{m}^2$) cannot explain the differences observed in fusion rates as *E. coli* had the highest rate of fusion, but the lowest total cell surface area ($3.78 \times 10^7 \mu\text{m}^2$). The results clearly show that fluid liposomes do not fuse with epithelial cells and that the low fusion level observed can be attributed to the background signal. The relative incapacity of fluid liposomes to fuse with epithelial cells (as compared to bacteria) can only be explained by the differences in cell membrane composition as all other parameters of the assay were the same. The phospholipid content of the bacterial outer membrane is composed of 91% of phosphatidylethanolamine (PE) and 9% of phosphatidylglycerol (PG) for *E. coli* (Lugtenberg and Peters, 1976) and 80% of PE and 12% of PG for *P. aeruginosa* (Anwar et al., 1983). The phospholipid membrane composition of epithelial cells, however, is quite different (van Meer and Simons,

1986). For example, MDCK cells (Madin-Darby canine kidney cells), a well-defined epithelial cell line, consists of 53% phosphatidylcholine (PC), 27% PE, 7% of phosphatidylinositol (PI), and 8% sphingomyelin (SME) (Hansson et al., 1986). Another epithelial cell line has a similar composition (Van Meer and Simons, 1986). Moreover, the PE membrane composition of epithelial cells is mainly concentrated in the inner leaflet of the membrane; therefore, PC is the major phospholipid of the outer leaflet (Eastman et al., 1992). The distribution of PE in the inner or the outer cellular membrane is of interest as it is known to be fusogenic, acting to destabilise the membrane—a major step in the fusion process (Düzgünes *et al.*, 1981; Sundler et al., 1981; Fujii, 1999). If we recall that the cellular outer leaflet is directly exposed to molecules, (including liposomes) of the extracellular environment, the presence of a high level of PE in the outer leaflet could explain the different results obtained with bacteria and epithelial cells. The absence of fusion between the epithelial cells and the liposomes can be further explained by the fact that PC might have an inhibitory effect on the fusion process (Hui et al., 1981; Cullis et de Kruijff, 1979). The instability of fluid liposomes at 37°C also plays an important role in the fusion process in the bacteria as no fusion was observed following the addition of 10% cholesterol to the liposomal formulation (unpublished data). Finally, the importance of the role of PE in the cellular outer membrane in the fusion process is also indirectly supported by the fact that fluid liposomes made of DPPC/ DMPG do not fuse together as demonstrated in the present work.

The kinetic study depicted in Fig. 4 shows that the fusion process is in a marked ascendant phase at 31°C after a break at 25°C; also, the increased rate of fusion at 28-31°C was greater for *E. coli* (0.39 and 0.66%/min) than for *P. aeruginosa* (0.25 and 0.56%/min.). This result and the rates of fusion observed in Fig. 2 appear to reflect the ratio of the fusogenic PE contained in the outer membranes of the two bacteria: PE constitutes 91% of the *E. coli* outer membrane comparatively to 80% for *P. aeruginosa*. At the end of the kinetic study, the mean rate of fusion of liposomes with bacteria at 37°C reached about 6 times the mean rate of fusion previously

observed between 7 and 25°C. In the present kinetic study, the beginning of the ascendant phase of fusion observed between 28-31°C corresponds to the DSC profile study previously performed with the liposomal formulation DPPC/DMPG at a molar ratio of 10:1 (Beaulac, 1995). Indeed, in this study, the destabilisation of the liposomal membranes that appeared as a nascent peak from 29.5°C is in accordance with the sudden increase of the rate of fusion at 28-31°C. It is well known that the destabilisation of the liposomal membrane is an essential step in the fusion process (Düzgünes et al., 1981; Sundler et al., 1981; Fujii, 1999).

In conclusion, the present work helps to further elucidate the fusion process of fluid liposomes with mammalian and bacterial cells. The thermodynamic destabilisation of vesicles at 37°C along with the presence of a high level of the fusogenic phospholipid PE in the outer membrane of cells acting as companion of fusion seem to be prerequisites for fusion to occur. This hypothesis is supported by the fact that fluid liposomes cannot fuse with epithelial cells whose outer membranes contain very low levels of PE. The demonstration that fluid liposomes do not fuse with human lung epithelial cells is a very promising step towards the use of liposome-encapsulated antibiotics to treat chronic pulmonary infections in CF and non-CF patients. Moreover, the affinity of fluid liposomes for the bacteria obviates the need for specific targeting. This would avoid the targeting of liposomes with antibodies, a procedure that can stimulate the immune system and induce their inactivation (Clark, 2000). In CF patients, a further stimulation of the immune system in the lungs by a protein target could be harmful since the main cause of lung function degeneration includes the over-stimulation of inflammatory mediators involved in an uncontrolled immune response (Mathee et al., 1999).

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a grant from Theralipids Inc.

REFERENCES

- Anwar, H., Brown, M.R.W., Cozens, R.M. et Lambert, P.A. (1983) Isolation and characterisation of the outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas cepacia*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 499-507.
- Beaulac, C. Elaboration et évaluation de chémoliposomes à action bactéricide anti-*Pseudomonas aeruginosa* chez un modèle animal d'infection chronique. Mémoire de Maîtrise, UQTR, 1995.
- Beaulac, C., Clément-Major, S., Hawari, J. and Lagacé, J. (1996) Eradication of Mucoïd *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. and Lagacé, J. (1997) *In vitro* kinetics of drug release and pulmonary retention of microencapsulated antibiotics in liposomal formulations in relation to the lipid composition. *J. Microencap.*, **14**, 335-348.
- Beaulac, C., Sachetelli, S. and Lagacé, J. (1998) *In vitro* bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, **41**, 35-41.
- Beaulac, C., Sachetelli, S., Lagacé, J. (1999) Aerosolization of low phase transition temperature liposomal tobramycin as dry powder in an animal model of chronic pulmonary infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Drug Targeting*, **7**, 33-41.
- Chapman, C.F., Liu, Y., Sonek, G.J., Tromberg, B.J. (1995) The use of exogenous fluorescent probes for temperature measurements in single living cells. *Photochem. Photobiol.*, **62**, 416-425.
- Chen, T., Choi, L.S., Einstein, S., Klippenstein, M.A., Scherrer, P. and Cullis, P.R. (1999) Proton-induced permeability and fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly(2-ethylacrylic acid). *J. Liposomes Res.*, **9**, 387-405.
- Clark, M. (2000) Antibody humanization: a case of the "Emperor's new clothes"? *Immunol. Today*, **21**, 397-402.
- Cooper, G.M. (1995). The cancer cell. In Burns, J.E. (ed.) *Oncogenes* (Sudbury: Jones and Bartlett Publishers) pp.3-16.
- Cullis, P.R. and de Kruijff, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta.*, **559**, 399-420.
- Denton, M. and Wilcox, H. (1997) Antimicrobial treatment of pulmonary colonization

and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**, 468-474.

Donati, M.A., Guenette, G. and Auerbach, H. (1987) Prospective controlled study of home and hospital therapy of cystic fibrosis pulmonary disease. *J. Paediatr.*, **111**, 28-33.

Düzgünes, N., Wilschut, J., Fraley, R. et Papahajopoulos, D. (1981) Studies on the mechanism of membrane fusion. Role of head-group composition in calcium- and magnesium-induced fusion of mixed phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **642**, 182-195.

Eastman, S.J., Hope, M.J., Wong, K.F., Cullis, P.R. (1992) Influence of phospholipid asymmetry on fusion between large unilamellar vesicles. *Biochem.*, **31**, 4262-4268.

Fillion, P., Desjardins, A., Sayasith, K., and Lagacé J. (2001) Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated antisense oligonucleotides. *Biochim. Biophys. Acta*, **1515**, 44-54.

Fujii, G. (1999) To fuse or not to fuse: the effects of electrostatic interactions, hydrophobic forces, and structural amphiphilicity on protein-mediated membrane destabilization. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **38**, 257-277.

Hancock, R.E. (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis.*, **27**, S93-S99.

Hansson G.C., Simons, K. et van Meer, G. (1986) Two strains of Madin Darby canine kidney (MDCK) cell line have distinct glycopospholipid compositions. *The EMBO J.*, **5**, 483-489.

Hilman, B.C. (1997) Genetic and immunologic aspects of cystic fibrosis. *Ann. Allergy Immunol.*, **79**, 379-390.

Hoekstra, D., de Boer, T. Klappe, K., Wilschut, J. (1984) Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochem.*, **23**, 5675-5681.

Hoiby, N. (1977) *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. C*, **262**, 1-96.

Hui, S.W., Stewart, T.P., Boni, L.T. et Yeagle, P.L. (1981) Membrane fusion through point defects in bilayers. *Science*, **212**, 921-923.

Koch, C. and Hoiby, N. (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*, **341**, 1065-1069.

- Kumar, N., Blumenthal, R., Henkart, M., Weinstein, J.N. and Klausner, R.D. (1982) Aggregation and calcium-induced fusion of phosphatidylcholine vesicle-tubulin complexes. *J. Biol. Chem.*, **257**, 15137-15144.
- 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.
- Lugtenberg, B and Peters, R. (1976) Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta*. **441**, 38-47.
- MacLeod, D.L., Nelson, L.E., Shawar, R.M., Lin, B.B., Lockwood, L.G., Dirks, J.E., Miller, G.H., Burns, J.L. and Garber, R.L. (2000) Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J. Infect. Dis.*, **181**, 1180-4.
- Nichols, J.W. and Pagano R.E (1983) Resonance energy transfer assay of protein-mediated lipid transfer between vesicles. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5368-5371.
- Nickel, W., Weber, T., McNew, J.A., Parlati, F., Sollner, T.H., Rothman, J.E. (1999) Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNAREs and t-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 12571-12576.
- Nikaido, H. (1998) Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**, 516-523.
- Sachetelli, S., Beaulac, C., Riffon, R. and Lagacé, J. (1999) Evaluation of the pulmonary and systemic immunogenicity of Fluidosomes, a fluid liposomal-tobramycin formulation for the treatment of chronic infections in lungs. *Biochim. Biophys. Acta*, **1428**, 334-340.
- Sachetelli, S., Khalil, H., Chen. T., Beaulac, C., Sénéchal, S. and Lagacé, J. (2000) Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1463**, 254-266.
- Schiffelers, R.M., Storm, G., ten Kate, M.T., Bakker-Woudenberg, I.A.J.M. (2001) Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated gentamicin in rat *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in relation to impaired host defense and low bacterial susceptibility to gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 464-470.
- Sferra, T.J. and Collins, F.S. (1993) The molecular biology of cystic fibrosis. *Ann. Rev. Med.*, **8**, 3-7.
- Spiegel, M.R. (1974) *Mathematical book of formulas and Tables*. McGraw Hill.
- Struck, D.K., Hoekstra, D. and Pagano, R.E. (1981) Use of resonance energy transfer to

monitor membrane fusion. *Biochemistry*, **20**, 4093-4099.

Sundler, R., Düzgünes, N. et Papahadjopoulos, D. (1981) Control of membrane fusion by phospholipid head groups. II. The role of phosphatidylethanolamine in mixtures with phosphatidate and phosphatidylinositol. *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 751-758.

van Meer, G. et Simons, K. (1986) The function of tight junction in maintaining differences in lipid composition between the apical and basolateral cell surface domains of MDCK cells. *The EMBO J.*, **5**, 1455-1464.

Willmott, R.W., Tyson, S.L. and Matthews, D.J. (1985) Cystic fibrosis survival rates. The influence of allergy and *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Dis. Child.*, **39**, 669-671.

Wilschut, J. and Hoekstra, D. (1986) Membrane fusion: lipid vesicles as a model system. *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 145-66.

Wilson, R. and Dowling, R.B. (1998) *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax*, **53**, 213-219.

Wolter, J.M. and McCormack, J.G. (1998) The effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to cystic fibrosis (CF) and non-CF-affected tracheal epithelial cells. *J. Infect.*, **37**, 217-223.

Wood, R.E., Boat, T.F. and Doershuk, C.F. (1976) Cystic fibrosis. *Am. Rev. Respr. Dis.*, **113**, 833-878.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Fusion of liposomes with bacteria or epithelial cells at 37°C as expressed by resonance energy transfer (RET) measurements by monitoring rhodamine fluorescence emission (590 nm) excited by the transferred emission of NBD. Liposomes were added after the first min of reading. The initial fluorescence (F_0) was obtained after a 7-min preincubation period after the addition of liposomes to the cells. When the desired time of reading was reached, 30 μ l of SDS 10% was added to lyse the liposomes and obtain the minimal rhodamine emission and the maximum probe dilution. Here, F_t corresponds to fluorescence value at 125 min and F_{max} corresponds to the value observed 5 min after the addition of SDS 10%.

Figure 2. Percentage of liposome fusion with either bacteria (*E. coli* wt and *P. aeruginosa* 25619) or epithelial cells (WI-38 VA13 2RA) at 37°C. Percentages were calculated using the RET equation. The experiments were done in triplicate. Error bars represent the standard deviation.

Figure 3. Values of fusion between liposomes and bacterial or epithelial cells at 4°C and 37°C after 30, 60, 90 and 120 minutes of reaction. Percentages were calculated using the RET equation. The experiments were done in triplicates for 37°C and in duplicate for 4°C reactions.

Figure 4. Kinetic study of fusion of fluid liposomes with *E. coli* and *P. aeruginosa* at different temperature ranges. The rate of fusion is expressed in %/min.

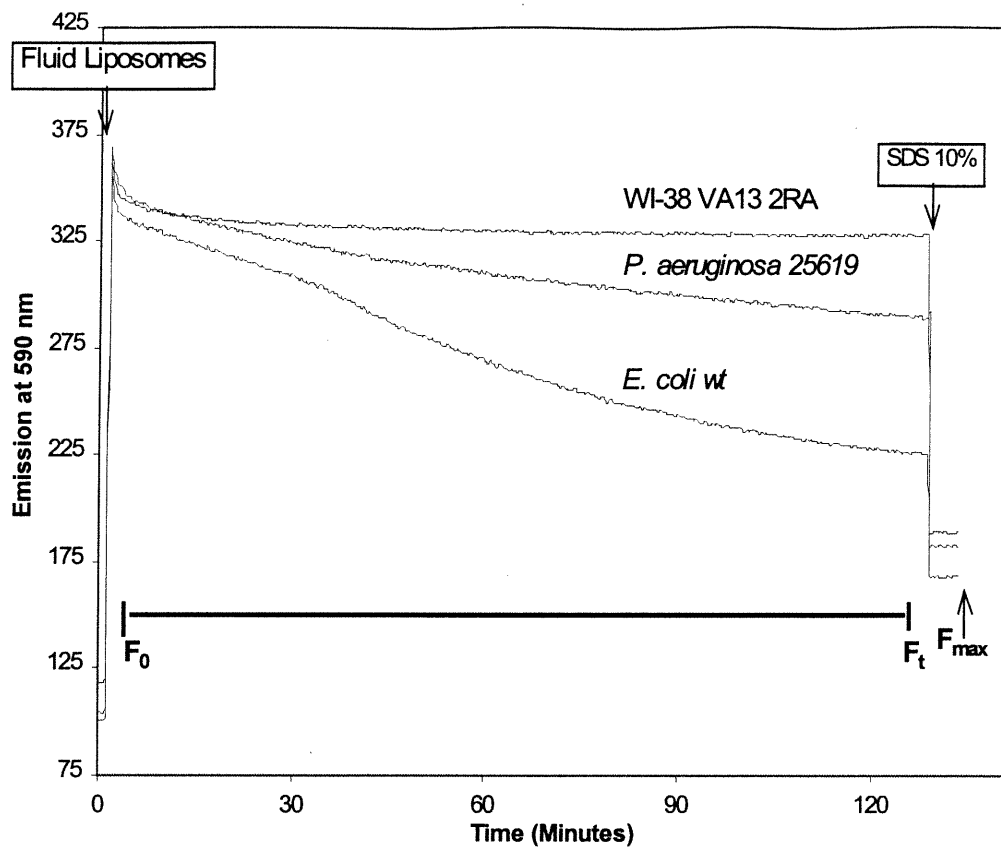


Figure 1

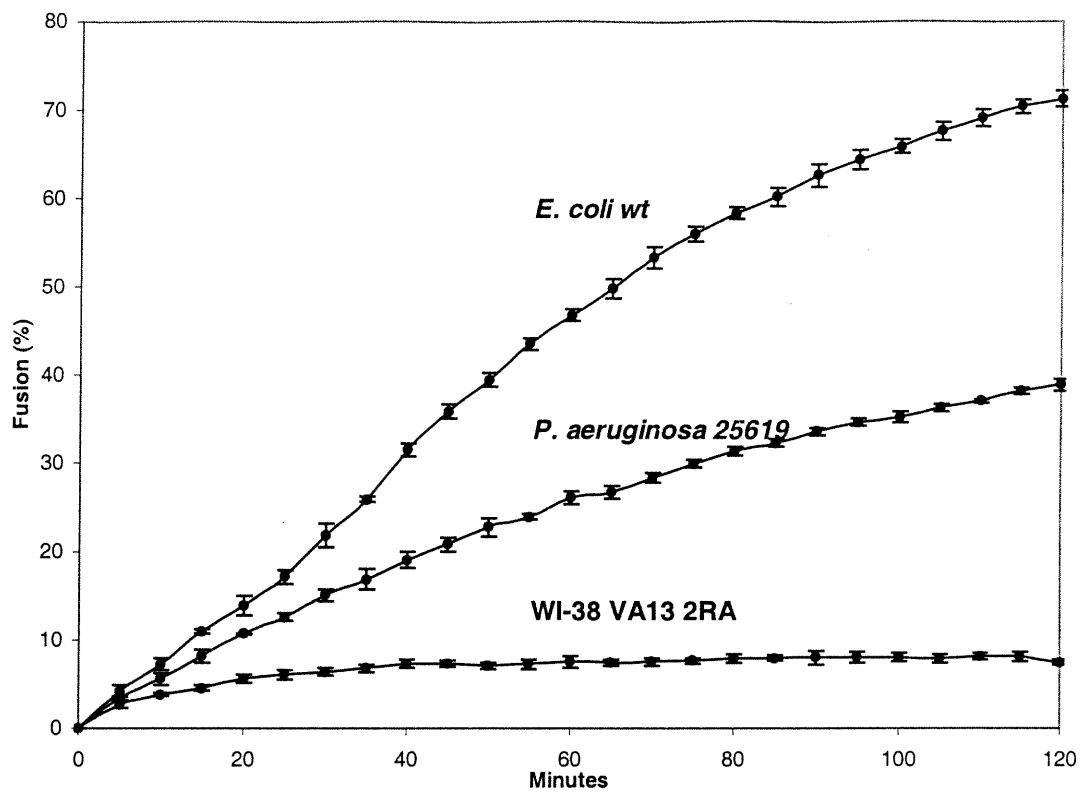


Figure 2

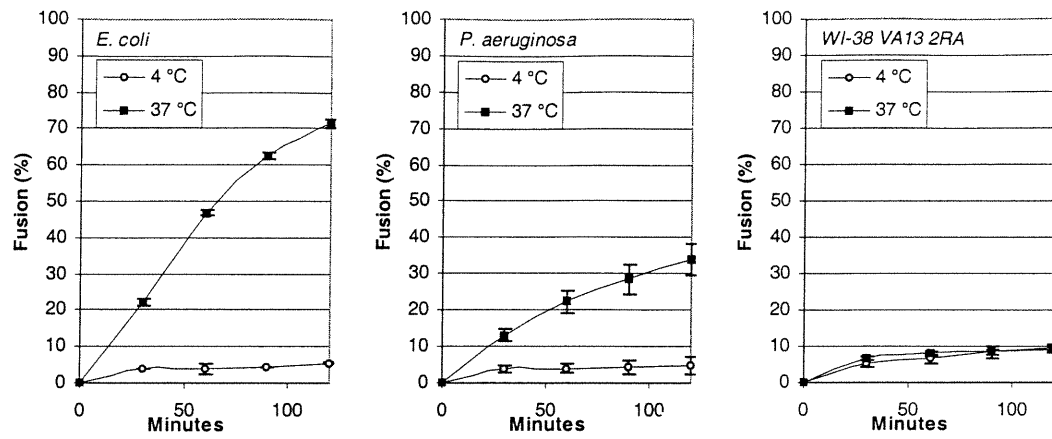


Figure 3

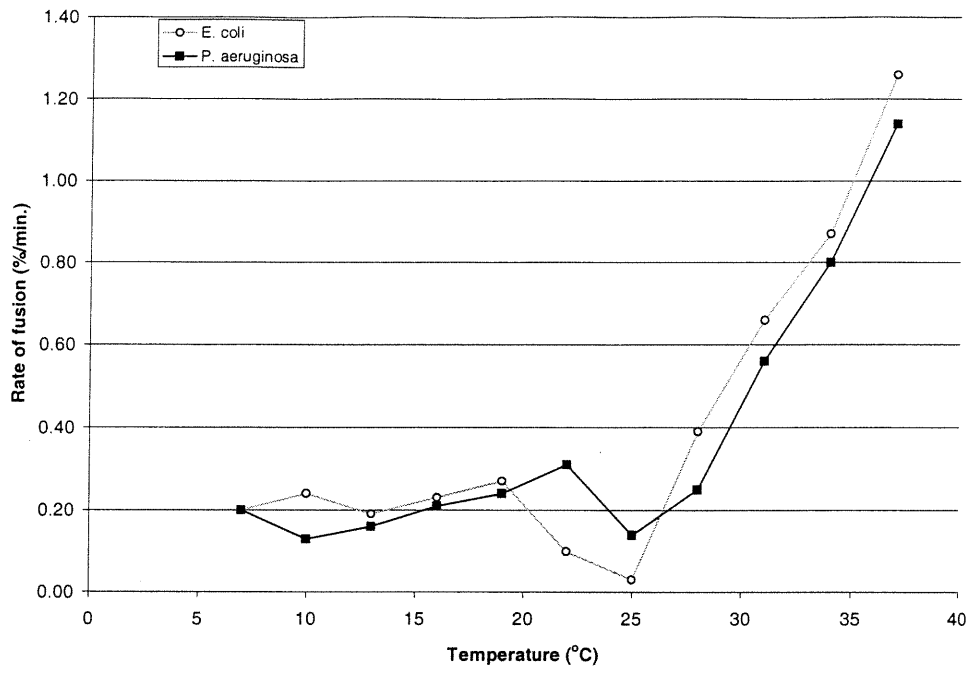


Figure 4

CHAPITRE 3 – Article deuxième auteur

Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated antisense oligonucleotides

Publié dans la revue

Biochimica Biophysica Acta Biomembranes, volume 1515, pages 44-54.

Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated antisense oligonucleotides

Patrick. Fillion, Annie Desjardins, Khampoune Sayasith and Jacqueline Lagacé*

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medecine, University of Montreal, C.P.6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Québec, Canada, H3T 3J7.

Running title : Antisense oligonucleotides delivery in bacteria with fluid liposomes

Key words : fluid anionic liposomes, antisense oligonucleotides, phosphorothioate antisense, bacteria, gene inhibition, DNA encapsulation

* Corresponding author: Jacqueline Lagacé

Tel. : (514) 343-2180

Fax : (514) 343-6358

Email : jacqueline.lagace@umontreal.ca

Abstract

Antisense therapy for the treatment of bacterial infections is a very attractive alternative to overcome drug-resistance problems. However, the penetration of antisense oligonucleotides into bacterial cells is a major hurdle that has delayed research and application in this field. In the first part of this study, we defined efficient conditions to encapsulate plasmid DNA and antisense oligonucleotides in a fluid negatively charged liposome. Subsequently, we evaluated the potential of liposome-encapsulated antisense oligonucleotides to penetrate the bacterial outer membrane and to inhibit gene expression in bacteria. It was found that $48.9 \pm 12\%$ and $43.5 \pm 4\%$ of the purified plasmid DNA and antisense oligonucleotides were respectively encapsulated in the liposomes. Using fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, it was shown, after subtraction of the fluorescence values due to the aggregation phenomenon measured at 4°C , that about 57% of bacterial cells had integrated the encapsulated antisense oligonucleotides whereas values for free antisenses were negligible. The uptake of the encapsulated-anti-*lacZ* antisense oligonucleotides resulted in 42% reduction β -galactosidase compared to 9% and 6% for the encapsulated mismatch antisense oligonucleotides and the free antisense oligonucleotides respectively. This work shows that it is possible to encapsulate relatively large quantities of negatively charged molecules in negative fluid liposomes and suggests that fluid liposomes could be used to deliver nucleic acids in bacteria to inhibit essential bacterial genes.

Introduction

The increase of bacterial resistance to conventional antibiotics has become a major problem giving rise to an urgent need for new approaches to treat bacterial infections. In cystic fibrosis patients, pathogens like *Pseudomonas aeruginosa* show high levels of resistance and lead to the progressive lung deterioration and premature death [1- 4]. To overcome antibiotic resistance, fluid liposomes, named FluidosomesTM, a negatively charged liposomal formulation without cholesterol and made of a combination of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dimiristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) phospholipids (at a molar ratio from 5:1 to 18:1) were developed. These liposomes with an overall low gel-liquid crystalline transition temperature (T_C) $\leq 37^\circ\text{C}$ [5] were conceived as a delivery vehicle to enhance drug penetration through bacterial membranes [6,7]. These fluid liposome encapsulated antibiotics succeed in eradicating *P. aeruginosa* in an animal model of chronic pulmonary infection [6]. Recently, the superior efficiency of fluid liposome-encapsulated aminoglycoside over rigid liposomes in an animal model of bacterial infection was supported by an independent group [8]. The enhanced bactericidal activity of fluid liposomes would result from a mechanism of fusion between the liposomes and the bacterial membranes as demonstrated by our group [9]. Previous studies analyzing the innocuousness of fluid liposomes have demonstrated that they do not induce immune response following repeated intraperitoneal and intratracheal administrations to mice [10] and cannot fuse with human lung epithelial cells [11].

Antisenses can regulate gene expression by binding to a complementary mRNA strand by conventional Watson-Crick hydrogen bonds, thereby providing specific targeting to the mRNA [12]. Because antisense oligonucleotides are highly susceptible to intracellular endonucleases, considerable efforts have been made to develop chemical modifications to improve their stability. Phosphorothioate oligonucleotides are the most commonly used and widely commercially available chemically modified oligonucleotides in which the non-bridging oxygen atoms are

replaced by sulfure in the DNA backbone of the molecule. This modification increases resistance to nuclease degradation [13]. Selective inhibition of bacterial genes to kill bacteria or to alter their resistance offers many advantages over conventional chemotherapies. Antisense oligonucleotides can be specifically designed to target only bacterial sequences thus not affecting eukaryotic cells. Also there are no known mechanisms by which bacteria could expulse antisense oligonucleotides outside their cytoplasm like they do with common antibiotics using efflux pumps [14-16]. Moreover, a recent study demonstrated that the activities of drug efflux pumps do not affect antisens nucleic acids susceptibility [17].

In this study, we first tested different types of solutions (NaCl, KCl, NaHCO₃, MgCl₂, CaCl₂ and PBS) for the encapsulating of plasmid DNA and antisense oligonucleotides in negatively charged FluidosomesTM. The second part of this study consisted in the analysis of the uptake of the encapsulated antisense oligonucleotides by *E. coli* CSH36 expressing a normal outer membrane which was evaluated by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The functional transfer of DNA in and *E. coli* strain which constitutively expresses the *lacZ* (β -galactosidase) gene due to a mutation in the regulatory *lacI* gene, was assessed by the reduction of β -galactosidase activity after the incubation of *E. coli* CSH36 with the encapsulated phosphorothioate anti-*lacZ* antisense oligonucleotide.

Materials and Methods

Bacterial strain and antisenses

The pUC 18 plasmid (New England BioLabs inc, MA) was used for the study of DNA encapsulation. *Escherichia coli* CSH36 (alternate name E7074), a laboratory strain which constitutively expresses the *lacZ* gene due to a mutation in the regulatory gene *lacI* was used [18]. Bacteria were grown in LB broth (Gibco BRL, Life

Technologies, Ontario, Canada). An anti- β -galactosidase antisense oligonucleotide was designed to target the start codon region of the *E.coli* β -galactosidase gene: 5' GGT CAT AGC TGT TTC 3' [19]. A mismatch antisense oligonucleotide was also designed and used as a negative control : 5' TAC TGT GAT CTG TGC 3'. The antisense oligonucleotides used in the present study had a phosphorothioate backbone. This modification was obtained by a substitution of a non-bridging oxygen for a sulfur in the oligonucleotide backbone in order to render the antisenses more stable and less subject to degradation by endonucleases [19]. These phosphorothioate antisense oligonucleotides were ordered from Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada). After salt removal, the lyophilized oligonucleotides were rehydrated with phosphate-buffered saline (PBS 1X). FITC-labeled antisense oligonucleotides used in uptake measurements were obtained from SYNTHEGEN (Houston, Texas, USA). Unless otherwise indicated, encapsulated oligonucleotide antisenses were added at a concentration of 10 μ M.

Fluid liposomes

Fluid liposomes were prepared from synthetic phospholipids dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dimiristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA) at a molar ratio of 10:1. Liposomes were prepared by a dehydration-rehydration vesicle (DRV) method as previously described [6,9]. Briefly, appropriate amounts of both phospholipids were dissolved in chloroform in a round-bottomed flask and dried to a lipid film by rotoevaporation (Büchi Rotavapor) at 65°C under vacuum (Büchi 168-Vaccum/Distillation Controller). The lipids were then redissolved in phosphate-buffered saline (PBS) 1:20 and transferred into screw neck diagnostic bottles with thin flange lyophilization stoppers design for lyophilization and hypodermic applications (Wheaton, NJ, USA). The liposomes were then freeze-dried (Virtis Genesis 12 EL Console freeze dryer, Canberra Parkard, Toronto, Canada) at 4°C. At the end of the lyophilization

process, the bottles were mechanically closed under vacuum. Finally, the stoppers were sealed with aluminium caps and bottles were kept at -70°C until use.

Encapsulation and quantification of the enclosed DNA

The pUC 18 plasmid was purified using the Concert™ Plasmid Maxiprep System (Life Technologies, Gibco BRL, USA) and quantified by OD_{260} using an UV-visible spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 1001 plus, US). To encapsulate DNA, a volume of 0,5 ml of purified plasmid DNA (0.2 mg/mL of encapsulation solution) or of antisense oligonucleotides (7.4 mg/ml of PBS) was injected into the diagnostic bottles containing the lyophilized phospholipids (15 mg of phospholipids) which were kept under vacuum during the procedure. The hydrated phospholipids were vortexed until the powder was completely dissolved in the DNA solution. These bottles, still under vacuum, were incubated at 65°C with agitation (100 rpm) for 60 minutes. Vortexing was performed every 10 minutes. After the incubation period, the liposome-DNA solution was diluted into 9.5 ml of encapsulation solutions. These solutions were contained either NaCl (50 mM and 150 mM), KCl (50 mM), NaHCO_3 (50 mM), CaCl_2 (50 mM), or MgCl_2 (50 mM) prepared in sterile distilled water and PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, K_2HPO_4 1.8 mM). The diluted liposomes were centrifuged at 6000g for 40 minutes in order to remove the DNA present in the supernatant. Plasmid DNA (250 μg) was resuspended into 1000 μl of encapsulation solution. Each encapsulation solution was tested at least three times. The liposome diameters were heterogenous: about 63% of the size distribution measurements of liposomes was shifted towards the diameter range comprised between 316.2 and 562.3 nm whereas about 46% consisted in large heterogeneous vesicles as determined by an electronic particle size analyser (Coulters Electronics, Miami, Flo).

The antisense oligonucleotides encapsulated in liposomes were quantified using Oligreen (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) as described by the

manufacturer, and a Perkin-Elmer LS-50B fluorescence spectrophotometer (excitation at 490 nm, emission at 520 nm). Before performing the cytometry studies, a sample of the FITC-labeled antisense oligonucleotides encapsulated into liposomes was submitted to DNA extraction for quantification using a methanol-chloroform (1:2) solution and a Perkin-Elmer LS-50B fluorescence spectrophotometer (excitation at 490 nm, emission at 520 nm).

Monitoring DNA localization

Two methods were used to confirm that DNA was present inside and not outside of the liposomes. The first method consisted of placing DNA-encapsulated liposomes and controls into agarose gel (0.4%) containing ethidium bromide (0.5 µg/ml). The gel was submitted to an electric current of 7 V/cm to obtain free DNA migration. The second method to ascertain that the measured DNA was contained inside the liposomes consisted in treating the preparation with DNase in order to eliminate the DNA present outside of the liposomes. The DNase treatment for 15 mg of phospholipids rehydrated with 250 µg of DNA consisted of 250 DNase units, 5 mM MgCl₂, 0.1 M sodium acetate and lasted 3 hours at room temperature. The reaction was stopped with 20 mM EDTA. After the DNase treatment, liposomes were dissolved and separated from DNA as described below. The DNA was quantified and compared to untreated liposome-encapsulated DNA. The control for DNase activity consisted in adding equivalent amount of DNA to empty liposomes (externally), followed by treatment with DNase and quantification of the resulting DNA. All DNA quantification in gels were determined visually.

UV absorbance measurements of DNA

To evaluate the efficiency of DNA encapsulation with the different encapsulation solutions, UV absorbance measurements were performed after

liposomes were dissolved in a methanol-chloroform (1:2) solution. The lipids were present in the organic phase whereas DNA was found in the aqueous phase. The aqueous phase containing plasmid DNA and antisense oligonucleotides was diluted 1:100 in the different encapsulation solutions and analyzed on an Milton Roy Spectronic 1001 plus spectrophotometer. Samples were placed in quartz cuvettes and scanned at A_{260} . Standard curves were drawn in the different encapsulation solutions with concentrations of DNA varying from 0.001 mg/ml to 0.5 mg/ml.

Delivery of the encapsulated antisense oligonucleotides in E.coli

Bacteria were grown overnight in LB broth (Gibco BRL, Life Technologies, Ontario, Canada). From this culture, 300 μ l were added to 10 ml of fresh LB broth. The culture was grown to mid-logarithmic phase then diluted to an optical density (O.D.) of 0.05 at 600 nm. Six tubes containing the same volume of this bacterial culture were prepared and different concentrations of free FITC-labeled antisense oligonucleotides, encapsulated FITC-labeled antisense oligonucleotides and PBS containing liposomes were added. Bacteria were incubated for 4 h at 37 °C with vigorous shaking. Samples from each tube were placed on the surface a 24 % sucrose (Sigma, Ontario, Canada) cushion and centrifuged at 4 °C for 20 minutes (6000 rpm) in an Eppendorf Centrifuge 5402. Bacteria were washed once with LB broth then placed on another sucrose cushion and centrifuged. The supernatant was discarded and the final cell pellet was fixed with 2 % paraformaldehyde (SIGMA, Ontario, Canada) diluted in PBS. The solutions were kept at 4 °C overnight. Bacteria were analyzed by means of a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson). Forward angle (FSC) and 90° light (side) scattering (SSC) measurements as well as green (FL1) fluorescence were collected, and 10,000 events were counted for each sample. The purity of the bacterial population sorted after electronic gating was closed to 100%.

Determination of β -galactosidase activity

Bacteria were prepared as described above. Free antisense oligonucleotides, encapsulated antisense oligonucleotides, encapsulated mismatch antisense oligonucleotides, free mismatch oligonucleotides and encapsulated PBS were added to bacteria and incubated for 4 h at 37 °C with agitation. In this assay, a single data point of 4 h was selected based on results obtained following the time course of the FACS analysis. Samples from each tube were placed on the surface of a 24 % sucrose cushion and centrifuged for 20 minutes at 6000 rpm, 4 °C. Supernatants were discarded and bacteria were resuspended in Z buffer (8.52 g Na₂HPO₄, 5.5 g NaH₂PO₄-H₂O, 0.75 g KCl, 0.246 g MgSO₄-7H₂O, 2.7 ml β -mercaptoethanol per liter; pH 7). β -galactosidase concentration was measured using the substrate o-nitrophenyl- β -galactoside (SIGMA, Ontario, Canada) as previously described [18] with minor modifications: after the incubation period with the substrate, the bacteria were treated with 20 μ l of chloroform (EM Science, Gibbstown, NJ, USA) and 20 μ l of 0.1% SDS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The solution was vortexed for 10 seconds then placed at 30 °C for 5 minutes. The absorbance was measured at 420 nm using a spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 1001 Plus)

Results

DNA encapsulation with the different encapsulation solutions

The two encapsulation solutions containing CaCl₂ (50 mM, pH 7.0) or MgCl₂ (50 mM, pH 7.0) caused the DNA and liposomes to precipitate thus allowing visualization by ethidium bromide staining in the agarose gel where the DNA was visible in the wells at the end of the migration period (Fig. 1b, lanes 1,4,7,10). Also, a precipitate was visible when the solution was observed in the tube. The

encapsulation solutions composed of salts containing monovalent cations, either NaCl (50 mM, and 150 mM, pH 7.0), KCl (50 mM, pH 7.0), NaHCO₃ (50 mM, pH 7.0) and PBS were efficient in promoting the encapsulation of DNA in liposomes. At first, when these liposomes were placed in agarose gels, encapsulated DNA could not migrate, nor could it be detected in the wells (Fig. 1b, lanes 2,3,5,6,8,9). However, following the lysis of these liposomes, migrating DNA could be observed (Fig. 1a, lanes 10,11,13,16,17,19). The quantities of DNA detected in the gels after DNase treatment (lanes 10,11,13) were approximately the same and corresponded to about 50% of the signal given by the initial DNA preparation dissolved in the encapsulation solution before encapsulation (Fig. 1a, lanes 2,3,5). Negligible difference in DNA quantities were observed between untreated and treated (lanes 16,17,19) and DNase-treated liposome-encapsulated DNA (lanes 10,11,13).

The UV absorbance measurements of extracted DNA from 8 independent preparations of liposome-encapsulated plasmid DNA and three independent preparations of encapsulated antisense oligonucleotides in PBS gave a mean encapsulation of 48.87 ± 11.65 and 43.53 ± 4.32 % respectively.

Delivery of the encapsulated antisense oligonucleotides in bacteria

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was performed at 37°C to determine if encapsulated antisense oligonucleotides could efficiently be delivered into bacteria. To assure that liposomes do not sediment at all during centrifugation through the sucrose cushion, a preliminary test was performed that consisted in adding only liposomes on the surface of the sucrose cushion. The cytometry analysis of the lower part (no pellet was visible) of the gradient showed a total absence of liposomes in the this fraction. Other controls indicated that bacteria did not emit intrinsic fluorescence (Fig. 2A) and no fluorescence was detected with fluid liposomes containing PBS used as negative control (data not shown). Bacteria treated with free antisense oligonucleotides showed very low levels of fluorescence (8 %)

(Fig.2B). After a 4 h incubation period of bacteria with encapsulated FITC-antisense oligonucleotides, 71.25% of bacteria showed FITC-fluorescence (Fig. 2C). To evaluate the extent of the aggregation phenomenon of liposomes and antisenses on the outer bacterial membrane versus the penetration of antisense in bacteria by liposome fusion, a kinetic study was performed at 4°C and 37°C. The results indicate that at time zero, fluorescence values were the same at 4 °C and 37°C; after 4 h of incubation at 37°C, the bacterial fluorescence due to the liposome-encapsulated oligonucleotide transfer strongly increased with time (Fig. 3). After subtraction of values obtained at time zero, the fluorescence that may be caused by agglutination (observed at 4°C) counted for 17% and 20% after 120 and 240 min. respectively for the encapsulated antisenses comparatively to 43% and 100% after 120 and 240 min. respectively for the free antisenses (Fig. 3). This means that at the end of the experiment, only aggregation was observed between the free antisenses and the bacterial cells. On the other hand, 80% of the fluorescence observed with the encapsulated antisenses corresponded to a true antisense internalisation which corresponded to 57%.

Determination of the β -galactosidase activity

The mismatch antisense oligonucleotide used as negative control contained the same amount of T, A, G and C deoxyribonucleotides as the anti-*lacZ* antisense oligonucleotide but in an different order. The addition of 25 μ M of the encapsulated anti-*lacZ* antisense oligonucleotide to *E.coli*, with an incubation period of 4 h at 37°C, caused a significant reduction of β -galactosidase of 42 % compared to 9 % and 6 % for the encapsulated mismatch antisense oligonucleotide and the free antisense oligonucleotide respectively (Figure 4). This result demonstrates that the encapsulated antisenses not only enters the bacterial cells but interact with the target mRNA. In the second β -galactosidase assay, a dose dependent activity using 5, 10, and 25 μ M encapsulated antisense oligonucleotides causes the inhibition of the

β -galactosidase whereas a plateau was reached with 50 μ M. Gradual inhibition of β -galactosidase activity of 4%, 26% and 42 % were observed with the encapsulated antisense at 5, 10 and 25 μ M respectively compared to \cong 2 to 6 % with free antisense and 0 to 9 % with the encapsulated mismatch antisense. (Fig. 5). The inhibition of the β -galactosidase gene expression was done (Fig. 5) and was inhibited in a significant manner only with the encapsulated anti-*lacZ* antisense oligonucleotide (Fig. 5). Free mismatch antisense oligonucleotide showed no gene inhibition (Data not shown). Finally, our results show that the phosphorothioate antisense oligonucleotides were not degraded during the 4 h period at 37 °C since their activity was maintained over that period of time.

Discussion

Multiple modes of DNA delivery have been developed for gene therapy [20]. Among the problems associated with DNA transfer in cells are the stability of the carrier DNA complex, toxicity and the efficient delivery and expression of the desired DNA into cytoplasm. The use of viral particles, a very efficient method of gene delivery, involve potential risk of infection, immune reaction and may both slow the cell cycle and induce apoptosis [21,22]. Although cationic liposome-DNA complexes present advantages over viral vectors, they have also major limitations due to aggregation behavior [23-25], significant toxicity [26-29] and low transgene expression [30,31]. Moreover, the problem of toxicity is a complex one since it would be independent of the cationic lipid:DNA ratio, the cationic lipid species and the level of transgene expression attained [27]. It has been suggested that the mechanism of toxicity of cationic lipids would depend on the alterations of the net charge of cell membranes and adverse effects on the activity of ions channels, membrane receptors, and enzymes [32]. Another problem met with cationic liposome-mediated transfection is the low release of plasmid DNA from the liposome-DNA complex for efficient gene expression [33,34].

In the present work, entrapment of DNA in anionic DPPC/DMPG liposomes prepared with the DRV method using encapsulation solutions made of monovalent salts was significant both with plasmid DNA (48.3%) and antisense oligonucleotides (43.5%) Similar plasmid DNA entrapment values were reported with anionic PC:CHOL:PG liposomes [35]. It also appears that in solutions made of monovalent salts, the DNA quantified was practically only within the liposome considering i) following its encapsulation, the DNA was protected from the DNase degradation as demonstrated by the fact that the same amount of DNA was detected in untreated and treated liposome-encapsulated DNA; ii) free DNA could not be observed in agarose gel following the DNase treatment; iii) encapsulated DNA could not be observed with ethidium bromide in agarose gel; iv) DNA could be observed in agarose gel after lysis of the DNA-encapsulated liposomes. It seems that, in contrast to DNA-liposome complexes where DNA is external, internalization of DNA would be favoured in the multilamellar liposomes generated by the DRV process [35]. Moreover, in our hands, the whole process of rehydration contributes to the efficiency of the encapsulated procedure.

Liposomes are versatile drug carriers which can be associated with both hydrophilic and hydrophobic molecules. The finding that a plasmid DNA-cationic liposome complex microinjected directly into the nucleus showed low transfection efficiency supports the hypothesis that the release of plasmid DNA from the complex is necessary for efficient gene expression in liposome-mediated transfection [34]. Xu and co-workers demonstrated that the anionic liposomes with a composition that mimics the cytoplasmic-facing monolayer of the plasma membrane rapidly released plasmid DNA from the complex [36]. In the absence of Ca^{2+} ions, DNA molecules have no effect on negatively charged liposomes because electrostatic repulsion prevents its interaction with anionic multilamellar vesicles [37]. Consequently, the use of anionic liposomes could help to the release into cytoplasm of plasmid DNA from the liposome/DNA complex, a required step to the subsequent gene expression efficiency.

FACS analysis clearly shows that bacterial uptake of encapsulated antisense oligonucleotides is higher than the uptake of free antisense oligonucleotides. The difference in number of fluorescent bacteria between the two preparations is very significant since it reached 71,25 % with the encapsulated antisense oligonucleotides comparatively to 9,78 % for the free ones (Fig. 2). By running the same experiment at 4 °C and 37 °C (Fig. 3), the values of fluorescence corresponding to aggregation (values obtained at 4°C) could be excluded. The result indicates that after an incubation period of 4 h at 37°C with the encapsulated antisense, the true value of the fluorescent antisense in the bacterial cells was 57% instead of 71%. Moreover, the same operation performed on the fluorescence values due to free antisense indicates that the aggregation phenomenon represents the whole value of the observed fluorescence at the end of the experiment.

To demonstrate the activity of the anti-*lacZ* antisense oligonucleotides after their internalisation in the bacterial cells, the inhibition of β -galactosidase production by *E.coli* CSH36, a bacterial strain that constitutively produce β -galactosidase was measured. This strain was selected to avoid the addition of isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) to the preparation since the latter could have been trapped into the fluid liposomes. In this eventuality, IPTG would have been inaccessible to the surrounding bacteria and could have interfered with the normal induction of the targeted gene. To avoid the degradation of the antisense oligonucleotides by endonucleases, the antisenses used in the present study had a phosphorothioate backbone obtained by a substitution of a non-bridging oxygen by a sulfur in the nucleotide backbone. The stability of the antisenses used is well demonstrated by the results obtained after an incubation period of four hours (Fig. 3). A control using a non modified antisense showed no gene inhibition (data not shown). The β -galactosidase inhibition obtained with the encapsulated anti-*lacZ* antisense oligonucleotides was concentration-dependant and reached a maximum level of 45 % (Fig. 4 and 5). This limit is close to the percentage of bacterial cells (57%) which

apparently show a true internalisation of the antisense oligonucleotides from the liposomes. The limit can be also related to the non toxic effect of the antisense for the bacteria. Thus, after the addition of the liposome-encapsulated anti-*lacZ* antisense oligonucleotides that combined with the bacteria, the sustained growing of new bacterial cells would continue to produce β -galactosidase during the 4 h.-incubation period. At concentrations of 25 and 50 μM , the encapsulated mismatch antisense oligonucleotides showed an inhibition of about 8%. This low level of inhibition could be attributed to a non-specific steric hindrance after the penetration of the mismatch antisense in the bacterial cells. Some may argue that the diameter range of the majority of the liposomes that shifts towards 316-562 nm seems too large to allow fusion with bacteria of 1-5 μm dimension. The fusion mechanism of the fluid liposomes with bacteria does not necessarily implicate the penetration of the whole liposome into the bacteria. It is possible that a partial fusion between bacterial and liposomal membranes occurs, allowing the penetration into the bacterial cytoplasm of liposome-containing molecules. The well known conjugation process that exports effector molecules into other cells demonstrates that such a transfer is possible. This hypothesis is not inconsistent with our previous work on the mechanism of fusion [9] and with the present results.

In conclusion, we showed that fluid anionic DRV liposomes can encapsulate, under vacuum conditions, significant amounts of plasmid and oligonucleotide DNA using monovalent salts solutions. It is also demonstrated that DNA is entrapped within the multilamellar vesicles rather than being adsorbed to their surface. Because the toxicity problem of cationic liposomes may limit their clinical use, different types of anionic liposomes could be used to introduce genes both in bacterial and mammal cells and enhance their expression. This study also suggests that the use of anionic fluid liposomes directed at an essential gene start codon could be efficiently delivered inside bacteria and inhibit the gene's expression to eventually eliminate bacterial strains resistant to conventional antibiotics.

Acknowledgment

The authors are grateful to Serge Sénéchal for assistance with FACS studies. This research was supported by a grant from Theralipids Inc., Montreal, Canada.

References

- [1] R.E. Hancock, Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria, Clin. Infect. Dis. 27 Suppl 1 (1998) S93-99.
- [2] J. Garau, Beta-lactamase: current situation and clinical importance. Intensive Care Med. 20 Suppl 3 (1994) S5-9.
- [3] J.A. Karlowsky, M.H. Saunders, G.A. Harding, D.J. Hoban, G.G. Zhanel, In vitro characterization of aminoglycoside adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob. Agents Chemother. 40 (1996) 1387-1393.
- [4] R.B. Fickn Jr., F. Sonoda, D.B. Hornick, Emergence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis airway, Semin. Respir. Infect. 7 (1992) 168-178.
- [5] C. Beaulac, Élaboration et évaluation de chémoliposomes à action bactéricide anti-*Pseudomonas aeruginosa* chez un modèle animal d'infection chronique. Master's thesis, Université du Québec à Trois-Rivière (UQTR), avril 1995.
- [6] C. Beaulac, S. Clément-Major, J. Hawari, J. Lagacé, Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection, Antimicrob. Agents Chemother. 40 (1996) 665-669.
- [7] C. Beaulac, S. Clément-Major, J. Hawari, J. Lagacé, In vitro kinetics of drug release and pulmonary retention of microencapsulated antibiotic in liposomal formulations in relation to the lipid composition, J. Microencapsulation 14 (1997) 335-348.

- [8] R.M. Schiffeler, G. Storm, M.T. TEN Kate, I.A.J.M. Bakker-Woudenberg, Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated gentamicin in rat *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in relation to impaired host defense and low bacterial susceptibility to gentamicin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 464-470.
- [9] S. Sachtelli, H. Khalil, T. Chen, C. Beaulac, S. Sénéchal, J. Lagacé, Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1463 (2000) 254-266.
- [10] S. Sachtelli, C. Beaulac, R. Riffon, J. Lagacé, Evaluation of the pulmonary and systemic immunogenicity of fluidosomes, a fluid liposomal-tobramycin formulation for the treatment of chronic infection in lungs, *Biochim. Biophys. Acta* 24832 (1999) 1-7.
- [11] A. Desjardins, T. Chen, H. Khalil, K. Sayasith, J. Lagacé, Differential behaviour of fluid liposomes towards bacterial and mammalian epithelial cells: restriction of fusion to bacteria. Submitted to *J. Drug Target*.
- [12] H.J. Larsen, T. Bentin, P.E. Nielsen, Antisense properties of peptide nucleic acid, *Biochim. Biophys. Acta* 1489 (1999) 159-166.
- [13] S.T. Crooke et al., Kinetic characteristics of *Escherichia coli* RNase H1: cleavage of various antisense oligonucleotides-RNA duplexes, *Biochem. J.* 312 (Pt2) (1995) 599-608.
- [14] X.Z. Li, H. Nikaido, K. Poole, Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 1948-1953.
- [15] H. Nikaido, Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 5853-5859.
- [16] S. Westbrook-Wadman, D.R. Sherman, M.J. Hickey, S.N. Coulter, Y.Q. Zhu, P. Warrenner, L.Y. Nguyen, R.M. Shawar, K.R. Folger, C.K. Stover, Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999)

- 2975-2983.
- [17] L. Good, R. Sanberg, O. Larsson, P.E. Nielsen, C. Wahlestedt, Antisense PNA effects in *Escherichia coli* are limited by the outer-Membrane LPS layer, *Microbiology* 146 (2000) 2665-2670.
 - [18] J.H. Miller, Assay of B-galactosidase, in: *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1972, pp. 352-355.
 - [19] L. Good, P.E. Nielsen, Antisense inhibition of gene expression in bacteria by PNA targeted to mRNA, *Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 355-358.
 - [20] P.L. Katsel, R.J. Greenstein, Eukaryotic gene transfer with liposomes: effect of differences in lipid structure, *Biotechnology Annual Review* 5 (2000) 197-220.
 - [21] S. Teramoto, L.G. Johnson, W. Huang, M.W. Leigh, R.C. Boucher, Effect of adenoviral vector infection on cell proliferation in cultured primary human airway epithelial cells, *Hum. Gene Ther.* 6 (1999) 1045-1053.
 - [22] Y. Yang, F. Nunes, K. Berenczi, E. Furth, E. Gonczol, J. Wilson, Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 4407-4411.
 - [23] S. Li, W.-C. Tseng, D. Beer Stolz, S.-P. Wu, S.C. Watkins, L. Huang, Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection, *Gene Ther.* 6 (1999) 585-594.
 - [24] J.G. Smith, R.L. Walzem, J.B. German, Liposomes as agents of DNA transfer, *Biochim. Biophys. Acta* 1154 (1993) 327-340.
 - [25] J. Zabner, Cationic lipids used in gene transfer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 27 (1997) 17-28.
 - [26] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, M. Danielsen, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7413-7417.

- [27] J.D. Tousignant, A.L. Gates, L.A. Ingram, C.L. Johnson, J.B. Nietupski, S.H. Cheng, S.J. Eastman, R.K. Scheule, Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid: plasmid DNA complexes in mice, *Hum. Gene Ther.* 11 (2000) 2493-2513.
- [28] X. Gao, L. Huang, A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179 (1991) 280-285.
- [29] H. Farhood, R. Bottega, R.M. Epand, L. Huang, Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity, *Biochim. Biophys. Acta* 1111 (1992) 239-246.
- [30] J.C. Stavridis, G. Deliconstantinos, M.C. Psallidopoulos, N.A. Armenakas, D.J. Hadjiminis, J. Hadjiminis, Construction of transferrin-coated liposomes for in vivo transport of oxogenous DNA to bone marrow erythroblasts in rabbits, *Exp. Cell. Res.* 164 (1986) 568-572.
- [31] V.S. Trubetskoy, V.P. Torchilin, S. Kennel, L. Huang, Cationic liposomes enhance targeted delivery and expression of exogenous DNA mediated by N-terminal modified poly L-lysine-antibody conjugate in mouse lung endothelial cells, *Biochem. Biophys. Acta* 1131 (1992) 311-313.
- [32] J.H. Felgner, R. Kumar, C.N. Sridhar, C.J. Wheeler, Y.J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin, P.L. Felgner, Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2550-2561.
- [33] F. Sakurai, R. Inoue, Y. Nishino, A. Okuda, O. Matsumoto, T. Taga, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida, Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid DNA/cationic liposome complexes and subsequent gene expression, *J. Controlled Rel.* 66 (2000) 255-269.
- [34] J. Zabner, A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, M.J. Welsh, Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18997-19007.
- [35] Y. Perrie, G. Gregoriadis, Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation

studies, *Biochim. Biophys. Acta.* 1475 (2000) 125-132.

- [36] Y. Xu, F.C. Szoka Jr., Mechanizum of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection, *Biochemistry* 35 (1996) 5616-5623.
- [37] M.R. Mozafari, V. Hasirci, Mechanism of calcium ion induced multilamellar vesicle-DNA interaction, *J.Microencapsulation* 15 (1998) 55-65.

Titles and legends to figures

Figure 1a (upper gel): Evaluation of DNA quantity before and after treatment of liposomes with DNase. Initial preparations of DNA in the different encapsulation solutions (no liposomes) (lanes 1 to 5), DNA after dissolving liposomes with methanol-chloroform (1:2) solution (lanes 15-19) and after DNase treatment of liposomes (external DNA) followed by dissolving liposomes (lanes 9-13). Encapsulation solutions: CaCl₂ (lanes 1,9,15), NaCl (lanes 2,10,16), KCl (lanes 3,11,17), MgCl₂ (lanes 4,12,18) and NaHCO₃ (lanes 5,13,19). NaCl solution controls without DNA (lanes 6,14,20); DNA controls in CaCl₂ and in NaCl without DNase treatment (lanes 7 and 8 respectively) and after DNase treatment (lanes 21,22 respectively). Electrophoresis was performed in a 0,4% agarose gel.

Figure 1b (lower gel): Demonstration of the absence of migration with whole liposomes without DNase treatment (lanes 1-5); after DNase treatment (7-11). Control NaCl solution without DNA (lanes 6 and 12). Encapsulation solutions: CaCl₂ (lanes 1,7), NaCl (lanes 2,8), KCl (lanes 3,9), MgCl₂ (lanes 4,10) and NaHCO₃ (lanes 5,11).

Figure 2: Flow cytometry histograms of *E.coli* CSH36 after 4 hour incubation period at 37° C. A: control bacteria; B: bacteria with free FITC-labeled antisense oligonucleotides; C: bacteria with encapsulated FITC-labeled antisense oligonucleotides. The x-axis represents mean fluorescence intensity and the y-axis bacterial counts.

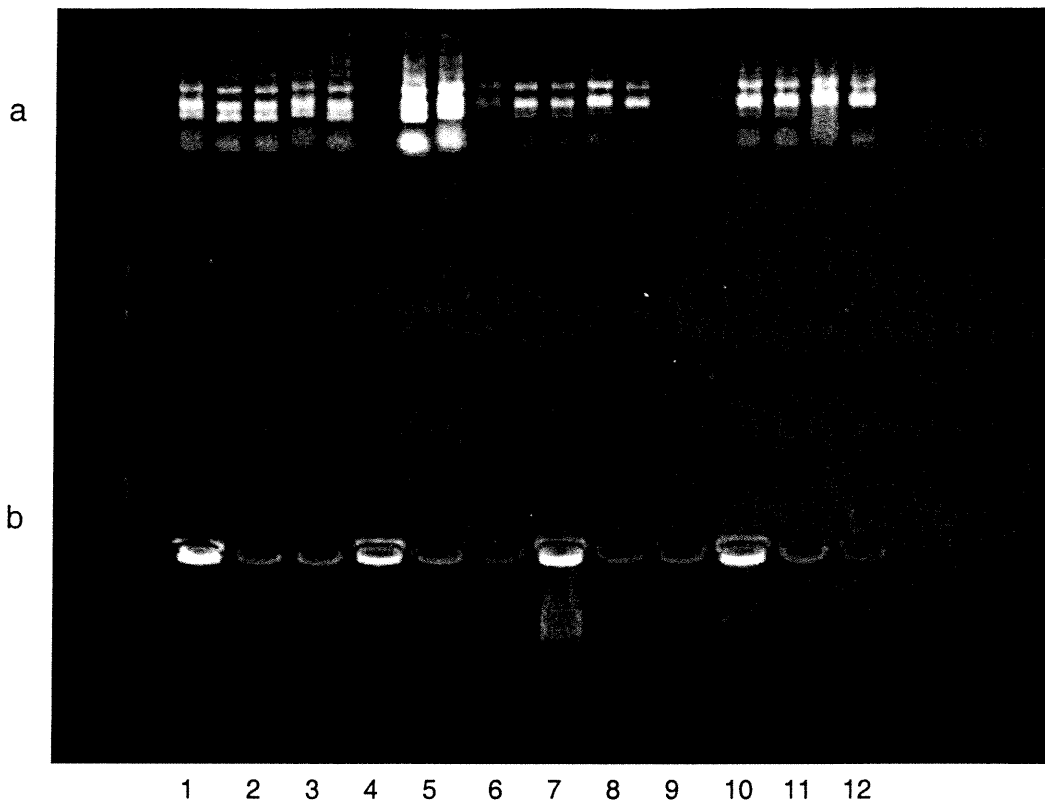
Figure 3: Kinetic of antisense uptake in bacteria measured by FACS analysis as described in the text. (□): control bacteria; (◻): free antisense oligonucleotides; (■): encapsulated antisense oligonucleotides.

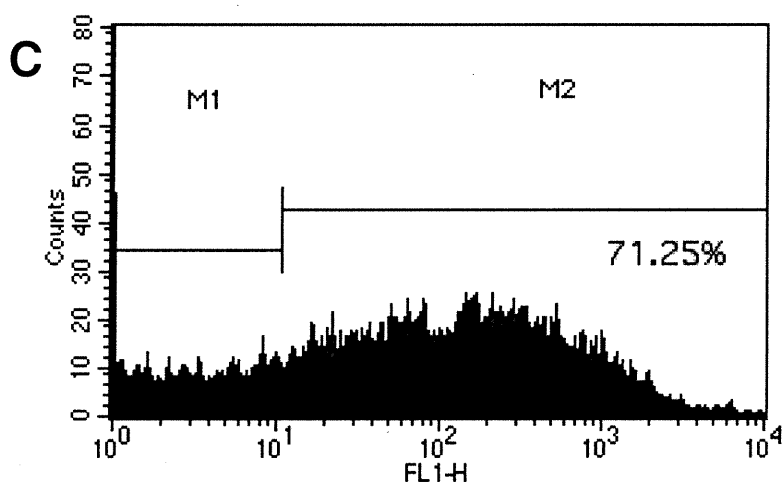
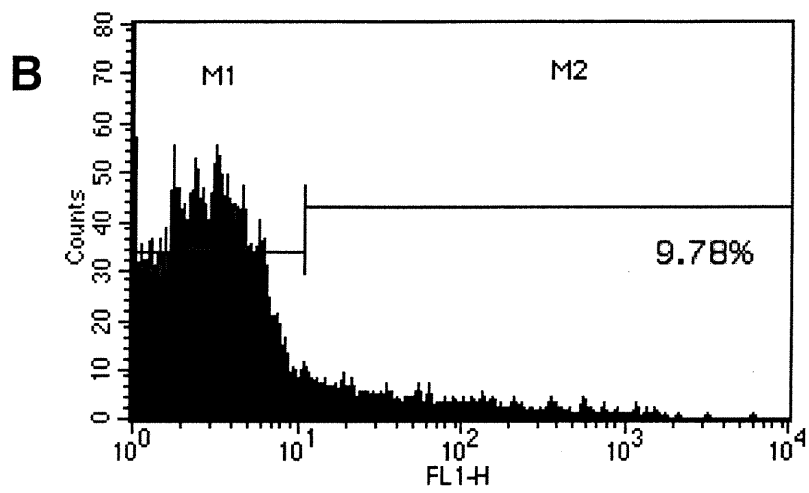
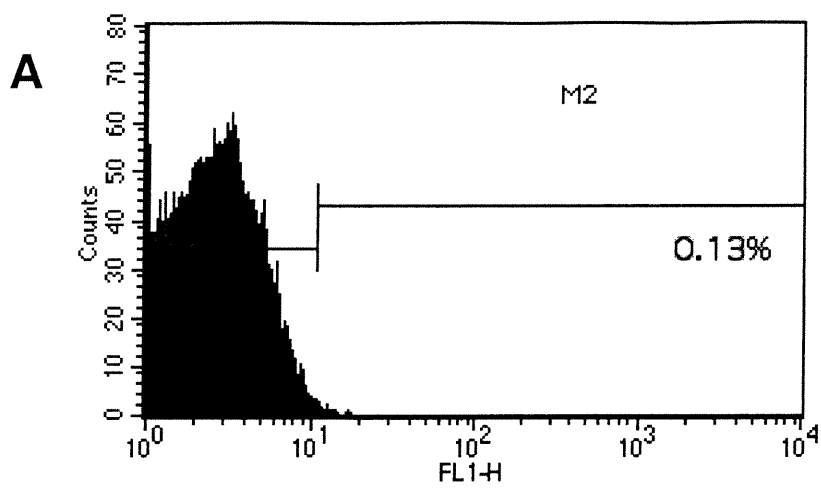
A: experiment conducted at 37 °C; B: experiment conducted at 4 °C.

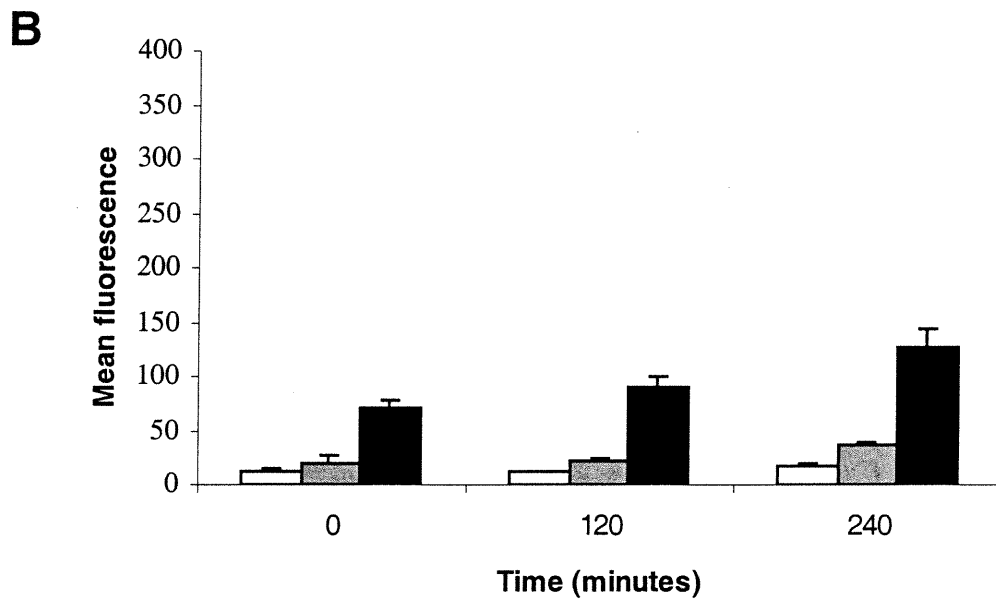
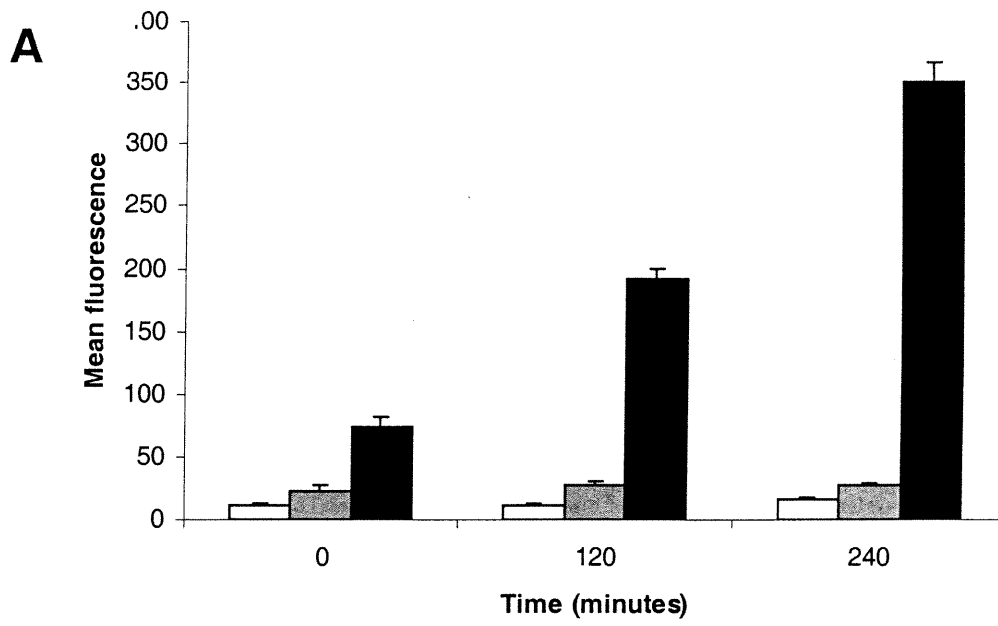
Figure 4: Effect of the encapsulated anti-*lacZ* antisense oligonucleotides on the β -galactosidase expression in *E.coli* CSH38 after 4 hour incubation period at 37 °C with 25 μ M of antisense oligonucleotides.

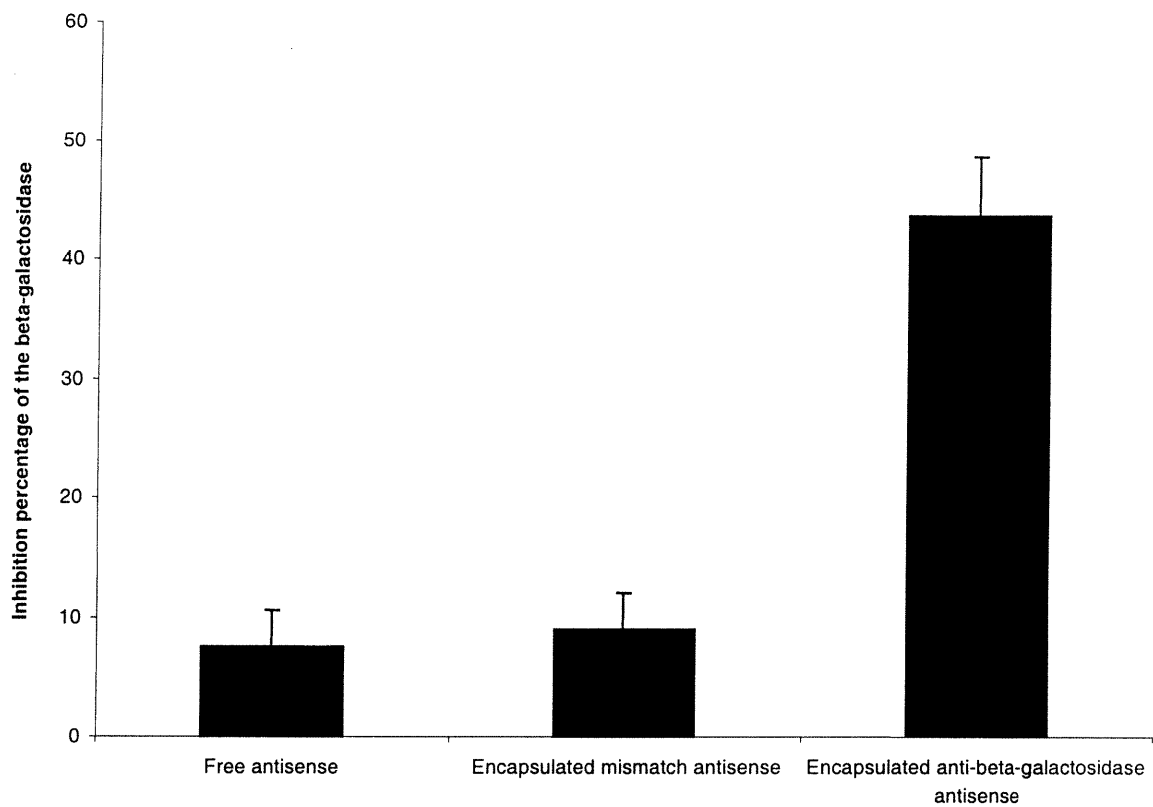
Figure 5: Dose-dependant (μ M) inhibition of the β -galactosidase gene in *E.coli* CSH38 after a 4 hour incubation period at 37 °C. (): free antisense oligonucleotides; () encapsulated mismatch antisense oligonucleotides () encapsulated anti-*lacZ* antisense oligonucleotides (data for free mismatch antisense oligonucleotides were not shown because all values were negative).

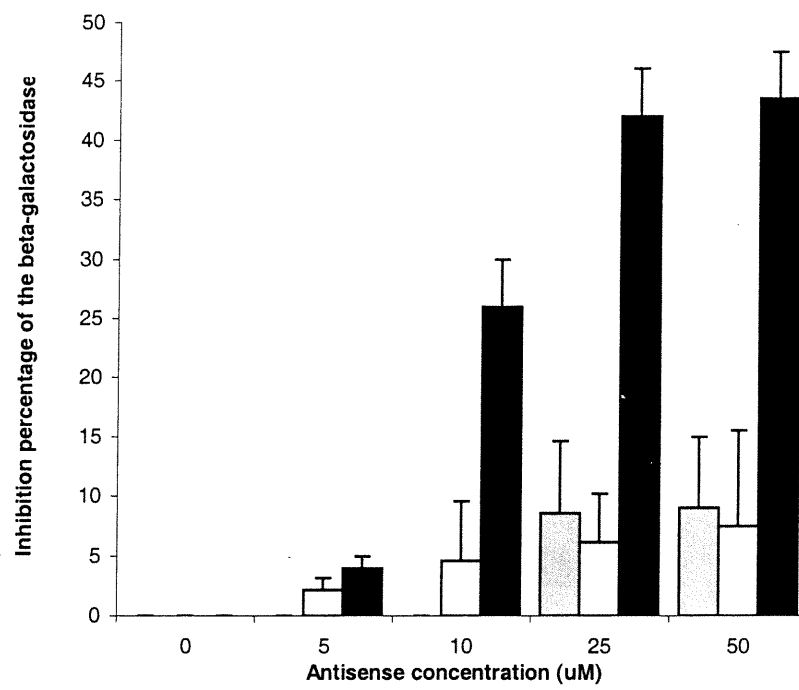
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22











CHAPITRE 4 – Discussion

4.1 Les liposomes et la résistance bactérienne aux antibiotiques

À l'heure actuelle, plusieurs chercheurs travaillent sur un problème d'envergure : la résistance aux antibiotiques. Ces recherches ont pour but de ralentir le développement de nouvelles souches bactériennes multirésistantes ainsi que la ré-émergence de certaines bactéries pathogènes. Celles-ci autrefois contrôlables grâce aux antibiotiques, sont redevenues un risque pour la santé publique. Pour tenter d'endiguer le problème, des chercheurs tentent de développer de nouveaux types d'antibiotiques, d'autres des véhicules pour transporter le médicament au site d'infection ou encore de nouvelles méthodes pour détruire les micro-organismes. Le sujet principal de ce travail concerne l'utilisation de liposomes pour transporter l'antibiotique directement à l'endroit où se trouvent les bactéries.

L'utilisation des liposomes comporte plusieurs avantages. Ils protègent l'antibiotique de l'inactivation ou de la destruction par des substances produites par le corps (pH élevé, enzymes) (Taylor et Newton, 1994; Popescu *et al.*, 1987; Nacucchio *et al.*, 1990). De plus, ils peuvent protéger l'hôte des effets secondaires engendrés par l'antibiotique libre et du même coup permettre d'augmenter l'index thérapeutique du médicament (Popescu *et al.*, 1987; Taylor et Newton, 1994; Betageri *et al.*, 1993b; Kellaway et Farr, 1990). Les liposomes peuvent également contourner certains mécanismes de résistance des bactéries et ainsi augmenter l'efficacité de l'antibiotique (Beaulac *et al.*, 1998). Tel qu'exposé dans l'introduction, les liposomes peuvent être utilisés pour traiter plusieurs types de maladies. Cependant, lors du traitement d'infections bactériennes, les études sur les liposomes ont

porté principalement sur l'élimination des bactéries intracellulaires et peu d'études sur les infections extracellulaires. Toutefois, la majorité des infections bactériennes sont extracellulaires comme les infections pulmonaires causées par *P. aeruginosa* chez les patients atteints de fibrose kystique ou les patients immunosupprimés. Ce type d'infection pourrait bénéficier de l'utilisation des liposomes contenant des antibiotiques puisque les traitements actuels sont principalement palliatifs et non curatifs (Webb, 1995). C'est pour cette raison que l'équipe du Dre. Lagacé a développé les Fluidosomes™.

Lors d'expériences *in vitro*, l'efficacité des Fluidosomes™ a été démontrée contre différentes espèces de bactéries démontrant ainsi leur polyvalence. En effet, les Fluidosomes™ contenant de la tobramycine affectaient la multiplication de toutes les bactéries testées, de façon plus ou moins marquée (Beaulac *et al.*, 1996; Beaulac *et al.*, 1998). La diminution du nombre de bactéries était plus importante avec les Fluidosomes™ qu'avec l'antibiotique libre (Beaulac *et al.*, 1996) et cela même contre une souche résistante de *P. aeruginosa* contre laquelle une concentration plus faible que la concentration minimale inhibitrice (CMI) avait été utilisée (Beaulac *et al.*, 1998). Par la suite, l'efficacité *in vivo* des Fluidosomes™ a été démontrée lors de l'éradication d'une infection chronique pulmonaire chez un modèle animal alors que l'antibiotique libre n'avait pas été plus efficace que le contrôle tampon phosphate (PBS) (Beaulac *et al.*, 1996). L'efficacité bactéricide accrue des aminoglycosides encapsulés dans des Fluidosomes™ a également été démontrée dans un modèle animal d'infection pulmonaire aiguë par l'équipe du Dr Bakker-Woundenberg (Schiffelers *et al.*, 2001).

Nos études, et principalement le fait qu'une concentration plus faible que la CMI soit suffisante pour démontrer un effet bactéricide contre une souche résistante laisse supposer que le mécanisme d'action des liposomes fluides

implique une association directe avec la bactérie (Beaulac *et al.*, 1998; Sachetelli *et al.*, 2000). Plusieurs études ont été entreprises afin de comprendre le mécanisme d'action des Fluidosomes™. À l'aide de la microscopie électronique, de la cytométrie en flux et de tests d'association lipidique, il a été démontré que le mécanisme d'action des Fluidosomes™ met en jeu un phénomène de fusion membranaire avec la bactérie (Sachetelli *et al.*, 2000). Cette fusion est dépendante de la composition du milieu, de la température, mais aussi de la bactérie ciblée (Sachetelli *et al.*, 2000).

4.2 Les Fluidosomes™ et les cellules épithéliales de mammifères

Le premier objectif visé par l'utilisation des Fluidosomes™ est le traitement des infections pulmonaires chez les patients atteints de fibrose kystique. Dans cette optique, nous devons démontrer leur innocuité envers le patient. Des effets secondaires pour le patient auraient pour conséquence de limiter l'utilisation des Fluidosomes™. Un des aspects importants à vérifier était l'interaction des Fluidosomes™ avec les cellules pulmonaires pour s'assurer que l'entrée de l'antibiotique, dans les cellules de l'hôte, ne serait pas favorisée par les Fluidosomes™. Étant donné que certains antibiotiques peuvent être davantage toxiques dans ces conditions, cette situation pourrait être problématique.

Au cours de ce travail, nous avons démontré à l'aide de tests *in vitro* d'association lipidique qu'il n'y avait pas de fusion entre les Fluidosomes™ et les cellules épithéliales de poumons d'embryon humain (WI-38). Avant d'effectuer les tests d'association lipidique, qui ont permis d'apporter une réponse validée à notre questionnement, différents essais ont été effectués sans que ces derniers soient concluants. Des problèmes de marquage

radioactif de la tobramycine, la difficulté de différencier lors d'études de cytométrie entre le phénomène d'agrégations et de fusion nous ont finalement fait opter pour le test d'association lipidique en spectrophotométrie. Ce test est reconnu pour sa fiabilité depuis plusieurs années (Kumar *et al.*, 1982; Struck *et al.*, 1981; Nichols et Pagano, 1983; Chen *et al.*, 1999; R49; Garret *et al.*, 1999)

Les tests d'association lipidique sont pratiqués sur des cellules en suspension. Lorsque la diminution d'émission de l'accepteur était observée à 37°C durant deux heures, le taux de fusion des Fluidosomes™ était de 8,85% avec les cellules épithéliales comparativement à 71,50% avec *E. coli* wt et 33,90% avec *P. aeruginosa* 25619. L'augmentation de la fusion était un phénomène croissant durant toute la durée de l'expérience avec les deux bactéries alors qu'un plateau était observé après 40 minutes avec les cellules épithéliales. Les résultats obtenus à 4 et 37°C montrent que les taux de fusion des liposomes avec les cellules épithéliales sont pratiquement identiques indépendamment de la température (\cong 9%) alors qu'une diminution importante de la fusion est observée à 4°C pour les bactéries (5,46% pour *E. coli* et 4,71% pour *P. aeruginosa*). Compte tenu de ces données, le taux de fusion observé avec les cellules épithéliales est considéré comme du bruit de fond. Ce bruit de fond pourrait être dû à une interaction des liposomes avec les cellules mortes ou les débris cellulaires suite à la trypsination et la centrifugation. La comparaison des résultats obtenus à 37°C et 4°C permet de conclure qu'il n'y a pas eu de fusion entre les cellules épithéliales et les Fluidosomes™ lors des tests d'association lipidique.

4.3 Mécanisme d'action des Fluidosomes™

Afin d'expliquer l'absence d'interaction entre les Fluidosomes™ et les cellules épithéliales, il est important de comprendre les mécanismes qui favorisent la fusion. Comme mentionné dans la revue de la littérature, la composition des membranes impliquées, la composition du milieu et la température expérimentale sont les principaux facteurs affectant la fusion (New, 1990; R49; Rand, 1981; Lis *et al.*, 1982; R55; White *et al.*, 1983). Étant donné que les conditions expérimentales étaient les mêmes à l'exception de la composition des membranes cellulaires des bactéries et des cellules épithéliales, seul ce dernier élément pourrait expliquer la différence observée entre les taux de fusion. Il a été démontré que les bactéries et les cellules épithéliales ont des membranes très différentes. Premièrement, la structure des deux types de cellules est très différente, de plus, la composition phospholipidique de celles-ci semble jouer un rôle primordial. La membrane externe d'*E. coli* (Lugtemberg et Peters, 1976) est composée de 91% de phosphatidyléthanolamine (PE) et de 9% de phosphatidylglycérol (PG) alors que celle de *P. aeruginosa* (Anwar *et al.*, 1983) comporte 80% de PE et 12% de PG. Par contre, la membrane des cellules épithéliales, les MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) par exemple, est composée de 53% de phosphatidylcholine (PC), de 27% de PE, de 7% de phosphatidylinositol (PI) et de 8% de sphingomyéline (SME) (Hanssar *et al.*, 1986). De plus, dans le cas des cellules épithéliales, le PE se retrouve dans le feuillet interne de la membrane (Eastman *et al.*, 1992; Van Meer et Simons, 1986). Il en résulte une composition élevée de PC à la surface de la cellule. La distribution des molécules de PE et de PC à la surface des cellules épithéliales ainsi que la proportion élevée de PE influenceraient fortement le phénomène de fusion entre les Fluidosomes™ et les cellules. De plus, il est reconnu que la PE est un phospholipide fusogène qui favorise la fusion en déstabilisant la

membrane, une étape cruciale dans le phénomène de fusion (Cullis et de Kruijff, 1979; Sundler *et al.*, 1981). D'autre part, la PC inhiberait la fusion (Hui *et al.*, 1981; Cullis et de Kruijff, 1979). En conséquence, la membrane des cellules épithéliales ne favoriserait pas la fusion en raison: i) de l'absence de PE à la surface de la cellule et ii) la présence de PC à la surface de la cellule serait susceptible d'inhiber la fusion. À l'inverse, les bactéries favoriseraient la fusion à l'aide du PE à leur surface. Finalement, alors que les FluidosomesTM sont principalement composés de PC, il a été démontré que les FluidosomesTM ou d'autres vésicules composées de PC ne fusionnent pas ensemble (résultats non publiés).

4.4 Déstabilisation des membranes liposomales et phénomène de fusion

Il a été démontré qu'il n'y a pas de fusion entre les bactéries et les FluidosomesTM à 4°C comparativement à 37°C où celle-ci est présente. Une des explications est la fluidité des FluidosomesTM à 37°C comparativement à 4°C. Des études de DSC (pour *Differential Scanning Calorimetry*) sur les FluidosomesTM composés de DPPC/DMPG à un ratio de 10:1 ont démontré une déstabilisation à partir de 29,5°C (Beulac, 1995). Afin de vérifier si la fluidité était en relation avec le taux de fusion observé, une étude cinétique a été réalisée avec *E. coli* et *P. aeruginosa*. L'étude cinétique consistait à augmenter la température par plateaux. Chaque plateau durait 7 minutes et l'augmentation de température était de 3°C par plateau entre 7°C et 37°C. Les expériences ont révélé une augmentation du taux de fusion entre 28°C et 31°C pour les deux bactéries. Ceci coïncide avec les résultats obtenus en DSC. Ces résultats démontrent que la fluidité des FluidosomesTM est importante lors du processus de fusion. L'importance de la fluidité des liposomes à 37°C

est aussi supportée par des études avec des liposomes qui montrent que le fait d'ajouter une faible concentration de cholestérol augmente la stabilité de la membrane ce qui a pour effet d'inhiber la fusion.(résultats non publiés)

4.5 Importance de l'absence de fusion des Fluidosomes™ avec les cellules de mammifères

L'absence de fusion des Fluidosomes™ avec les cellules WI-38 comparativement à la fusion observée avec les bactéries est importante pour plusieurs raisons. Premièrement, lorsque les Fluidosomes™ sont administrés directement dans les poumons, on obtient un ciblage par compartimentation diminuant d'autant les risques d'exposition systémique. Même si les Fluidosomes™ passaient la barrière épithéliale et se rendaient dans le système sanguin, les risques seraient minimes puisque que les Fluidosomes™ ne fusionnent pas avec les cellules d'origine épithéliale. Il s'agit donc d'un type de ciblage indirect basé sur la composition des Fluidosomes™ qui favorise une fusion restreinte aux cellules bactériennes. Ce type de ciblage permet la diminution de la toxicité de la substance encapsulée et augmente la quantité de médicament qui se rend à la bactérie, diminuant d'autant la quantité de médicament nécessaire pour un traitement efficace. Finalement, l'augmentation de la quantité d'antibiotique à l'intérieur de la bactérie peut diminuer la résistance aux antibiotiques comme il a été démontré *in vitro* (Beaulac *et al.*, 1996).

4.6 L'Encapsulation des antisens et leur internalisation dans la bactérie

Comme expliqué précédemment, le mécanisme principal de résistance de *P. aeruginosa* est une imperméabilité membranaire associée à la présence de pompes à reflux qui rejettent un large éventail d'antibiotiques à l'extérieur de la cellule bactérienne (Angus *et al.*, 1982; Franklin, 1992; Yoshimura et Nikaido, 1982; Büscher *et al.*, 1987; Godfrey *et al.*, 1984; Lynch *et al.*, 1987; Yoneyama *et al.*, 1986; Gilleland *et al.*, 1989; De Kievit *et al.*, 2001; Poole, 2001). Les FluidosomesTM pourraient être utilisés pour contrecarrer cette forme de résistance car les FluidosomesTM sont en mesure de fusionner avec la double membrane bactérienne, facilitant ainsi le passage de l'antibiotique dans le cytoplasme bactérien. De plus, il semble que les pompes à reflux reconnaîtraient et expulseraient leurs substrats à partir de l'intérieur de la double couche de phospholipides de la membrane externe (Zgurskaya et Nikaido, 2000), le reflux se produisant sans l'accumulation d'agent bioactif dans le périplasme. Donc celui-ci serait extrait à partir de la membrane plutôt qu'à partir du cytosol puisque le taux et la cinétique de reflux ne sont pas directement reliés au contenu en agent bioactif du cytosol (Ashida, *et al.*, 1998). Cependant, les mécanismes de résistance qui impliquent la modification de la cible ou encore la sécrétion importante d'enzymes hydrolysant les antibiotiques ne peuvent pas être complètement résolus par les FluidosomesTM-antibiotiques, malgré un phénomène de synergie qui peut diminuer l'importance de ces phénomènes de résistance. C'est dans cette optique que notre laboratoire a proposé un nouveau type d'antibactérien, les molécules antisens.

Pour être en mesure d'étudier l'effet des antisens sur les bactéries, la première étape consistait à préciser les conditions expérimentales susceptibles de permettre l'encapsulation des antisens ou des plasmides dans les Fluidosomes™ dont la charge est négative. Comme exposé dans l'article de l'annexe 1, l'encapsulation s'est avérée relativement simple. Il est possible d'encapsuler des plasmides ou des molécules d'antisens avec une efficacité d'environ 30-45% à partir de la quantité initiale d'ADN (dépendant du type d'ADN). Nos travaux ont démontré que des tampons contenant des sels monovalents ou du PBS 1X peuvent être utilisés comme solution d'encapsulation de l'ADN, et ce avec des taux d'efficacité semblables. De plus, il a été démontré que l'ADN quantifié était bel et bien à l'intérieur des Fluidosomes™ et non complexé aux phospholipides des liposomes comme cela se produit souvent avec les liposomes cationiques (Audouy et Hoekstra, 2001; Lin *et al.*, 2000; Felgner *et al.*, 1995; Farhood *et al.*, 1994). Cette affirmation est basée sur les observations suivantes : la quantité d'ADN dans les Fluidosomes™ était équivalente que les Fluidosomes™ aient été traités ou non avec de la DNase (la DNase ne pénètre pas à l'intérieur des Fluidosomes™); l'ADN n'était pas détecté lorsque les Fluidosomes™ étaient observés sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium; finalement, l'ADN était détectable sur le gel d'agarose dans les échantillons contrôles suite à la lyse des Fluidosomes™.

La seconde étape consistait à analyser la pénétration des antisens encapsulés à l'intérieur des bactéries. Les expériences ont donné des résultats très concluants. Premièrement, lorsqu'un antisens fluorescent était encapsulé dans les Fluidosomes™ et incubé durant 4 heures à 37 °C avec les bactéries, 71,25% de celles-ci devenaient fluorescentes tel qu'observé lors des tests de cytométrie en flux. Par contre, dans les mêmes conditions, les bactéries

incubées avec les antisens libres ne présentaient un taux de fluorescence que de 8%. Pour discriminer entre les phénomènes de fusion et d'agrégation, une étude cinétique a été effectuée à 4 et 37°C. Les valeurs obtenues à 4 °C ont été soustraites des valeurs à 37 °C puisque nos études d'association lipidique démontrent qu'il n'y a pas de fusion à cette température. En conséquence, les résultats obtenus par cytométrie en flux indiquent un taux de fusion réelle de 51%, considérant que 20% de la fluorescence observée à 37°C correspond à une agrégation non-spécifique. Par la suite, afin de vérifier l'effet de l'antisens sur l'expression d'un gène, une molécule antisens complémentaire à la région d'initiation de la traduction du gène de la β -galactosidase a été utilisée avec *E. coli* CSH36, une bactérie qui exprime le gène de la β -galactosidase de manière constitutive. Lorsque la bactérie était incubée avec des FluidosomesTM contenant l'antisens encapsulé ou l'antisens seul, une diminution de l'expression du gène n'a été observée qu'en présence de l'antisens encapsulé dans les FluidosomesTM. Cette diminution était dépendante de la concentration d'antisens et de la période d'incubation. Un niveau maximal de 45% d'inhibition a été obtenu avec les antisens encapsulés. Ce niveau est conforme aux résultats obtenus en cytométrie montrant que 51% des cellules bactériennes avaient internalisé les antisens encapsulés. Ces expériences ont démontré i) qu'il était possible d'encapsuler des antisens dans les FluidosomesTM, ii) que l'antisens était en mesure de pénétrer dans la cellule et iii) d'inhiber l'expression du gène à l'aide des FluidosomesTM. Ces résultats sont très encourageants pour le développement de ce nouveau type d'antibactérien.

4.7 Conclusion

Nous avons démontré dans ce travail que les Fluidosomes™ ne fusionnent pas avec les cellules épithéliales lors d'études *in vitro*. En effet, les Fluidosomes™ ont démontré un taux d'interaction d'environ 9% avec ces cellules, et ce aussi bien à 4°C qu'à 37°C, ce qui suggère fortement qu'il s'agit d'un bruit de fond. Par contre, les taux de fusion obtenus avec *E. coli* et *P. aeruginosa* soit 71% et 39% respectivement à 37°C alors que le taux de fusion était d'environ 5% à 4°C démontre clairement le phénomène de fusion Fluidosomes™-bactéries. Cette étude nous a également permis de démontrer le ciblage naturel des Fluidosomes™ envers les bactéries versus les cellules épithéliales. Étant donné que nous supposons que la fusion était favorisée par l'état fluide des Fluidosomes™, nous avons entrepris une étude cinétique lors de laquelle le taux de fusion en fonction d'une augmentation de la température d'incubation était étudiée. Nous avons observé qu'entre 28°C et 31°C, il y avait une augmentation de la fusion entre les Fluidosomes™ et *E. coli* et *P. aeruginosa*. Ces valeurs coïncident avec les valeurs obtenues concernant la fluidité des Fluidosomes™ lors des études de DSC. Ceci supporte l'hypothèse que le caractère fluide des Fluidosomes™ est nécessaire pour l'interaction avec les bactéries. Finalement, les résultats d'inhibition de gènes à l'aide d'un nouveau type d'antibactérien, les antisens encapsulés dans les Fluidosomes™, laisse entrevoir une nouvelle forme de traitement des infections bactériennes.

Avant de tester les Fluidosomes™ chez l'humain, plusieurs expériences doivent être effectuées. Premièrement, l'interaction des Fluidosomes™ avec les cellules épithéliales devra être testée *in vivo*, chez un modèle animal pour confirmer les résultats obtenus lors des tests d'association lipidique. Pour ce

faire, des Fluidosomes™ contenant de la tobramycine pourraient être utilisés comme dans un traitement conventionnel. Ensuite, les poumons pourraient être récupérés et traités pour être étudiés en immunocytochimie afin de détecter la présence intracellulaire de tobramycine à l'aide de l'*immunogold*. Cette méthode a déjà été utilisée pour vérifier la présence de tobramycine à l'intérieur des bactéries. Des méthodes de fluorescence pourraient également être envisagées. La démonstration de l'absence d'interaction entre les Fluidosomes™ et les cellules épithéliales n'est qu'une étape importante dans la démonstration de l'innocuité du traitement des infections pulmonaires avec les Fluidosomes™. Finalement, des expériences avec des antisens ciblant des gènes essentiels devront être menées pour vérifier l'effet bactéricide de Fluidosomes™ contenant des antisens.

Les résultats obtenus sont prometteurs pour les patients atteints de fibrose kystique, pour lesquels il n'existe aucun traitement curatif ainsi que pour ceux atteints d'infections bactériennes résistantes aux antibiotiques traditionnels. Les Fluidosomes™ contenant de la tobramycine en plus de présenter une plus grande efficacité bactéricide que l'antibiotique libre ont une toxicité moindre que l'antibiotique libre. Ces caractéristiques sont obtenues principalement par la protection de l'antibiotique par les Fluidosomes™ ainsi que le ciblage naturel de ceux-ci. Ce ciblage naturel élimine la nécessité de ciblage spécifique à l'aide d'anticorps monoclonaux. Ce genre de ciblage pourrait stimuler le système immunitaire des patients atteints de fibrose kystique alors qu'une grande partie de leurs difficultés respiratoires est due à la surstimulation de leur système immunitaire au niveau pulmonaire. Finalement, en permettant aux antisens de pénétrer dans les cellules bactériennes, les Fluidosomes™-antisens devraient constituer une solution de rechange efficace pour lutter contre le phénomène croissant de résistance aux antibiotiques.

Bibliographie

Adinolfi, L.E., Bonventre, P.F., Pas, M.V. et Eppstein, D.A. (1985) Synergistic effect of glucantime and a liposome-encapsulated muramyl dipeptide analog in therapy of experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.*, **48**, 409-416.

Audouy, S. et Hoekstra, D. (2001) Cationic lipid-mediated transfection *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Membr. Biol.*, **18**, 129-43.

Alving, C.R. (1983) Delivery of liposome-encapsulated drugs to macrophages. *Pharmacol. Ther.*, **22**, 407-424.

Alving, C.R. et Steck, E.A. (1979) The use of liposome-encapsulated drugs in leishmaniasis. *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 175-200.

Alving, C.R. et Swartz, G.M. (1985) dans *Liposome technology*, Vol. II, Gregoriadis, G. (ed.), (Boca Raton, FL : CRC Press, inc.), pp. 58-68.

Alving, C.R., Steck, E.A., Chapman, W.L., Waits, V.B., Hendricks, L.D., Swartz, G.M. et Hanson, W.L. (1980) Liposomes in leishmaniasis: therapeutic effects of antimonial drugs, 8-aminoquinolines, and tetracycline. *Life Sci.*, **26**, 2231-2238.

Alving, C.R., Vledon, J.S., Munell, J.F. et Hanson, W.L. (1984) Liposomes in leishmaniasis : the lysosome connection. dans , Gregoriadis, G., Poste, G., Senior, J. et Trouet, A. (ed.) *Receptor-mediated targeting of drugs*, (New York : Plenum Press), p.317-332.

Anderson, P., Vilcek, J. et Weissmann, G. (1981) Entrapment of human leukocyte interferon in the aqueous interstices of liposomes. *Infect. Immun.*, **31**, 1099-103.

Angus, B.L., Carey, A.M., Caron, D.A., Kropinski, M.B. et Hancock, R.E.W. (1982) Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**, 299-309.

Anwar, H., Brown, M.R.W., Cozens, R.M. et Lambert, P.A. (1983) Isolation and characterization of the outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas cepacia*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 499-507.

Ashida, H., Oonishi, T. et Uyesaka, N. (1998) Kinetic analysis of the mechanism of action of the multidrug transporter. *J. Theor. Biol.*, **195**, 219-232

- Ashketar, D., Duzgunes, N. et Gangadharam, P. R. J. (1991) Activity of free and liposome encapsulated streptomycin against *Mycobacterium Avium* Complex (MAC) inside peritoneal macrophages. *J. Antimicrob. Chemo.*, **28**, 615-616.
- Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., Lokerse, A.F., Roerdink, F.H., Regts, D. et Michel, M.F. (1985) Free versus Liposome-Entrapped ampicillin in treatment of infection due to *Listeria monocytogenes* in normal and athymic (nude) mice. *J. Infect. Dis.*, **151**, 917-924.
- Bangham, A.D., Hill, M.W. et Miller, N.G.A. (1974) Dans Korn, E.D. (Ed.) *Methods in membrane biology*, Vol. 1. (New York, Plenum Press) p.1-68.
- Bangham, A.D., Standish, M.M et Watkins, J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252.
- Barenholz, Y., Gibbes, D., Litman, B.J., Goll, J., Thompson, T.E. et Carlson, F.D. (1977) A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **16**, 2806-2810.
- Beaudry, P.H., Marks, M.I., McDougall, D., Desmond, K. et Rangel, R. (1980) Is anti-Pseudomonas therapy warranted in acute respiratory exacerbations in children with cystic fibrosis? *J. Pediatr.*, **97**, 144-147.
- Beaulac, C., (1995) Élaboration et évaluation de chémoliposomes à action bactéricide anti-Pseudomonas aeruginosa chez un modèle animal d'infection chronique. *Mémoire de maîtrise, UQTR*.
- Beaulac, C., Clément-Major, S., Hawari, J. et 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., Sachetelli, S. et Lagacé, J. (1998) *In vitro* bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, **41**, 35-41.
- Betageri, G.V., Jenkins, S.A. et Parsons, D.L. (1993a) Pharmacokinetics of liposome products. dans *Liposome drug delivery systems* (Lancaster, Technomic Publishing Company Inc.) pp.47-64.
- Betageri, G.V., Jenkins, S.A. et Parsons, D.L. (1993b) Pharmaceutical applications of liposomes. dans *Liposome drug delivery systems* (Lancaster,

Technomic Publishing Company Inc.) pp.65-88.

Betageri, G.V., Jenkins, S.A. et Parsons, D.L. (1993c) Targeting of liposomes. dans *Liposome drug delivery systems* (Lancaster, Technomic Publishing Company Inc.) pp.89-108.

Boni, L.T., Hah, J.S., Hui, S.W., Mukherjee, P., Ho, J.T. et Jung, C.Y. (1984) Aggregation and fusion of unilamellar vesicles by poly-ethylene glycol. *Biochim. Biophys. Acta*, **777**, 409-418.

Bonventre, P.F. et Gregoriadis, G. (1978) Killing of intraphagocytic *Staphylococcus aureus* by dihydrostreptomycin entrapped within liposomes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **13**, 1049-1051.

Boshoff, C.H., Coetzee, L., Visser, L. et Verschoor, J.A. (1992) Spontaneous hybridoma formation induced by immunization with *Haemophilus paragallinarum* : evidence for a lipopolysaccharide fusion inducer. *Hybridoma*, **11**, 257-66.

Büscher, K.-H., Cullman, W., Dick, W. et Opferkuch, W. (1987) Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 703-708.

Chen, T., Choi, L.S., Einstein, S., Klippenstein, M.A., Scherrer, P. et Cullis, P.R. (1999) Proton-induced permeability and fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly(2-ethylacrylic acid). *J. Liposome Res.*, **9**, 387-405.

Cullis, P.R. et de Kruijff, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta.*, **559**, 399-420.

Cullis, P.R., Hope, M.J., Bally, M.B., Madden, T.D. et Mayer, L.D. (1987) Liposomes as Pharmaceuticals. dans Ostro, M.J. (ed.) *Liposomes from biophysics to therapeutics* (New York : Marcel Dekker, inc.), pp 39-72.

Davidson, R. N., Croft, S. L., Scott, A., Maini, M., Moody, A. H. et Bryceson, A. D. M. (1991) Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Lancet*, **337**, 1061-1062.

Dees, C., Fountain, M.W., Taylor, J.R. et Schulz, R.D. (1985) Enhancement of intraphagocytic killing of *Brucella abortus* in bovine mononuclear cells by liposomes containing gentamicin. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **8**, 171-182.

De Kievit, T.R., Parkins, M.D., Gillis, R.J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K.,

Iglewski, B.H., Storey, D.G. (2001) Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1761-1770.

Denton, M. et Wilcox, H. (1997) Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**, 468-474.

Desiderio, J.V. et Campbell, S.G. (1983) Liposome-encapsulated cephalothin in the treatment of experimental murine salmonellosis. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **34**, 279-287.

Djordjevich, L. et Ivankovich, A.D. (1988) Liposomes as carriers of hemoglobin dans Gregoriadis, G. (Ed) *Liposomes as drug carriers* (New York, John Wiley and Sons Ltd), pp.551-567.

Dodge, J.A., Morison, S., Lewis, P.A., Coles, E.C., Geddes, D., Russel, G., Jackson, A.D. et Bentley, B. (1993) Cystic fibrosis in the United Kingdom, 1968-88: incidence, population and survival. *Pediatr. Perinat. Epidemiol.*, **7**, 157-166.

Düzgünes, N., Wilschut, J., Fraley, R. et Papahajopoulos, D. (1981) Studies on the mechanism of membrane fusion. Role of head-group composition in calcium- and magnesium-induced fusion of mixed phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **642**, 182-195.

Eastman, S.J., Hope, M.J., Wong, K.F., Cullis, P.R. (1992) Influence of phospholipid asymmetry on fusion between large unilamellar vesicles. *Biochemistry.*, **31**, 4262-4268.

Eppstein, D. A. et Felgner, P. L. (1988) Applications of liposomes formulations for antimicrobial/antiviral therapy dans Gregoriadis, G. (ed.) *Liposomes as drug carriers* (New York, NY: John Wiley & Sons Ltd) pp. 311-323.

Eppstein, D.A. et Stewart II, W.E. (1981) Binding and capture of human interferon- α by reverse evaporation vesicles, multilamellar vesicles, and small unilamellar vesicles. *J. Interferon Res.*, **1**, 495-504.

Farhood, H., Gao, X., Son, K., Yang, Y.Y., Lazo, J.S., Huang, L., Barsoum, J., Bottega, R. et Eppard, R.M. (1994) Cationic liposomes for direct gene transfer in therapy of cancer and other diseases. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **716**, 23-34

Fee, W.E., Vierra, V. et Lathrop, D.R. (1978) Clinical evaluation of aminoglycoside toxicity: tobramycin vs gentamycin: a preliminary report. *J.*

Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 31-36.

Felgner, P.L., Tsai, Y.J., Sukhu, L., Wheeler, C.J., Manthorpe, M., Marshall J. et Cheng, S.H. (1995) Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **772**, 126-39

Fidler, I.J. (1989) The use of liposomes as drug carriers in the immunotherapy of cancer dans Roerdink, F.H.D. et Kroon, A.M. (eds) *Drug carrier systems* (New York, Jhon Wiley and Sons Ltd), pp.213-248.

Fidler, I.J., Sone, S., Fogler, W.E. et Barnes, Z.K. (1981) Eradication of spontaneous metastases by intravenous injection of liposomes containing dipeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1680-1684.

Fountain, M.W., Dees, C. et Schulz, R.D. (1985a) Enhanced intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by canine monocytes treated with liposomes containing amikacin, gentamicin, kanamycin and tobramycin. *Curr. Microbiol.*, **6**, 373-376.

Fountain, M.W., Weiss S.J., Fountain, A.G., Shen, A. et Lenk, R.P. (1985b) Treatment of *Brucella canis* and *Brucella abortus* *in vitro* and *in Vivo* by stable plurilamellar vesicle-encapsulated aminoglycosides. *J. Infect. Dis.*, **152**, 529-535.

Franklin, T.J. (1992) Bacterial resistance to antibiotics. In Hugo, W.B. et Russel, A.D. (ed.) *Pharmaceutical microbiology*, 5th ed. (Oxford: Blackwell Scientific Publications), pp.208-230.

Gangadharam, P.R.J., Ashtekar, D.A., Ghori, N., Goldstein, J.A., Debs, R.J. et Duzgunes, N. (1991) Chemotherapeutic potential of free and liposome encapsulated streptomycin against experimental avium complex infections in beige mice. *J. Antimicrob. Chemo.*, **28**, 425-435.

Garrett, F.E., Goel, S., Yasul, J. et Koch, R.A. (1999) Liposomes fuse with sperm cells and induce activation by delivery of impermeant agents. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1417**, 77-88.

Gilleland, L.B., Gilleland, H.E., Gibson, J.A. et Champlin, F.R. (1989) Adaptive resistance to aminoglycosides antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.*, **29**, 41-50.

Godfrey, A.J., Hatlelid, L. et Bryan, L.E. (1984) Correlation between lipopolysaccharide structure and permeability resistance in β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**, 181-186.

- Govan, J.R.W. et Harris, G.S. (1986) *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiol. Sci.*, **3**, 302-308.
- Graybill, J.R., Craven, P.C., Taylor, R.L., Williams, D.M. et Magee, W.E. (1982) Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associate amphotericin. *B. J. Infect. Dis.*, **145**, 748-752.
- Gregoriadis, G. (1988) Dans Gregoriadis, G. (ed.) *Liposomes as drug carriers*. (New York, John Wiley and Sons Ltd), pp.3-18.
- Gregoriadis, G. (1990) Immunological adjuvants, a role for liposomes. *Immunol. Today*, **11**, 89-97.
- Gregoriadis, G. et Neerunjun, E. (1974) Control of the rate of hepatic uptake and catabolism of liposome-entrapped proteins injected into rats. Possible therapeutic applications. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 179-185.
- Gregoriadis, G. et Ryman B.E. (1972) Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage diseases. *Eur. J. Biochem.*, **24**, 485-491.
- Gruner, S.M., Lenk, R.P., Janoff, A.S. et Ostro, M.J. (1985) Novel multilayered lipid vesicles: Comparison of physical characteristics of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles. *Biochemistry*, **24**, 2833-2842.
- Gurari-Rotman, D. et Lelkes, P.I. (1982) Encapsulation of human fibroblast interferon activity in liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **107**, 136-143.
- Hanssar, G.C., Simons, K. et Van Meer, G. (1986) Two strains of Mardin Darby Canine Kidney (MDCK) cell line have distinct glycopospholipid composition. *The EMBO J.*, **5**, 483-489.
- Hilman, B.C. (1997) Genetic and immunologic aspects of cystic fibrosis. *Ann. Allergy Immunol.*, **79**, 379-390.
- Hoiby, N. (1977) *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **Suppl. C 262**, 1-96.
- Hui, S.W., Stewart, T.P., Boni, L.T. et Yeagle, P.L. (1981) Membrane fusion through point defects in bilayers. *Science*, **212**, 921-923.
- Hwang, K.J. (1987) Liposome pharmacokinetics. dans Ostro, M.J. (ed.)

Liposomes from biophysics to therapeutics (New York : Marcel Dekker, inc.), pp 109-156.

Ipsen, J.H., Jorgensen, K. et Mouritsen, O.G. (1990) Density fluctuation un saturated phospholipid bilayers increase as the acyl-chain length decreases. *Biophys. J.*, **58**, 1099-1107.

Jones, G.R. et Cossins, A.R. (1990) Physical methods of study dans New, R.R.C. (ed) *Liposomes: a practical approach* (New York, Oxford University Press), pp.183-220.

Juliano, R.L. (1982) Liposomes and the reticuloendothelial system: interactions of liposomes with macrophages and behavior of liposomes *in vivo*. Dans Gregoriadis, G., Senior, J. et Trouet, A. (ed.) *Targeting of drugs*, (New York: Plenum Press), p.285.

Kellaway, I.W. et Farr, S.J. (1990) Liposomes as delivery systems to the lung. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **6**, 149-161.

Khalil, H., Chen, T., Desjardins, A., Zietarska, M., Sayasith, K. et Lagacé, J. (2001) Fusion between Fluidosomes™ and intact bacteria: I. Study of driving parameters. Submitted for publication.

Kimelberg, H.K. et Mayhew, E.G. (1979) Properties and biological effects of liposomes and their uses in pharmacology and toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.*, **6**, 25-79.

Koch, C. et Hoiby, N. (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*, **341**, 1065-1069.

Koff, W.C. et Fidler, I.J. (1985) The potential use of liposome-mediated antiviral therapy. *Antiviral Res.*, **5**, 179-190.

Koff, W.C., Fidler, I.J., Showalter, S.D., Charkrabarti, M.W., Hampar, B., Ceccorulli, L.M. et Leinerman, E.S. (1984) Human monocytes activated by immunomodulators in liposomes lyse herpes virus-infected but not normal cells. *Science*, **224**, 1007-1009.

Koff, W.C., Showalter, S.D., Charkrabarti, M.W., Hampar, B., Ceccorulli, L.M. et Leinerman, E.S. (1985) Human monocyte-mediated cytotoxicity against herpes simplex virus-infected cells : Activation of cytotoxic monocytes by free and liposomes-encapsulated lymphokines. *J. Leukocyte Biol.* **37**, 461-472.

Koff, W.C., Showalter, S.D., Seniff, D.A., Hampar, B. (1983) Lysis of herpes

virus-infected cells by macrophages activated with free or liposome-encapsulated lymphokine produced by a murine T cells hybridoma. *Infect. Immun.*, **42**, 1067-1072.

Kumar, N., Blumenthal, R., Henkart, M., Weinstein, J.N. et Klausner, R.D. (1982) Aggregation and calcium-induced fusion of phosphatidylcholine vesicle-tubulin complexes. *J. Biol. Chem.*, **257**, 15137-15144.

Kumar, V., Cotran, R.S. et Robbins, S.L. (1997) Genetic and pediatric diseases dans *Basic pathology*. (W.B. Saunders Compagny, Philadelphia). pp. 175-220.

Lai, J.Y., Chow, D.D., Hwang, K.J. (1988) Effect of lipid composition on insulin-mediated fusion of small unilamellar liposomes: a kinetic study. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 432-437.

Leenders, A.C., Reiss, P., Portegies, P., Clezy, K., Hop, W.C., Hoy, J., Borleffs, J.C., Allworth, T., Kauffman, R.H., Jones, P., Kroon, F.P., Verbrugh, H.A. et de Marie, S. (1997) Liposomeal amphotericin B (AmBiosome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*, **12**, 1463-1471.

Leserman, L. D., Barbet, J., Kourilsky, F. et Weinstein, J. N. (1980) Targeting to cells of liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature*, **288**, 602-604.

Leserman, L. et Machy, P. (1987) Ligand targeting of liposome. Dans Ostro, M.J. (ed.) *Liposomes from biophysics to therapeutics* (New York : Marcel Dekker, inc.), pp 157-194.

Levy, S.B. (1997) Antibiotic resistance: an ecological imbalance. dans Chadwick D.J. et Goode J. (eds.) *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*, Ciba Foundation Symposium 207 (New York, John Wiley and Sons) p.1-8.

Lin, A.J., Slack, N.L., Ahmad, A., Koltover, I., George, C.X., Samuel, C.E. et Safinya, C.R. (2000) Structure and structure-function studies of lipid/plasmid DNA complexes. *J. Drug. Target.*, **8**, 13-27

Lis, L.J., McAllister, M., Fuller, N., Rand, R.P. et Parsegian, V.A. (1982) Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes. *Biophys. J.*, **37**, 657-666.

Lopez-Berestein, G., Fainstein, V., Hopfer, R., Mehta, K., Sullivan, M.P., Keating, M., Rosenblum, M. G., Mehta, R., Luna, M., Hersh, E.M., Reuben, J., Juliano, R.L. et Bodey, G.P. (1985) Liposomal amphotericin B for the

treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. *J. Infect. Dis.*, **151**, 704-710.

Lugtenberg, B et Peters, R. (1976) Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta*, **441**, 38-47.

Lynch, M.J., Drusano, G.L. et Mobley, H.L.T. (1987) Emergence of resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 1892-1896.

MacLeod, D.L., Nelson, L.E., Shawar, R.M., Lin, B.B., Lockwood, L.G., Dirks, J.E., Miller, G.H., Burns, J.L. et Garber, R.L. (2000) Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J. Infect. Dis.*, **181**, 1180-1184.

Marks, M.I. (1980) The pathogenesis and treatment of pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J. Pediatr.*, **98**, 173-179.

Marra, J. et Israelechvili, J. (1985) Direct measurements of forces between phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers in aqueous electrolyte solutions. *Biochemistry*, **24**, 4608-4618.

Mazel, D. et Davis J. (1998) Antibiotic resistance: the big picture. dans Rosen, B.P. et Mobashery S. (eds.) *Resolving the antibiotic paradox* (New York, Kluwer Academic, Plenum Publishers) p.1-8.

Mehta, K., Juliano, R.L. et Lopez-Berestein, G. (1984) Stimulation of macrophages protease secretion via liposomal delivery of myramyl dipeptide derivatives to intracellular sites. *Immunology*, **51**, 517-527.

Milward, F.W., Nicoletti, P. et Hoffman, E. (1984) Effectiveness of various therapeutic regimens for bovine brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 1825-1828

Nacucchio, M. C., Di Rocco, P. H. et Sordelli, D. O. (1990) Liposomes as carriers for antibiotics dans Tyle, P. et Ram, B. P. (eds) *Targeted therapeutic systems* (New York, NY: Marcel Dekker, Inc.) pp. 337-354.

Nacucchio, M.C., Gatto-Bellora, M.J. Sordelli, D.O. et M. D'Aquino. (1985) Enhanced liposome-mediated activity of piperacilin against *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**, 137-139.

Nacucchio, M.C., Gatto-Bellora, M.J. Sordelli, D.O. et M. D'Aquino. (1986) Liposome-mediated antibacterial activity of gentamicin and piperacilin

against Gram-negative bacilli *in vitro*. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, p. 21.

New R.R.C., Chance, M.L., Thomas, S.C. et Peters, W. (1978) Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. *Nature*, **272**, 55-56.

New, R. R. C., Black, C. D. V., Parker, R. J., Puri, A. et Scherpf, G. L. (1990) Liposomes in biological systems. dans R. R. C. New (ed.) *Liposomes: a practical approach*. (New York, NY: Oxford University Press) pp.221-252.

New, R.R.C. (1990) Introduction dans New R.R.C. (ed.) *Liposomes a practical approach*. (New York, IRL Press), pp. 1-32.

New, R.R.C. et Chance, M.L. (1980) Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis by liposome-entrapped Pentostam. *Acta Trop.*, **37**, 253-256.

Nichols, J.W. et Pagano, R.E. (1983) Resonance energy transfer assay of protein-mediated lipid transfer between vesicles. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4368-5371.

Norley, S.G., Huang, L. et Rouse, B.T. (1986) Targeting of drug loaded immunoliposomes to herpes simplex virus-infected corneal cells: An effective means of inhibiting virus replication *in vitro*. *J. Immunol.*, **136**, 681-685.

Ohki, S. (1982) A mechanism of divalent ion-induced phosphatidylserine membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 1-11.

Ostro, M.J. (1987) Introduction. dans Ostro, M.J. (ed.) *Liposomes from biophysics to therapeutics* (New York : Marcel Dekker, inc.), pp vii-x.

Papahadjopoulos, D., Portis, A. et Pangborn, W. (1978) Calcium-induced lipid phase transitions and membrane fusion. *Ann N Y Acad Sci.*, **308**, 50-66.

Patterson, T.F. et Andriole, V.T. (1989) The role of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic fungal infections. *Euro. J. Cancer Clin. Oncol.*, **25 (Suppl 2)**, 563-568.

Pelczar, M.J., Chan, E.C.S et Krieg, N.R. (1993a) Prokaryotic and eukaryotic cell structure dans *Microbiology, Concepts and applications*. (McGraw-Hill, Inc., New York). pp. 106-152.

Pelczar, M.J., Chan, E.C.S et Krieg, N.R. (1993b) Antibiotics and other chemotherapeutic agents dans *Microbiology, Concepts and applications*.

(McGraw-Hill, Inc., New York). pp. 556-588.

Pelczar, M.J., Chan, E.C.S et Krieg, N.R. (1993c) Nosocomial infections dans *Microbiology, Concepts and applications*. (McGraw-Hill, Inc., New York). pp. 590-613.

Pitt, T.L. (1986) Biology of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to pulmonary infection in cystic fibrosis. *J. R. Soc. Med.*, **79**, 13-18.

Poole K. (2001) Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 255-264.

Popescu, M.C., Swenson, C.E. et Ginsberg, R.S. (1987) Liposome-mediated treatment of viral, bacterial, and protozoal infections. dans Ostro, M.J. (ed.) *Liposomes from biophysics to therapeutics* (New York : Marcel Dekker, inc.), pp 219-251.

Portis, A., Newton, C., Pangborn, W. et Papahajopoulos, D. (1979) Studies on the mechanism of membrane fusion: evidence for an intermembrane Ca²⁺-phospholipid complex, synergism with Mg²⁺, and inhibition by spectrin. *Biochemistry*, **18**, 780-790.

Poste, G. (1980) The interaction of lipid vesicles (liposomes) with cultured cells and their use as carriers for drugs and macro-molecules. dans Gregoriadis, G. et Allison, A.C. (eds.) *Liposomes in biological systems*. (New York: Wiley, J. and Sons) pp.101-151.

Poste, G., Bucana, B., Raz, A., Bugelski, P., Kirsch, R. et Fidler, I.J. (1982) Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery. *Cancer Res.*, **42**, 1412-1422.

Poste, G., Kirsh, R. et Koestler, T. (1984) Dans Gregoriadis, G. (ed.) *Liposome technology*, Vol. 3 (Florida, CRC Press, Boca Raton) p.1

Poznansky, M.J. et Juliano, R.L. (1984) Biological approaches to the controlled delivery of drugs: a critical review. *Pharmacol. Rev.*, **36**, 277-285.

Rahman, Y.E. (1988) Use of liposomes in metal poisonings and metal storage diseases dans Gregoriadis, G. (Ed) *Liposomes as drug carriers* (New York, John Wiley and Sons Ltd), pp.485-495.

Rahman, Y.E., Rosenthal, M.W., Cerny, E.A. et Moretti, E.S. (1974) Preparation and prolonged tissue retention of liposome-encapsulated

chelating agents. *J. Lab. Clin. Med.*, **83**, 640-7.

Rand, R.P. (1981) Interacting phospholipid bilayers: measured forces and induced structural changes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10**, 277-314.

Reed, S. G. (1988) Liposome-encapsulated lymphokine for the treatment of experimental visceral leishmaniasis dans Gregoriadis, G. (ed.) *Liposomes as drug carriers* (New York, NY: John Wiley & Sons Ltd.) pp. 337-344.

Rudolph, A.S., Klipper, R.W., Goins, B. et Phillipis, W.T. (1991) *In Vivo* biodistribution of a radiolabelled blood substitute: 99m Tc-labelled liposome-encapsulated hemoglobin in an anesthetized rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10976-10980.

Sachetelli, S., Beaulac, C., Riffon, R. et Lagacé, J. (1999) Evaluation of the pulmonary and systemic immunogenicity of Fluidosomes™, a fluid liposomal-tobramycin formulation for the treatment of chronic infections in lungs. *Biochim. Biophys. Acta*, **1428**, 334-340.

Sachetelli, S., Khalil, H., Chen, T., Beaulac, C., Sénéchal, S. et Lagacé, J. (2000) Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1463**, 254-266.

Sandler, E.S., Mustafa, M.M., Tkaczewski, I., Graham, M.L., Morrison, V.A., Green, M., Trigg, M., Abboud, M., Aquino, V.M., Gurwith, M. et Pietrelli, L. (2000) Use of amphotericin B colloidal dispersion in children, *J. Pediatr Hematol Oncol.*, **22**, 242-246.

Schentag, J.J., Cumbo, T.J., Jusko, W.J. et Plant, M.E. (1978) Gentamycin tissue accumulation and nephrotoxic reactions. *JAMA*, **240**, 2067-2069.

Schiffelers, R.M., Storm, G., ten Kate, M.T., Bakker-Woudenberg, I.A.J.M. (2001) Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated gentamicin in rat *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in relation to impaired host defense and low bacterial susceptibility to gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 464-470.

Sferra, T.J. et Collins, F.S. (1993) The molecular biology of cystic fibrosis. *Ann. Rev. Med.*, **8**, 3-7.

Shek, P.N. et Barber, R.F. (1986) Liposomes : a new generation of drug and vaccine carriers. *Mod. Med. Can.*, **41**, 314.

Smith, C.R., Maxwell, P.R., Edwards, C.O., Rogers, J.F. et Lietman, P.S. (1988)

Nephrotoxicity induced by gentamycin and amikacin. *Johns Hopkins Med. J.*, **142**, 85-90.

Steck, E.A. (1981) The chemotherapy of protozoal infections: Whither?. *J. Protozool.*, 28-30.

Stevenson, M., Baillie, A.J. et Richards, R.M.E. (1983) Enhanced activity of streptomycin and chloramphenicol against *Escherichia coli* in the J774 macrophage cell line mediated by liposome delivery. *Antimicrob Agents Chemother.*, **5**, 742-749.

Straubinger, R. M., Hong, K., Friend, D. S. et 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**, 1067-1079.

Struck, D.K., Hoekstra, D. et Pagano, R.E. (1981) Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry*, **20**, 4093-4099.

Sundler, R., Düzgünes, N. et Papahadjopoulos, D. (1981) Control of membrane fusion by phospholipid head groups. II. The role of phosphatidylethanolamine in mixtures with phosphatidate and phosphatidylinositol. *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 751-758.

Szoka, F., Jacobson, K. et Papahadjopoulos, D. (1980) Fluorescence studies of the mechanism of liposome-cell interactions *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **600**, 1-18.

Tadakuma, T., Ikewaki, N., Yasuda, T., Tsutsumi, M., Saito, S. et Saito, K. (1985) Treatment of experimental salmonellosis in mice with streptomycin entrapped in liposomes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **28**, 28-32.

Taylor, K.M.G. et Newton, J.M. (1994) Liposomes as a vehicle for drug delivery. *British Journal of hospital medicine*, **51**, 55-60.

Thys, J.P. et Klastersky, J. (1988) Local antibiotic therapy for bronchopulmonary infections. In Pennington, J.E. (ed.) *Respiratory infection: diagnosis and management* (New York, Raven), pp.632-647.

Ueda, S., Uchida, T. et Okada, Y. (1981) Selective killing of subacute sclerosing panencephalitis virus-infected cells by liposomes containing fragment A of diphtheria toxin. *Exp. Cell Res.*, **132**, 259-263.

Valerius, N.H., Koch, C., Hoiby, N. (1991) Prevention of chronic *Pseudomonas*

aeruginosa colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet*, **338**, 725-726.

Van Meer, G. et Simons, K. (1986) The function of tight junction in maintaining differences in lipid composition between the apical and basolateral cell surface domains of MDCK cells. *The EMBO J.*, **5**, 1455-1464.

Van Veen, H.W. et Konings, W.N. (1998) Structure and function of multidrug transporters dans Rosen, B.P. et Mobashery S. (eds.) *Resolving the antibiotic paradox* (New York, Kluwer Academic, Plenum Publishers) p.145-158.

Vemuri, S. et Rhodes, C.T. (1995) Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **70**, 95-111.

Vladimirski, M.A. et Ladigina, G.A. (1982) Antibacterial activity of liposome-entrapped streptomycin in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomedicine (paris)*, **36**, 375-377

Walsh, T.J., Finberg, R.W., Arndt, C., Hiemenz, J., Schwartz, C., Bodensteiner, D., Pappas, P., Seibel, N., Greenberg, R.N., Dummer, S., Schuster, M. et Holcenberg, J.S. (1999) Liposomal amphoterecin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National institute of allergy and infectious diseases mycoses study group. *N. Engl. J. Med.*, **340**, 764-771.

Watarai, S., Onuma, M., Yamamoto, S. et Yasuda, T. (1990) Inhibitory effect of liposomes containing sulfatide or cholesterol sulfate on syncytium formation induced by bovine immunodeficiency virus-infected cells. *J. Biochem.*, **108**, 507-509.

Webb, A.K. (1995) The treatment of pulmonary infection in cystic fibrosis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, **96**, 24-27.

Weinstein, J.N. (1981) Liposomes as « targeted » drug carriers : A physical chemical perspective. *Pure Appl. Chem.*, **53**, 2241-2254.

Weinstein, J.N. (1984) Liposomes as drug carriers in cancer therapy. *Cancer Treat. Rep.*, **68**, 127-135.

Weinstein, J.N. (1987) Liposomes in the diagnosis and treatment of cancer. dans Ostro, M.J. (ed.) *Liposomes from biophysics to therapeutics* (New York : Marcel Dekker, inc.), pp 277-338.

Weinstein, J.N. et Leserman, L.D. (1984) Liposomes as drug carriers in cancer

chemotherapy. *Pharmacol. Ther.*, **24**, 207-233.

Weldon, J.S., Munnell, J.F., Hanson, W.L. et Alving, C.R. (1983) Liposomal chemotherapy in visceral leishmaniasis: an ultrastructural study of an intracellular pathway. *Z. Parasitenkd*, **69**, 415-424.

Welsh, M.J. et Smith, A.E. (1995) Cystic fibrosis. *Scientific American*, **273**, 52-59.

White, J., Kielian, M. et Helenius, Ari. (1983) Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **16**, 151-195.

Willmott, R.W., Tyson, S.L. et Matthews, D.J. (1985) Cystic fibrosis survival rates. The influence of allergy and *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Dis. Child.*, **39**, 669-671.

Wilschut, J. et Hoekstra, D. (1986) Membrane fusion : lipid vesicles as a model system. *Chem. and Phys. of Lipids*, **40**, 145-166.

Wilson, R. et Dowling, R.B. (1998) *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax*, **53**, 213-219.

Wood, R.E., Boat, T.F. et Doershuk, C.F. (1976) Cystic fibrosis. *Am. Rev. Respr. Dis.*, **113**, 833-878.

Wright, G.D., Berghuis, A.M. et Mobashery S. (1998) Aminoglycosides antibiotics: structure, functions, and resistance. dans Rosen, B.P. et Mobashery S. (eds.) *Resolving the antibiotic paradox* (New York, Kluwer Academic, Plenum Publishers) p.27-70.

Wu, P.S., Wu, H.M., Tin, G.W., Schuh, J.R., Croasmun, W.R., Baldeschwieler, J.D., Shen, T.Y. et Ponpipom, M.M (1982) Stability of carbohydrate-modified vesicles *in vivo*: comparative effects of ceramide and cholesterol glycoconjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5490-5493.

Yoneyama, H., Akatsuka, A. et Nakae, T. (1986) The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a barrier against the penetration of disaccharides. *Biochem. Biophys. Research Comm.*, **134**, 106-112.

Yoshimura, F. et Nikaido, H. (1982) Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J. Bacteriol.*, **152**, 636-642.

Zgurskaya, H.I. et Nikaido, H. (2000) Multidrug resistance mechanisms : drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiol.*, **37**, 219-225

Zonneveld, G.M. et Crommelin, D.J.A. (1988) Liposomes: parental administration to man dans Gregoriadis, G. (Ed) *Liposomes as drug carriers* (New York, John Wiley and Sons Ltd), pp.795-817.