

Université de Montréal

**ÉTUDE DE FORMULATION D'UN IMMUNOMODULATEUR  
MYCOBACTÉRIEN: EFFETS DE SURFACTIFS SUR LA STABILITÉ  
ET SUR L'ACTIVITÉ**

par

Emmanuelle Roux  
Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du  
grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en Sciences pharmaceutiques

Août, 1999

© Emmanuelle Roux, 1999



P-5775 11/82

QV  
705  
U58  
2000  
v.004

Laboratoire de Biologie

ÉTUDE DE FORMULATION D'UN IMMUNOMODULATEUR  
MYCOBACTÉRIEN: EFFETS DE SURFACTES SUR LA STABILITÉ  
ET SUR L'ACTIVITÉ

par

Émile Florentin  
École de Pharmacie

Mémoire présenté à l'École des Études Supérieures en vue de l'obtention du  
Grade de Maître ès Sciences (M. Sc.) en Sciences Pharmaceutiques

1982

Émile Florentin, 1982



Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:

**ÉTUDE DE FORMULATION D'UN IMMUNOMODULATEUR  
MYCOBACTÉRIEN: EFFETS DE SURFACTIFS SUR LA STABILITÉ  
ET SUR L'ACTIVITÉ**

Présenté par:

Emmanuelle Roux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

président-rapporteur: Patrice Hildgen

directeur de recherche: Nigel C. Phillips

membre du jury: Jean-Norbert McMullen

Mémoire accepté le:

## SOMMAIRE

Les préparations de mycobactéries complètes et d'extraits de parois cellulaires mycobactériennes peuvent inhiber la croissance de tumeurs vésicales. Les préparations de fragments de la paroi mycobactérienne dérivées de *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) contiennent l'ADN mycobactérien sous forme de courts oligonucléotides complexés à la paroi cellulaire. Ces préparations ont la capacité d'induire l'apoptose chez les cellules cancéreuses, en plus de stimuler les monocytes/macrophages à produire de l'interleukine-12 (IL-12). La formulation actuelle, consistant en une émulsion d'huile minérale, est utilisée en phase clinique pour le traitement de cancers vésicaux. Or, les formulations pharmaceutiques contenant des huiles minérales ou organiques sont généralement restreintes à une administration topique à cause de leur toxicité systémique. Il serait possible d'étendre l'usage des préparations de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* à d'autres types de cancers par la mise au point d'une formulation parentérale appropriée pour une administration intraveineuse, intramusculaire et intratumorale.

Dans le but de développer une suspension aqueuse de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei*, nous avons évalué la capacité d'un certain nombre de surfactifs, dans des concentrations variant de 0,1 à 10 mg/ml, à prévenir l'agrégation des fragments, et évalué la stabilité de telles suspensions en fonction du temps d'incubation à diverses températures. Bien que les suspensions de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* (1 mg/ml) soient stables lors de l'incubation à 4 et 23 °C, une agrégation rapide des particules se produit à 37 et 55 °C. Par contre, l'ajout de 5 mg/ml de poloxamer 188, de 0,15 et 1 mg/ml de dodécyl sulfate de sodium (SDS) ou de



10 mg/ml de Tween 80 aux suspensions peut prévenir l'agrégation des particules lors de l'incubation à toutes les températures étudiées et ce, pour une période de 5 mois. Pour sa part, l'hyaluronate de sodium (HA) (1 mg/ml) stabilise les suspensions de fragments incubées à 4, 23 et 37 °C mais pas à 55 °C. Enfin, le désoxycholate de sodium ne peut prévenir l'agrégation des particules à 37 et 55 °C.

Nous avons ensuite étudié l'effet de la présence de ces surfactifs sur l'activité anticancéreuse *in vitro* des préparations de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei*. Sans aucun additif, ces préparations peuvent inhiber jusqu'à 70 % la croissance cellulaire des mélanomes de souris B16 et jusqu'à 59 % dans le cas des monocytes leucémiques humains THP1. Les surfactifs tels que le poloxamer 188 et le HA n'ont pas d'effet marqué sur cette activité alors que l'ajout de concentrations croissantes de SDS et Tween 80 amplifie l'inhibition de la croissance cellulaire induite par les fragments. Cette augmentation de l'activité des formulations est due à la toxicité du SDS et du Tween 80 pour les cellules. Les fragments de la paroi mycobactérienne ne présentent aucune toxicité sur ces cellules dans les concentrations testées, soit de 0,1 à 100 µg/ml.

Pour compléter les études d'activité, nous avons aussi évalué la toxicité des préparations de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* sur les macrophages de souris. Celles-ci sont cytotoxiques à partir de 10 µg/ml via l'induction de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages. Les surfactifs ont une toxicité similaire à celle observée sur les cellules B16 et THP1.

L'objectif de cette étude étant de développer une formulation injectable stable contenant un surfactif inerte, la mise en parallèle des résultats obtenus lors des études de stabilité avec ceux obtenus lors des études d'activité et de toxicité montre que 3

surfactifs à des concentrations bien précises sont appropriés pour une telle formulation.

Ce sont le SDS à 0.15 mg/ml, le HA à 1 mg/ml et le Poloxamer 188 à 5 mg/ml.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	III
LISTE DES TABLEAUX .....	X
LISTE DES FIGURES .....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES .....	XV
REMERCIEMENTS .....	XVII
<b>CHAPITRE: INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. LES PRÉPARATIONS DE PAROIS BACTÉRIENNES ET MYCOBACTÉRIENNES .....</b>	<b>2</b>
1.1 COMPOSITION DES PRÉPARATIONS DE PAROIS BACTÉRIENNES ET MYCOBACTÉRIENNES .....	2
<i>1.1.1 Les peptidoglycanes bactérien et mycobactérien .....</i>	<i>2</i>
<i>1.1.2 Le mycolate d'arabinogalactane mycobactérien.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3 Les lipides spécifiques de la paroi mycobactérienne.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.4 L'ADN bactérien.....</i>	<i>6</i>
1.2 LES IMMUNOMODULATEURS BACTÉRIENS .....	7
<i>1.2.1 De l'adjuvant de Freund au MDP.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.2 Les dimycolates de tréhalose.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.3 L'ADN bactérien.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.4 Les propriétés anticancéreuses des immunomodulateurs bactériens.....</i>	<i>11</i>
1.4 PROPRIÉTÉS ANTICANCÉREUSES DES PRÉPARATIONS DE LA PAROI MYCOBACTÉRIENNE DE <i>M. PHLEI</i> .....	13
1.5 L' APOPTOSE: DÉFINITION .....	15
<i>1.5.1 Caractéristiques morphologiques.....</i>	<i>15</i>
<i>1.5.2 Mécanismes biochimiques.....</i>	<i>16</i>
1.6 L'INHIBITION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE PAR LES FRAGMENTS DE LA PAROI MYCOBACTÉRIENNE DE <i>M. PHLEI</i> .....	18

1.7 LES PRÉPARATIONS DE FRAGMENTS DE LA PAROI MYCOBACTÉRIENNE DE <i>M. PHLEI</i> ET LE TRAITEMENT INTRAVÉSICAL ET/OU SYSTÉMIQUE DU CANCER .....	19
<b>2. LES SUSPENSIONS PHARMACEUTIQUES.....</b>	<b>22</b>
2.1 LES SUSPENSIONS ORALES.....	22
2.2 LES SUSPENSIONS TOPIQUES.....	24
2.3. LES SUSPENSIONS INJECTABLES.....	24
2.4. PROPRIÉTÉS FONDAMENTALES DES SUSPENSIONS .....	25
2.4.1 <i>Mouillage de la phase interne</i> .....	25
2.4.2 <i>Taille des particules</i> .....	26
2.4.3 <i>Potentiel zêta des particules</i> .....	27
2.5. STABILITÉ PHYSIQUE DES SUSPENSIONS .....	27
2.5.1 <i>Énergie de surface</i> .....	27
2.5.2 <i>Sédimentation de la phase interne</i> .....	28
2.5.3 <i>Forces géran les interactions entre les particules et agrégation</i> .....	29
2.6 FORMULATION DES SUSPENSIONS .....	30
2.6.1 <i>Les agents tensioactifs</i> .....	30
2.6.1.1 Propriétés et classification des agents tensioactifs .....	31
2.6.1.2 Stabilisation des suspensions .....	36
2.6.1.3 Influences des surfactifs sur la biodisponibilité et sur l'activité des substances biologiquement actives.....	38
2.6.1.4 Les tensioactifs et leur usage en formulation injectable .....	39
2.4.2. <i>Les colloïdes hydrophiles</i> .....	40
2.4.3 <i>Le système de solvant</i> .....	40
2.4.4. <i>Les agents osmotiques</i> .....	41
<b>3. OBJECTIFS .....</b>	<b>42</b>
<b>PRÉSENTATION DES MANUSCRIPTS.....</b>	<b>44</b>
<b>CHAPITRE 2: FORMULATION AND STABILITY OF MYCOBACTERIUM PHLEI CELL WALL FRAGMENT SUSPENSIONS.....</b>	<b>45</b>
ABSTRACT .....	47
1. INTRODUCTION .....	48

2. MATERIALS AND METHODS .....	50
2.1. <i>Materials</i> .....	50
2.2. <i>Methods</i> .....	51
2.2.1. <i>Preparation of M. phlei cell wall fragment suspensions</i> .....	51
2.2.2. <i>Particle size measurement</i> .....	52
2.2.3. <i>Particle zeta (<math>\zeta</math>) potential</i> .....	52
2.2.4. <i>Particle stability after autoclaving</i> .....	53
2.2.5. <i>Bacterial endotoxin determination</i> .....	53
3. RESULTS .....	53
3.1. <i>Size distribution and particle <math>\zeta</math> potential of M. phlei cell wall fragments after sonication or microfluidization</i> .....	53
3.2. <i>Effect of surfactant on cell wall particle <math>\zeta</math> potential</i> .....	54
3.3. <i>Effect of storage on physical stability</i> .....	54
3.4. <i>Effect of autoclaving on physical stability and <math>\zeta</math> potential</i> .....	57
3.5. <i>Endotoxin levels of M. phlei cell wall fragments suspensions</i> .....	58
4. DISCUSSION .....	59
4.1. <i>Preparation of M. phlei cell wall fragments suspensions</i> .....	59
4.2. <i>Physical interaction between M. phlei cell wall fragments and surfactants</i> .....	60
4.3. <i>Stability of M. phlei cell wall fragments suspensions</i> .....	61
5. CONCLUSION .....	63
REFERENCES .....	65
<b>CHAPITRE 3: TUMOR CELL DIVISION INHIBITORY ACTIVITY AND CELLULAR TOXICITY OF MYCOBACTERIUM PHLEI CELL WALL SUSPENSIONS</b> .....	<b>80</b>
ABSTRACT .....	82
INTRODUCTION .....	83
MATERIALS AND METHODS .....	85
<i>Materials</i> .....	85
<i>Methods</i> .....	86
<i>Preparation of M. phlei cell wall fragment suspensions</i> .....	86

<i>Particle size measurement</i> .....	87
<i>Inhibition of B16 melanoma cell and THP1 leukemia cell proliferation</i> .....	87
<i>Murine peritoneal inflammatory exudate macrophages</i> .....	88
<i>Toxicity</i> .....	89
<i>Nitric oxide synthesis</i> .....	90
RESULTS AND DISCUSSION .....	90
<i>Effect of storage on physical stability</i> .....	90
<i>Inhibition of cancer cell division by M. phlei cell wall fragments</i> .....	92
<i>Effect of storage on M. phlei cell wall fragment formulation antitumor cell activity</i> . 93	
<i>Toxicity of M. phlei cell wall fragment formulations towards cancer cells</i> .....	94
<i>Toxicity of M. phlei cell wall fragments towards murine macrophages</i> .....	96
REFERENCES.....	98
<b>CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION</b> .....	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>125</b>

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1: INTRODUCTION

**Tableau 1.1:** Valeurs de HLB de certains surfactifs..... 31

**Tableau 1.2:** Structures et applications de certains surfactifs..... 35

### CHAPITRE 2: FORMULATION AND STABILITY OF *MYCOBACTERIUM PHLEI*

#### CELL WALL FRAGMENT SUSPENSIONS

**Table 1:** Effect of sonication and microfluidization on particle size and  $\zeta$  potential of *M. phlei* cell wall fragments..... 72

**Table 2:** Effect of autoclaving in the presence of surfactants on *M. phlei* cell wall fragment  $\zeta$  potential..... 73

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1: INTRODUCTION

- Figure 1.1:** Monomère du peptidoglycane des mycobactéries constitué d'un disaccharide (N-acétylglucosamine et acide muramique glycolyl) lié à un tétrapeptide L-Ala-D-iso-Gln-L-*meso*-DAP-D-Ala..... 3
- Figure 1.2:** Structure de l'acide mycolique dicarboxylique contenu dans le glycolipide de *M. phlei*..... 4
- Figure 1.3:** 6,6'-dimycolate de  $\alpha,\alpha$ -D-tréhalose (TDM). Les résidus d'acides mycoliques des mycobactéries contiennent de 80 à 90 atomes de carbone..... 5
- Figure 1.4:** Structure de l'acide hexatriacontapentaène-4,8,12,16,20-oïque (acide C<sub>36</sub>-phléique) présent dans la paroi mycobactérienne de *M. phlei*..... 6
- Figure 1.5:** N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine ou muramyl dipeptide (MDP)..... 8



CHAPITRE 2: FORMULATION AND STABILITY OF *MYCOBACTERIUM PHLEI*  
CELL WALL FRAGMENT SUSPENSIONS

**Figure 1:** The effect of different surfactants on the  $\zeta$  potential of *M. phlei* cell wall fragments. The  $\zeta$  potential of *M. phlei* cell wall fragment suspensions was determined in the presence of the different surfactants in the concentration range 0.1 to 10  $\mu\text{g/ml}$ ..... 74

**Figure 2:** Average particle size of *M. phlei* cell wall fragment suspensions after 4 weeks of storage at (A) 4°C, (B) 23°C, (C) 37°C and (D) 55°C..... 76

**Figure 3:** Average particule size of *M. phlei* cell wall fragments suspensions during 22 weeks of storage at (A) 4°C, (B) 23°C, (C) 37°C and (D) 55°C..... 78

**Figure 4:** Changes in mean particle size of *M. phlei* cell wall fragments suspensions after autoclaving at 121°C for 20 minutes..... 79

### CHAPITRE 3: TUMOR CELL DIVISION INHIBITORY ACTIVITY AND TOXICITY OF *MYCOBACTERIUM PHLEI* CELL WALL SUSPENSIONS

**Figure 1:** Effect of storage on *M. phlei* cell wall fragment particle size. The mean particule size of *M. phlei* cell wall fragments suspensions was determined after 22 weeks of storage at (A) 4°C, (B) 23°C, (C) 37°C and (D) 55°C by photon correlation spectroscopy..... 107

**Figure 2:** *M. phlei* cell wall fragments inhibit cell division of B16 melanoma cells and THP1 leukemia cells..... 108

**Figure 3:** *M. phlei* cell wall fragments formulated with different surfactants inhibit cell division of B16 melanoma cells. The effect of the different surfactants alone or in combination with *M. phlei* cell wall fragments (0.1-100 µg/ml) on B16 melanoma cell division was determined. *M. phlei* cell wall fragments formulated with different concentration of (A) sodium dodecyl sulfate, (B) sodium hyaluronate, (C) poloxamer 188 and (D) Tween 80..... 110

**Figure 4:** Cytotoxicity of *M. phlei* cell wall fragments formulated with different surfactants towards B16 melanoma cells. The cytotoxic activity of the different surfactants alone or in combination with *M. phlei* cell wall fragments (0.1-100 µg/ml) was determined. *M. phlei* cell wall fragments formulated with different concentration of

(A) sodium dodecyl sulfate, (B) sodium hyaluronate, (C) poloxamer 188 and (D) Tween  
80. .... 112

**Figure 5:** (A) Cytotoxicity of *M. phlei* cell wall fragments formulated with different  
surfactants towards murine macrophages. (B) Induction of macrophage NO $\cdot$  synthesis by  
*M. phlei* cell wall fragments..... 114

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES

A	aire
ADN	acide désoxyribonucléique
BCG	bacille de Calmette-Guérin
CMC	concentration micellaire critique
CWS	squelette de parois mycobactériennes
DDAB	bromure de didécyl diméthylammonium
DLVO	Deryaguin, Landau, Verwey et Overbeek
FCA	adjuvant complet de Freund
FIA	adjuvant incomplet de Freund
g	accélération gravitationnelle
G	énergie libre de surface
HA	hyaluronate de sodium
HLB	équilibre hydrophile/hydrophobe
ICE	enzyme de conversion interleukine-1 $\beta$
IL	interleukine
LDH	lactate déshydrogénase
MER	résidu de BCG extrait au méthanol
MDP	muramyl dipeptide
MDP-Lys(L18)	N alpha-(N-acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl)-N epsilon-stéaroyl-L-lysine
MTP	muramyl tripeptide

MTP-PE	muramyl tripeptide phosphotidyléthanolamine
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2yl)-2,5-diphényl-2 <i>H</i> -tétrazolium
NK	lymphocyte tueur naturel
PARP	polymérase poly(ADP-ribose)
PEG	polyéthylène glycol
PGM	disaccharide-pentapeptide du peptidoglycane
Pu	purine
Pyr	pyrimidine
r	rayon
s	vitesse de sédimentation
SDS	dodécyl sulfate de sodium
TCR	récepteur de cellules T
TDM	dimycolate de tréhalose
TNF	facteur de nécrose tumorale
TNFR1	récepteur 1 du facteur de nécrose tumorale
$\rho$	densité
$\zeta$	potentiel zêta
$\gamma$	tension de surface
$\eta$	viscosité

## REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord exprimer ma reconnaissance à mon directeur de recherche, le Docteur Nigel Phillips, pour sa confiance, sa compétence exceptionnelle et ses conseils d'une grande rigueur scientifique.

Je remercie également mes collègues de laboratoire, Miriam Kabbaj et Anh Thu Pham, pour leur amitié et l'encouragement qu'elles m'ont prodigué. Je remercie particulièrement Pierre-Jean Alarco pour son aide et son soutien constant.

Finalement, je remercie la compagnie Bioniche pour son support financier.

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

# **1. LES PRÉPARATIONS DE PAROIS BACTÉRIENNES ET MYCOBACTÉRIENNES**

## **1.1 COMPOSITION DES PRÉPARATIONS DE PAROIS BACTÉRIENNES ET MYCOBACTÉRIENNES**

Les fragments de parois mycobactériennes sont des complexes macromoléculaires qui se composent principalement de lipides, de glucides et de peptides, majoritairement issus de la structure maîtresse de la paroi mycobactérienne. Celle-ci est constituée de deux polymères, un peptidoglycane et un mycolate d'arabinogalactane, liés entre eux par des liaisons phosphodiesters, où viennent s'ancrer d'autres constituants tels que des lipides et des chaînes peptidiques (Petit, 1978). De plus, les fragments de la paroi mycobactérienne contiennent l'ADN mycobactérien complexé sur la surface de la paroi cellulaire sous la forme de courts oligonucléotides (Filion et coll., 1997).

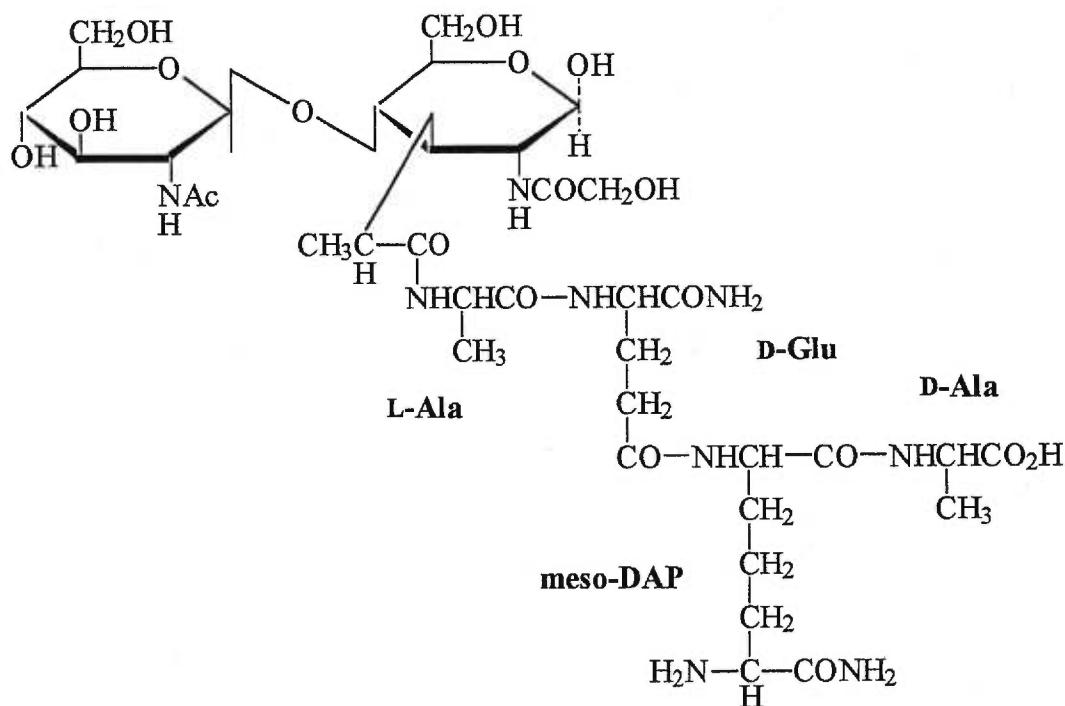
### **1.1.1 Les peptidoglycanes bactérien et mycobactérien**

Le peptidoglycane est un polymère construit avec des chaînes de polysaccharides constituées d'unités de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique où sont liées de courtes chaînes peptidiques. Dans le cas des mycobactéries, les unités de disaccharides contiennent de l'acide muramique glycolyl plutôt que le dérivé N-acétylé rencontré dans les peptidoglycanes de la plupart des bactéries (Azuma et coll., 1970). Les peptides sont liés



entre eux, joignant ainsi les chaînes de polysaccharides pour former une macromolécule complexe. Les peptidoglycanes se divisent selon quatre types de base, différenciés par la façon dont les peptides sont liés entre eux (Ghuysen, 1968). Or, dans les mycobactéries, on retrouve le même térapeptide diaminé L-Ala-D-iso-Gln-L-*meso*-(acide  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -diaaminopimelique)-D-Ala (figure 1.1) (Wietzerbin-Falszpan et coll., 1970).

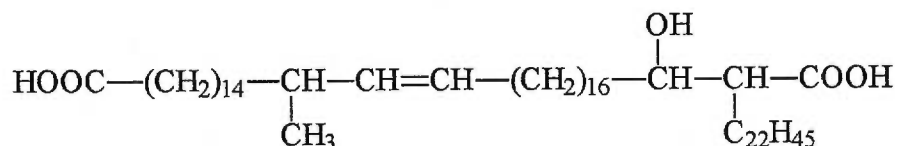
La structure minimale active dérivée du peptidoglycane est le N-acyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (ou N-acétyl-muramyl-) ou muramyl dipeptide (MDP). L'activité du MDP a fait l'objet de maintes études, comme il le sera décrit subséquentment.



**Figure 1.1:** Monomère du peptidoglycane des mycobactéries constitué d'un disaccharide (N-acétylglucosamine et acide muramique glycolyl) lié à un térapeptide L-Ala-D-iso-Gln-L-*meso*-DAP-D-Ala.

### 1.1.2 Le mycolate d'arabinogalactane mycobactérien

Le mycolate d'arabinogalactane est un glycolipide constitué d'acides mycoliques estérifiés avec un arabinogalactane. Les mycobactéries sont caractérisées par la présence de ces acides mycoliques qui sont de très gros acides gras (entre 60 et 90 carbones),  $\alpha$ -ramifiés et  $\beta$ -hydroxylés. Ils sont présents dans le glycolipide sous la forme d'un mélange d'homologues, différant selon l'origine de la mycobactérie. Dans la paroi cellulaire de *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*), l'homologue principal est l'acide mycolique dicarboxylique (figure 1.2) (Lederer et coll., 1975).

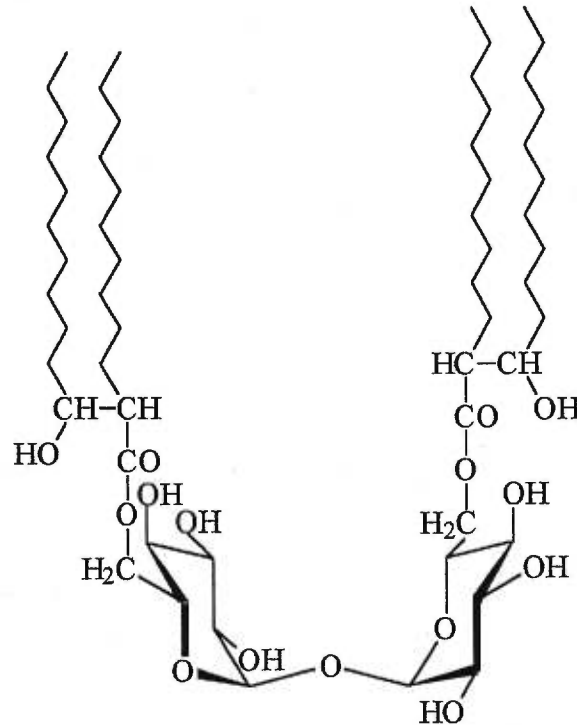


**Figure 1.2:** Structure de l'acide mycolique dicarboxylique contenu dans le glycolipide de *M. phlei*.

### 1.1.3 Les lipides spécifiques de la paroi mycobactérienne

En plus du mycolate d'arabinogalactane lié au peptidoglycane, la paroi mycobactérienne contient une série de glycolipides, dont le 6,6'-dimycolate de  $\alpha,\alpha$ -D-tréhalose (TDM), aussi appelé «cord factor» (figure 1.3). Il se présente généralement sous la forme de diesters, homogènes ou mixtes, d'acides mycoliques. Le TDM possède

des propriétés immunomodulatrice qui seront discutées à la section 1.1.2 (Lemaire et coll., 1986).



**Figure 1.3:** 6,6'-dimycolate de  $\alpha,\alpha$ -D-tréhalose (TDM). Les résidus d'acides mycoliques des mycobactéries contiennent de 80 à 90 atomes de carbone.

*M. phlei* contient aussi, outre le «cord factor», des dérivés du tréhalose beaucoup plus lipophiles. Ils consistent en une famille de polyesters de tréhalose avec des acides gras polyinsaturés, les acides phléiques. Le terme principal de ceux-ci est l'acide hexatriacontapentaène-4,8,12,16,20-oïque, présentant des doubles liaisons de géométrie *cis* en positions paires (figure 1.4). Dans cette famille, on retrouve notamment l'octaphléate de tréhalose, où le dissaccharide est complètement estérifié par des acides phléiques (Asselineau et coll., 1969; Asselineau et coll., 1972).



**Figure 1.4:** Structure de l'acide hexatriacontapentaène-4,8,12,16,20-oïque (acide C<sub>36</sub>-phléique) présent dans la paroi mycobactérienne de *M. phlei*.

#### 1.1.4 L'ADN bactérien

Deux points importants distinguent L'ADN bactérien de l'ADN des mammifères: Premièrement, les cytosines sont normalement méthylées dans l'ADN de mammifère, alors que cette base ne l'est pas dans l'ADN bactérien. En second lieu, L'ADN des mammifères montre une proportion beaucoup plus faible de dinucléotides cytosine et guanine (C+G) que celle prévue par une distribution au hasard, alors que l'ADN bactérien possèdent, de façon générale, la distribution attendue (Bird, 1987; Hergersberg, 1991).

Les mycobactéries ont un taux particulièrement élevé de C+G dans leur ADN, soit entre 64 et 70%, hormis *M. laprae* et *M. lufu* dont l'ADN a un taux de C+G de 58 et 61%, respectivement (Clark-Curtiss, 1990). Pour sa part, l'ADN de *M. phlei* contient 69% de C+G. Comme il le sera discuté à la section 1.2.3, la séquence particulière des bases de l'ADN bactérien est un élément responsable de son activité immunomodulatrice.

## 1.2 LES IMMUNOMODULATEURS BACTÉRIENS

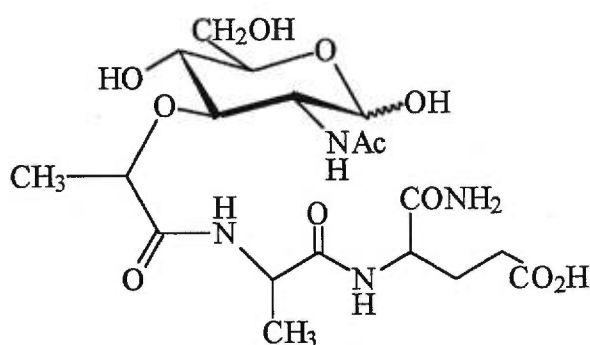
### 1.2.1 De l'adjuvant de Freund au MDP

Le plus connu des immunomodulateurs mycobactériens est sans nul doute l'adjuvant complet de Freund (FCA), constitué de mycobactéries non-actives et de mono-oléates dans une émulsion eau-dans-huile, majoritairement composée d'huile minérale (Freund, 1956). Les adjuvants sont utilisés à des fins thérapeutiques dans le but d'augmenter la réponse immunitaire à un antigène particulier qu'on incorpore dans la phase aqueuse de l'émulsion. Bien que le FCA soit un puissant immunogène, son utilisation comporte de multiples problèmes et dangers (Broderson, 1989; Kleinman et coll., 1993; Claassen et coll., 1992; Steiner JW et coll., 1960; Stills and Bailey, 1989; Stills 1994). Au site d'injection, le FCA cause une réponse inflammatoire chronique d'où peut résulter la formation de granulomes et d'abcès, et/ou de nécrose tissulaire. Les expositions multiples au FCA conduisent à des réactions d'hypersensibilité sévères.

L'adjuvant incomplet de Freund (FIA) est une émulsion identique au FCA, mais ne contient pas de mycobactérie. La production d'anticorps qu'il induit contre un antigène est toutefois de 10 à 20 fois inférieure que celle normalement obtenue avec le FCA. Le FIA peut aussi causer la formation de granulomes et d'abcès, mais ces réactions sont généralement moins sévères que celles qui accompagnent l'utilisation du FCA.

En 1958, White et coll. ont rapporté qu'une des composantes de la paroi mycobactérienne de *M. tuberculosis* ou de *M. Kansasii*, appelée «wax D», pouvait remplacer les mycobactéries dans le FCA. Le «wax D» contient un arabinogalactane

estérifié avec des acides mycoliques et lié à un fragment du peptidoglycane. Il a ensuite été démontré que seule la sous-unité de répétition de certains peptidoglycane bactériens et mycobactériens pouvait aussi remplacer les mycobactéries dans le FCA (Adam et coll., 1974). De cette structure a été identifiée la composante minimale active du peptidoglycane, le MDP, d'origine synthétique (figure 1.5) (Ellouz et coll., 1974).



**Figure 1.5:** N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine ou muramyl dipeptide (MDP).

Il a été démontré que le MDP augmente la résistance non-spécifique aux bactéries, aux champignons, aux infections virales et au cancer (Choon Yoo et coll., 1995; Hui, 1994). Le MDP stimule le système immunitaire en modulant l'activité des monocytes/macrophages et des lymphocytes-T et -B (Oppenheim et coll., 1980; Hadden, 1994). Il stimule aussi la production de facteurs de nécrose tumorale (TNF), d'interleukine-1 (IL-1), d'IL-6 et d'interféron-gamma chez la souris et chez les bovins (Adams et coll., 1995; Choon Yoo et coll., 1995; Parant et coll., 1995).

### 1.2.2 Les dimycolates de tréhalose

Les dimycolates de tréhalose sont obtenus par leur extraction des bactéries ou par synthèse. Ils sont fréquemment utilisés en émulsion dans des huiles minérales, végétales, du squalane ou du squalène, mais ils peuvent aussi être utilisés en suspension en solution aqueuse. Le TDM est un puissant immunostimulant et a été utilisé lors d'immunothérapie non spécifique contre le cancer comme immunomodulateur positif (Azuma, 1992). *In vivo*, il est capable d'induire la synthèse d'IL-12 et de stimuler les macrophages de souris à produire de l'oxyde nitrique, et à développer une activité antitumorale avec leur activation avec de faibles doses de liposaccharides (Oswald et coll., 1997). De plus, il a été démontré que le TDM, employé seul ou en combinaison avec le MDP, augmente la résistance des souris aux bactéries telles que *Klebsiella pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* (Parant et coll., 1977). Le TDM peut aussi protéger les souris contre diverses infections parasitaires et contre le virus de l'influenza et le virus EMC (encéphalomyocardite) (Masihi et coll., 1984, Guillemard et coll., 1993).

### 1.2.3 L'ADN bactérien

De tous les immunomodulateurs bactériens, le bacille Calmette-Guérin (BCG), une souche vivante de *Mycobacterium bovis*, est certainement l'un des plus connus, étant notamment utilisé comme traitement intravésical des cancers de la vessie chez l'humain (Morales, 1980). Les études réalisées afin de définir les composantes du BCG possédant des propriétés immunomodulatrices ont conduit à l'isolation d'une fraction d'acides

désoxyribonucléiques causant la régression de tumeurs transplantées *in vivo*. L'efficacité de cette fraction, constituée à 70,0% d'ADN et 28,0% d'ARN, fut accrue après sa digestion avec des RNases, suggérant que l'ADN du BCG possède une forte activité antitumorale (Tokunaga et coll., 1984). Aucune cytotoxicité directe sur les tumeurs ne fut établie, indiquant que cette fraction agit en stimulant le système immunitaire (Shimada et coll., 1985). La résistance aux tumeurs induite par l'ADN résulte de l'augmentation de l'activité des lymphocytes tueurs naturels (NK). *In vitro*, l'ADN du BCG stimule la production d'interféron- $\gamma$  et d'interféron- $\alpha/\beta$ , ce dernier étant le médiateur principal de l'augmentation de cellules NK (Yamamoto et coll., 1988). A partir d'une sélection d'oligonucléotides simple brin contenant une séquence de cADN codant pour une protéine de *Mycobacterium bovis*, des oligonucléotides de 45 bases contenant un motif de 6 bases ont pu être identifiés comme responsables de l'induction de l'activité des cellules NK. Pour être efficace, le motif de 6 bases doit être de 2 purines 5' et de 2 pyrimidines 3' centrées sur une séquence CpG non méthylée (Tokunaga et coll., 1992; Yamamoto et coll., 1992; Yamamoto et coll., 1994). Il semble que l'ADN bactérien et les oligonucléotides avec des motifs immunostimulants agissent en augmentant la sécrétion d'IL-12 et de TNF-alpha qui sont d'importants stimulants de la production d'interférons par les cellules T et NK (Halpern et coll., 1996).

En plus de sa capacité à stimuler les cytokines, l'ADN bactérien est un mitogène pour les lymphocytes B des souris. Le motif responsable de cette stimulation est identique à celui impliqué dans la stimulation d'interférons, celui-ci étant le 5' Pu-Pu-CpG-Pyr-Pyr (Krieg et coll., 1995). Or, certaines séquences différentes peuvent aussi stimuler les cellules B, comme les poly dG (Pisetsky et Reich, 1993). Les oligonucléotides CpG



peuvent aussi bloquer l'apoptose des cellules B, en plus d'induire leur production d'IL-6 (Krieg et coll., 1995; Yi et coll., 1996).

#### **1.2.4 Les propriétés anticancéreuses des immunomodulateurs bactériens**

Bien que le BCG soit un agent immunothérapeutique efficace, son usage est toutefois limité par certaines réactions secondaires associées à son utilisation et par le risque de complications subséquentes à l'infections des patients par la mycobactérie elle-même (Israel-Biet et coll., 1987; Orihuela et coll., 1987). Les désavantages liés à l'utilisation de bactéries vivantes comme agents immunothérapeutiques ont conduit au développement de dérivés d'immunomodulateurs bactériens. Ainsi, des préparations de parois mycobactériennes ont fait l'objet de multiples études quant à leur activité antitumorale.

Les peptidoglycanes isolés de certaines bactéries se sont montrés efficaces comme agents antitumoraux. L'utilisation du peptidoglycane complet de *Bifidobacterium infantis* possède une grande efficacité sur la régression de tumeurs établies chez la souris (Sekine et coll., 1985), alors que le monomère du peptidoglycane (disaccharide-pentapeptide, PGM) de *Brevibacterium divaricatum* peut inhiber la croissance de carcinomes pulmonaires et la formation de métastases suite à l'implantation de tumeurs sous-cutanées chez la souris (Sava et coll., 1983). *In vitro*, le traitement de différentes lignées de cellules tumorales humaines et de souris avec le peptidoglycane de *Lactobacillus casei* a donné lieu à une diminution de leur viabilité de 25-30% (Fichera et Giese, 1994).

Pour sa part, le MDP possède une activité antitumorale par son effet immunomodulateur, la première cible cellulaire de celui-ci étant les monocytes/macrophages, tel que mentionné précédemment. *In vitro*, les macrophages requièrent une exposition prolongée au MDP pour l'induction d'une activité antitumorale (Sone et Fidler, 1981). Or, des études pharmacocinétiques ont montré que le MDP est rapidement excrété suite à son administration par voie parentérale (Ambler et Hudson, 1984), suggérant que, *in vivo*, l'exposition des macrophages au MDP ne peut être suffisante pour obtenir l'effet désiré. Ainsi, plusieurs dérivés plus actifs du MDP permettant une action ciblée, dont le romurtide (MDP-Lys(L18)), un dérivé stéaroyl, et le muramyl tripeptide phosphatidyléthanolamine encapsulé dans des liposomes (MTP-PE), ont fait l'objet d'études. Par exemple, le MDP-Lys(L18) inhibe les métastases pulmonaires après l'inoculation de mélanomes B16 et de carcinomes du colon 26-M3.1 chez la souris (Yoo et coll., 1994). Le MDP non-dérivé, encapsulé dans des liposomes, s'est aussi avéré efficace dans la prévention du développement de métastases après l'inoculation de carcinomes au colon (Daemen et coll., 1990). Enfin, le MTP-PE encapsulé dans des liposomes a été étudié en phases cliniques quant à sa capacité d'activation des monocytes sanguins périphériques et d'induction des IL-6 et TNF-alpha chez des patients atteints du cancer (Creaven et coll., 1990; Frost et coll., 1990; Liebes et coll., 1992).

Le TDM s'est aussi avéré efficace dans la prévention du développement de tumeurs. Des souris et des rats préalablement traités au TDM se sont vu protégés contre la croissance de tumeurs injectées (Lepoivre et coll., 1982; Nolibe et coll., 1986; Orbach-Arbouys et coll., 1983). Le TDM possède aussi une action sur les tumeurs établies: Chez

la souris atteinte de fibrosarcome 1023, le TDM de *M. Bovis* et son analogue synthétique C<sub>76</sub> ont tous deux induit une régression complète de la tumeur suite à leur administration intralésionale (Yarkoni et coll., 1978). Chez le cochon d'Inde possédant une tumeur dermique et des métastases dans les nodules lymphatiques régionaux, le TDM, injecté en combinaison avec le MDP, a aussi causé une régression de la tumeur en plus d'éliminer les métastases (Yarkoni et coll., 1981). Plus récemment, des injections intraveineuses multiples chez la souris de TDM et de monomycolate de glucose de *Nocardia rubra*, contenant des acides mycoliques C<sub>36-48</sub>, ont démontré un effet antitumoral marqué sur un sarcome implanté par voie sous-cutanée (Natsuhara et coll., 1990).

#### **1.4 PROPRIÉTÉS ANTICANCÉREUSES DES PRÉPARATIONS DE LA PAROI MYCOBACTÉRIENNE DE *M. PHLEI***

Il a été démontré que *M. phlei* possède des caractéristiques immunologiques similaires à celle du BCG et que l'extrait de sa paroi mycobactérienne possède une activité anticancéreuse (Gray et coll., 1975). Des thérapies intravésicales utilisant une préparation de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* dans une émulsion d'huile minérale (Regressin®, Bioniche, London, Ontario, Canada) ont provoqué une réduction de la masse tumorale des tumeurs cystiques chez la souris (Kadhim et coll., 1993; Chin et coll., 1996) et chez des patients atteints de carcinome de vessie (Morales et Chin, 1997). De plus, en médecine vétérinaire, les préparations de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* (Regressin-V®, Vetrepharm, London, Ontario, Canada) sont utilisées pour

l'immunothérapie de tumeurs mixtes de la glande mammaire ou d'adénocarcinomes mammaires chez le chien et de sarcoïdes chez le cheval. Comparativement à l'utilisation des extraits non-vivants de BCG, *M. phlei* a l'avantage de se propager et de se cultiver plus facilement, en plus d'être aisément disponible. En effet, cette mycobactérie peut être trouvée dans le sol, dans les plantes ou dans l'eau potable (Mallick et coll., 1985; Papapetropoulou et coll., 1997).

Le mécanisme d'action des préparations de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* sur les cellules cancéreuses de la vessie est encore méconnu. La puissante activité immunostimulante de *M. phlei* contre les infections virales et parasitaires a déjà été rapportée (Mallick et coll., 1985; Tewari et coll., 1996) et tout récemment, il a été démontré que les fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* ont la propriété d'induire, *in vitro* et *in vivo*, la synthèse de cytokine IL-12 par les monocytes et les macrophages (Filion et coll., 1997). Cette cytokine montre une puissante activité anti-tumorale suite à leur administration locale ou systémique (Stern et coll., 1996). Or, une étude sur des cellules humaines provenant de tumeurs vésicales ne produisant pas de IL-12 en réponse aux fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* démontre que ces derniers agissent directement sur ces cellules cancéreuses en réduisant leur prolifération suivi de l'induction de leur apoptose (Filion et coll., 1999).

## **1.5 L'APOPTOSE: DÉFINITION**

L'apoptose est le mécanisme par lequel les cellules sont programmées à mourir en réponse à divers stimulus. C'est un processus physiologique normal qui se produit tant durant le développement embryogénique que dans la maintenance de l'homéostasie des tissus. L'apoptose est un phénomène impliqué dans plusieurs pathologies, telles que la maladie d'Alzheimer, le rejet de greffons, le cancer et le SIDA (Kitamura et coll., 1998; Lin et coll., 1998; Thompson 1995; Wang et coll., 1998). L'apoptose se distingue de la nécrose cellulaire tant par ses caractéristiques morphologiques que biochimiques.

### **1.5.1 Caractéristiques morphologiques**

Les changements structuraux cellulaires associés à cette mort sont propres à l'apoptose. Ceux-ci comprennent des changements dans la membrane plasmique, comme la perte de l'asymétrie et de la fixation membranaire due aux extensions du cytosol. Ceci est suivi d'une condensation irréversible du cytoplasme, d'une augmentation de la densité cellulaire, de la compaction des organelles cytoplasmiques et de la condensation de la chromatine nucléaire. Les pores nucléaires disparaissent de la membrane sous-jacente à la chromatine condensée (Majno et Joris, 1995). La phosphatidylsérine, localisée seulement à la surface cytoplasmique de la membrane cellulaire chez les cellules normales, bascule de l'intérieur de la membrane vers l'extérieur pour se localiser sur les deux surfaces membranaire (Koopman et coll., 1994). Ainsi, les cellules apoptotiques peuvent être

reconnues et phagocytées par les cellules voisines ou par des phagocytes spécialisés, sans générer de réaction inflammatoire (Fadok et coll., 1992).

Les effets de l'apoptose diffèrent de ceux de la nécrose, conséquence d'une lésion cellulaire ou d'une exposition à des produits chimiques cytotoxiques. Lors de cette dernière, les cellules gonflent, les structures nucléique et cytosolique changent mais la disposition générale de la chromatine est maintenue, ainsi que les pores nucléiques.

Au cours du processus apoptotique, l'ADN des cellules est coupé dans les régions liantes entre les nucléosomes, conduisant à des fragments d'ADN qui sont des multiples de 180-200 paires de bases (Wyllie, 1980). Ces fragments peuvent être visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose comme une échelle caractéristique. D'autre part, l'ADN des cellules nécrotiques est coupé au hasard et une bande diffuse est obtenue par électrophorèse sur gel.

### **1.5.2 Mécanismes biochimiques**

L'apoptose peut être induite en réponse à divers stimuli comme l'activation de récepteurs à la surface cellulaire (Fas, récepteurs 1 de facteurs de nécroses tumorales (TNFR1) ou récepteurs des cellules T (TCR)) (Beutler, 1990; Brunner et coll., 1995), la déficience de facteurs de croissance protéiques (Collins et Lopez-Rivas, 1993), les hormones comme les glucocorticoïdes (Schwartzman et Cidlowski, 1994) et les radiations UV (Martin et Cotter, 1991). Bien qu'une grande diversité de signaux peuvent induire l'apoptose, ses chemins d'exécution partagent plusieurs traits caractéristiques.

L'un des mécanismes constamment impliqués dans l'apoptose consiste en l'activation d'une série de protéases cytosoliques, les caspases.

Plusieurs des mécanismes génétiques impliqués dans l'apoptose des cellules de mammifères ont originalement été élucidés par l'étude des mutants du nématode *Caenorhabditis elegans* (Hengartner et Horvitz, 1994). Deux gènes nécessaires à l'initiation de sa mort cellulaire programmée ont alors été identifiés, le *ced-3* et le *ced-4*. Le gène *ced-4* encode un polypeptide de fonction inconnue alors que le gène *ced-3* encode une protéine montrant une grande similarité avec une famille de protéases cystéines, incluant l'ICE (enzyme de conversion de l'interleukin-1 $\beta$ ), présente chez les cellules de mammifères (Yuan et coll., 1993). «Caspase» est le nom donné à tout les membres de cette famille de protéases et reflète leurs propriétés catalytiques, le «c» dénotant leur mécanisme de protéase cystéine et le «aspase», leur capacité à cliver après les résidus d'acide aspartique. Les caspases d'importance pour l'apoptose sont les caspase-2, -3, -6, -7 et -10.

Les caspases sont probablement les effecteurs les plus importants impliqués dans le mécanisme apoptotique. Ils sont synthétisés sous la forme de précurseurs inactifs (pro-enzymes) et sont activés par clivage autocatalytique ou par d'autres protéases. En plus de se lier avec leurs ligands respectifs, les récepteurs FAS et TNFR1 s'oligomérisent et s'associent avec des protéines additionnelles, incluant les formes proenzymatiques des caspases-2 et -8. Ces pro-enzymes sont alors transformés en leur forme active, menant à une amplification de ce premier signal par un clivage protéolytique des autres caspases, dénommée comme la «cascade des caspases». Les cibles connues des caspases actives sont, notamment la polymérase poly(ADP-ribose) (PARP) (Lazebnik et coll., 1994) et la

protéine kinase dépendante de L'ADN (DNA-PKcs), toutes deux impliquées dans la reconnaissance des dommages à l'ADN et de sa réparation, la ribonucléoprotéine U1 et les composantes du cytosquelette comme l'actine. Deux revues de la littérature traitants du rôle des caspases dans le mécanisme apoptotique ont été faites par Cohen (1997) et Nicholson et Thornberry (1997).

## **1.6 L'INHIBITION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE PAR LES FRAGMENTS DE LA PAROI MYCOBACTÉRIENNE DE *M. PHLEI***

Des études sur les cellules humaines HT-1197 et HT-1376 provenant de tumeurs vésicales ont montré la capacité des fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* à inhiber leur prolifération en fonction de la concentration utilisée, tout en étant non cytotoxique pour ces mêmes cellules. L'apoptose fut démontrée par l'étude de la fragmentation de l'ADN nucléaire et par la libération de protéines de la matrice nucléaire comme NuMA (Filion et coll., 1999), faits caractéristiques du mécanisme apoptotique (Newell et coll., 1990; Miller et coll., 1993). La cytokine IL-12 est capable d'induire l'apoptose chez plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Stine KC et coll, 1996) mais n'étant pas synthétisée par les cellules HT-1197 et HT-1376, cela suggère une induction directe de l'apoptose par les fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei*. De plus, l'ADN extrait des fragments de la paroi mycobactérienne est aussi capable d'induire l'apoptose de ces cellules, mais de façon moins importante que les fragments complets. Le traitement des fragments de la paroi mycobactérienne ou de l'ADN de *M. phlei* extrait de ceux-ci avec des Dnases a donné lieu à une perte d'activité significative, indiquant que



l'ADN de *M. phlei* joue un rôle central dans l'induction de l'apoptose de ces cellules cancéreuses (Filion et coll., 1999).

## **1.7 LES PRÉPARATIONS DE FRAGMENTS DE LA PAROI MYCOBACTÉRIENNE DE *M. PHLEI* ET LE TRAITEMENT INTRAVÉSICAL ET/OU SYSTÉMIQUE DU CANCER**

Les propriétés antitumorales des fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* en font un traitement prometteur des cancers vésicaux. De plus, des études sur d'autres lignées de cellules cancéreuses en sont arrivées aux mêmes conclusions quant à son potentiel thérapeutique (Phillips, 1999). Il est donc possible d'envisager d'étendre l'utilisation de ces préparations de la paroi mycobactérienne par une administration parentérale.

Les fragments de la paroi mycobactérienne étant des complexes insolubles, leur mode d'administration reste à définir. Les traitements actuels sont effectués par administration intra-tumorale, sous la forme d'une émulsion d'huile minérale. Or, la toxicité systémique des injections d'huile est bien connue (Miller et coll., 1996; Rollins et coll., 1997). L'utilisation de l'adjuvant de Freund a montré que l'huile minérale n'étant pas métabolisée, elle est excrétée par la peau via les granulomes et les abcès, ou phagocytée par les macrophages. La toxicité systémique et les désordres pathologiques associés avec l'utilisation de ce type d'adjuvant immunitaire ont donc restreint son usage (Steiner et coll., 1960; Tal et Laufer, 1960; Steblay, 1963). A cause de ces problèmes, les injections dans l'huile ont, de façon générale, diminuées au profit des suspensions aqueuses. Le

TDM, normalement administré par voie intraveineuse en émulsion dans l'huile minérale, cause la formation de granulomes aux poumons et ce, en relation avec la quantité d'huile injectée (Yarkoni et coll., 1977 McLaughlin et coll., 1978). La toxicité, mesurée par la mortalité des animaux traités, est aussi liée à une forte concentration d'huile (Yarkoni et Rapp, 1977). Par contre, chez la souris, la majorité des effets toxiques des formulations de TDM contenant de l'huile ont été éliminés par l'utilisation d'une suspension aqueuse (Orbach-Arbouys et coll., 1983). D'autre part, les préparations de parois mycobactériennes en suspensions aqueuses ne sont pas sans complications. Ainsi, l'administration par voie intraveineuse d'un résidu de BCG extrait au méthanol (MER) en suspension aqueuse chez 64 patients atteints du cancer a causé le développement de granulomes aux poumons chez 13.7% des sujets (Maroun et coll., 1970). De plus, aucune réponse objective ne fut notée chez les patients, hormis chez un patient atteint de métastases aux poumons, où une légère régression d'une lésion pulmonaire fut observée, tandis que les lésions à la peau progressèrent. Une seconde étude portant sur la toxicité et les effets immunologiques de suspensions aqueuses de squelettes de parois mycobactériennes de BCG (CWS), seuls ou en combinaison avec du TDM, administrées par voie intraveineuse chez 26 patients a menée a des résultats similaires (Vosika et Gray, 1983). Encore une fois, aucun effet antitumoral ne fut observé. Bien qu'aucune toxicité pulmonaire n'apparut, une forte toxicité hépathique eu lieu, avec une augmentation des phosphatases alcalines et des transférases gamma glutamyl. Pourtant, l'utilisation de la combinaison CWS/TDM en émulsion dans l'huile pour le traitement local d'effusions malignes pleurales et péritonéales avait déjà donné un taux de réponse de 44% (Richman et coll., 1981). D'après ces derniers résultats, on ne peut comprendre aisément pourquoi

les extraits de parois mycobactériennes sont inefficaces lors de leur administration intraveineuse, alors qu'au niveau d'une administration intralésionale, un effet antitumorale est observé. Pourtant, les études utilisant des préparations aqueuses ne font pas mention des aspects de formulations, ce qui porte à croire qu'aucune caractérisation physique des suspensions ne fut effectuée. On peut penser que lors de l'étude de Maroun et coll. (1970), l'inefficacité des fragments aurait été due à une filtration des particules en suspension par le lit capillaire pulmonaire, conduisant ainsi à la formation de granulomes. Les particules, dans le cas où leur diamètre excède celui des capillaires sanguins, se retrouvent rapidement hors de la circulation sanguine. D'autre part, l'étude de Vosika et Gray (1983) suggère un capture des particules par le système réticuloendothélial (RES), d'où la forte toxicité hépatique. Ceci n'est toutefois qu'une hypothèse, cette toxicité pouvant avoir une autre source, d'origine inconnue. Ainsi, les aspects de formulations peuvent être d'une importance cruciale, tant au niveau de l'activité que de la sécurité d'utilisation des préparations pharmaceutiques. Une étude de formulation d'une suspension aqueuse de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* reste à faire.

## **2. LES SUSPENSIONS PHARMACEUTIQUES**

Les systèmes dispersés sont constitués de deux phases non-miscibles: Une phase continue agissant comme véhicule et une phase dispersée constituée de fines gouttelettes de liquide ou de particules solides. Les suspensions réfèrent à cette dernière classe particulière de système microdispersé où la phase interne, consistant en une distribution homogène ou hétérogène de particules solides, est maintenue uniforme dans le temps, plus souvent à l'aide d'agents de suspensions. Contrairement à une solution, les particules suspendues présentent un degré minimum de solubilité dans la phase externe. Lorsque les solides suspendus ont une taille inférieure à 1  $\mu\text{m}$ , le système est une suspension colloïdale. Lorsque la taille des particules est supérieure à 1  $\mu\text{m}$ , le système est une suspension grossière.

Les suspensions pharmaceutiques sont divisées en trois classes: Les suspensions administrées oralement, les suspensions topiques et les suspensions injectables (parentérales).

### **2.1 LES SUSPENSIONS ORALES**

L'utilisation de suspensions orales peuvent être bénéfique surtout chez les enfants, pour qui le dosage peut être difficile à contrôler, et chez les patients qui souffrent de problèmes de déglutition ,pour qui les comprimés peuvent être difficiles à avaler. De plus, en comparaison avec les comprimés ou les capsules, la biodisponibilité de certains

médicaments administrés par voie orale peut être accrue par cette forme de dosage, comme dans le cas de la phénytoïne (Sansom et coll., 1975). Ceci n'est toutefois pas une règle générale, la biodisponibilité selon la forme de dosage étant indentique pour la sulfadiazine (Meyer et coll., 1979) et même inférieure dans le cas d'une suspension d'itraconazole (Christensen et coll., 1998). La biodisponibilité des suspensions orales a aussi été étudiée en comparaison avec d'autres voies d'administration. Par exemple, celle-ci peut être équivalente à celle obtenue par l'administration d'une solution intraveineuse, comme dans les cas du méthocarbamol chez les rats (Obach et coll., 1988) et de la carbamazépine chez l'humain (Gerardin et coll., 1990).

Le contenu en solide d'une suspension orale peut varier considérablement. Par exemple, les préparations d'antibiotiques peuvent contenir de 125 à 500 mg de matériel solide actif par 5 mL. Le véhicule peut être un sirop, une solution de sorbitol ou une solution aqueuse épaissie à l'aide de gommes auxquelles ont été ajouté des agents sucrants. Le présence des agents sucrants tels que le sorbitol ou le mannitol dans les suspensions d'antiacide permet aussi de stabiliser la réactivité de l'hydroxyde d'aluminium et prévient sa polymérisation (Nail et coll., 1976; Vanderlaan et coll., 1982). Dans les cas où la stabilité chimique du médicament insoluble est limitée, la forme de dosage peut être reconstituée à partir d'un mélange de poudres sèches auquel on ajoute de l'eau avant l'usage.

## **2.2 LES SUSPENSIONS TOPIQUES**

Les préparations dermatologiques, telle que la calamine USP, sont liées de près au développement technique des suspensions pharmaceutiques (Gable et coll., 1953; Escabi et Dekay, 1956). Étant donné la facilité d'évaluer la sécurité et la toxicité en terme d'acceptabilité dermatologiques, plusieurs agents de suspensions ont été introduits initialement lors de formulations topiques (Goldstein, 1952). Ces agents de suspensions peuvent avoir un effet sur l'activité de telles préparations. En effet, l'efficacité anesthésique de la lidocaine en suspension s'est vue accru selon le type de surfactifs utilisé dans sa formulation (Kushla et coll., 1993). Les anesthésiants sont un bon exemple où l'utilisation topique peut être privilégiée par rapport à une autre forme d'administration. La lidocaine pour anesthésie dermique est souvent utilisée sous forme injectable mais une étude montre que l'application d'une suspension topique peut procurer la même efficacité, tout en évitant toutefois la douleur causée par les injections (Ernst et coll., 1997).

## **2.3 LES SUSPENSIONS INJECTABLES**

Le contenu en solide d'une suspension parentérale est généralement compris entre 0,5% et 5%, à l'exception des formes insolubles de pénicilline où les concentrations d'antibiotiques peuvent dépasser 30%. Les préparations peuvent être pour des administrations intramusculaire, intradermique, intralésionale, intra-articulaire ou sous

cutanée. Elles doivent être stériles, exemptes de pyrogène, stables, injectables, isotoniques et non-irritantes. Ces suspensions peuvent être formulées pour être prêtes à l'emploi ou pour être reconstituées avant l'usage. L'utilisation d'une telle forme de dosage comporte certains avantages, dont l'usage thérapeutique de médicaments insolubles dans les solvants conventionnels et la possibilité d'une action par dépôt ou par libération contrôlée (Chien, 1981). Par ailleurs, les désavantages associés aux suspensions injectables résident en la difficulté de formulation et de manufacture, l'inconfort du patient, le contrôle de l'uniformité et de la précision dans le dosage au moment de l'administration et le maintien d'une stabilité physique.

## **2.4 PROPRIÉTÉS FONDAMENTALES DES SUSPENSIONS**

### **2.4.1 Mouillage de la phase interne**

La tension de surface ( $\gamma$ ) est définie comme l'énergie libre par unité de surface pour une aire interfaciale donnée. Elle peut aussi être considérée comme une mesure des forces d'attraction entre les molécules de la phase considérée. On définit les solides insolubles qui ont une tension interfaciale relativement faible et qui sont immédiatement mouillés par l'eau comme des solides hydrophiles. Ceux-ci incluent, entre autres, les argiles, les hydroxydes ou les oxydes de calcium et les carbonates. Par ailleurs, les solides insolubles qui ne sont pas aisément mouillés par l'eau et qui possèdent une tension interfaciale élevée sont des solides hydrophobes. Un grand nombre de composés

organiques de faible densité ainsi que plusieurs substances pharmaceutiques sont de ce groupe de solides insolubles, tels l'aspirine et la progestérone. Les solides hydrophobes peuvent être suspendus en milieu aqueux à l'aide d'agents mouillants ou dispersants.

#### 2.4.2 Taille des particules

La taille moyenne et l'étendue de la distribution des particules en suspensions peuvent avoir un effet profond sur les propriétés de tels systèmes. La taille des particules a une influence sur le taux de sédimentation, la solubilité du médicament et son absorption *in vivo*. De plus, le contrôle de la taille des particules est d'autant plus important si la suspension est vouée à un usage parentéral. Le diamètre des capillaires sanguins limite ainsi la taille des particules en suspensions injectables à 5  $\mu\text{m}$  afin d'éviter les risques d'emboli *in vivo* (Takifuji et Tanimura, 1998).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour déterminer la taille des particules sous la forme de "diamètres sphériques équivalents". Pour certaines particules, il y a au moins quatre types de diamètres sphériques équivalents. Le diamètre de surface,  $d_s$ , est le diamètre d'une sphère qui possède la même aire. Le diamètre de volume,  $d_v$ , est le diamètre d'une sphère qui possède le même volume. Le diamètre projeté,  $d_p$  est le diamètre d'une sphère qui a la même aire observée que la particule lorsqu'elle est regardée dans son plan le plus stable. Finalement, le diamètre de Stoke,  $d_{st}$ , définit une sphère équivalente sédimentant avec la même vitesse qu'une particule sphérique (Martin et coll., 1983).



### **2.4.3 Potentiel zêta des particules**

Le potentiel zêta ( $\zeta$ ) est la différence de potentiel entre la surface d'une particule recouverte d'ions de charge opposée et solidement fixés, et le point d'électroneutralité. Ce potentiel peut varier selon le type et la quantité d'ions adsorbés, et selon l'ionisation de certains groupes fonctionnels à la surface de la particule. Une particule chargée en suspension dans une solution d'électrolytes adsorbe une couche d'ions de charge opposée. Cette couche, dite de Stern, est caractérisée par de fortes interactions entre les ions et la surface particulaire. Autour, une seconde couche d'ions est formée, majoritairement composée des contre-ions. Le potentiel zêta correspond à la différence de potentiel entre le début de cette couche, dite diffuse, et la solution environnante. Comme nous le verrons plus tard, sa valeur a une influence considérable sur la stabilité physique de certains systèmes dispersés et sa mesure peut être appliquée dans la formulation de suspensions (Haines et Martin, 1961).

## **2.5 STABILITÉ PHYSIQUE DES SUSPENSIONS**

### **2.5.1 Énergie de surface**

Les suspensions pharmaceutiques sont des systèmes thermodynamiquement instables étant donné la grande surface de la phase interne (Delgado et coll., 1990). En effet, une

suspension tend à réduire l'énergie libre de surface de ses particules, d'où la tendance des particules à s'agréger avec le temps. Ce principe est illustré par l'équation 1.

$$G = \gamma_{sl}A \quad (1)$$

Où  $G$  est l'énergie libre de surface,  $\gamma_{sl}$  est la tension interfaciale solide-liquide et  $A$  est la variation de la surface. Ainsi, l'énergie libre de surface est minimisée lorsque la tension de surface et l'aire des particules tendent vers zéro.

### 2.5.2 Sédimentation de la phase interne

Lorsque la taille des particules en suspension augmente, la vitesse de sédimentation de celles-ci augmente. Ce principe est illustré par la loi de Stoke (Eq. 2).

$$s = \frac{2(\rho_1 - \rho_2)r^2g}{9\eta} \quad (2)$$

Où  $s$  est la vitesse de sédimentation en cm/s,  $r$  est le rayon de la particule en cm,  $\rho_s$  est la masse volumique de la phase interne,  $\rho_l$  est masse volumique du milieu de dispersion (phase liquide),  $g$  est l'accélération gravitationnelle et  $\eta$ , la viscosité du milieu de dispersion en poise. Cette loi s'applique dans le cas des particules rigides en milieu très dilué (Withmore, 1955) et nous indique que lorsque la viscosité du milieu augmente, ou

lorsque la différence entre les masses volumiques des phases solides et liquides est minimisée, le taux de sédimentation est diminué, augmentant la stabilité de la suspension.

### **2.5.3 Forces gérant les interactions entre les particules et agrégation**

Les publications des théories de Derjaguin et Landau (1941) et de Verwey et Overbeek (1948) sont à la base de notre compréhension actuelle des problèmes entourant la stabilité des colloïdes, que ce soit en milieu aqueux ou non aqueux. Ils introduisirent alors l'idée fondamentale que la compréhension de la phénoménologie colloïdale pouvait être basée sur le concept des forces agissant entre les atomes ou les molécules.

L'énergie totale d'interaction des particules dans une suspension est la somme des forces d'attraction et de répulsion entre les particules du milieu. Parmi les forces d'attractions opérantes, il y a la force dipôle-dipôle, la force dipôle-dipôle induit et la force de dispersion de London.

Les forces d'attraction entre des espèces neutres, ou forces de London-van der Waals, résultent de l'interaction des dipôles électromagnétiques des particules et sont déstabilisantes pour les systèmes en suspension (Overbeek, 1977). Quoique ces forces soient généralement faibles, elles sont additives et peuvent donc mener à une force considérable selon le nombre de particules avoisinant une autre. Les forces de répulsions ont, par contre, un effet stabilisant sur les suspensions en prévenant l'agglomération des particules. Ces forces peuvent provenir de plusieurs sources, telles que la répulsion électrostatique, l'encombrement stérique ou les forces répulsives d'hydratation. Lorsque les forces de répulsions excèdent les forces d'attractions, la suspension résistera à

l'agrégation des particules. Bien que les forces de répulsions maintiennent la suspension dispersée, la sédimentation lente produite avec le temps créera un lit compact ("cake"), dû à l'agglutination du sédiment. Par contre, si les forces de répulsions sont à peu près neutres, l'attraction interparticulaire s'effectuera à une distance plus importante créant une agrégation et une sédimentation rapide des particules en flocons lâches et poreux. Le sédiment sera plus volumineux mais la barrière énergétique pour séparer les particules sera plus faible. Ainsi, il sera plus facile de remettre en suspension les particules sédimentées (Verwey et Overbeek, 1948; Sonntag et Strenge, 1972; Matthews et Rhodes, 1970). Ces principes, issus de la théorie DLVO (Deryaguin, Landau, Verwey et Overbeek), font l'objet d'une revue faite par Tabibi et Rhodes (1996).

## **2.6 FORMULATION DES SUSPENSIONS**

### **2.6.1 Les agents tensioactifs**

Afin de contrôler la stabilité physique des suspensions, les agents tensioactifs (i.e. substances amphiphiles) sont largement utilisés. Ils agissent surtout comme agents mouillants ou dispersants.

### 2.6.1.1 Propriétés et classification des agents tensioactifs

Les surfactifs permettent un lien entre deux phases de polarité très différente. La relation entre les propriétés hydrophiles et hydrophobes est codifiée par l'équilibre hydrophile/hydrophobe (HLB), concept introduit en 1949 et développé par la suite par Griffin (Griffin, 1949; 1954). Ce système, en plus d'être applicable dans la formulation des émulsions et des suspensions, est aussi un indice de la solubilité du surfactifs en milieu aqueux. Une liste de valeurs de HLB pour quelques surfactifs est montrée au tableau 1.1.

**Tableau 1.1:** Valeurs de HLB de certains surfactifs.

Surfactif	HLB
Polysorbate 65	10.5
Polysorbate 80	15.0
Polysorbate 20	16.7
Docusate de sodium	>24
Poloxamer 188	29
Lauryl sulfate de sodium	40

(Sources: Nash, 1996; Rieger, 1996)

Les surfactifs sont classés selon la nature de leur groupement hydrophile en quatre catégories: Les surfactifs non-ioniques, anioniques, cationiques et amphotériques.

### *A. Les surfactifs non-ioniques*

Les surfactifs non-ioniques trouvent une forte application dans les industries pharmaceutique et cosmétique. Leurs valeurs de HLB vont de 2 à 18, selon leurs propriétés structurales. Chimiquement, ils incluent les esters, les éthers, les amines et certains dérivés analogues. Dans cette catégorie, les dérivés du sorbitan, tel que les esters d'acides gras de polyoxyéthylène sorbitan (Tweens) ou les esters d'acides gras du sorbitan (Spans) sont très utilisés. Ils sont généralement constitués d'une chaîne hydrophile avec une séquence hydrophobe à leur extrémité pour permettre l'adsorption des chaînes.

Les polymères séquencés de type ABA où A est une unité hydrophile et B une unité hydrophobe, sont reconnus comme possédant un bon potentiel stabilisant. Les unités hydrophobes permettent un ancrage à la surface des particules tandis que les chaînes hydrophiles forment une barrière stérique aux interactions. Les poloxamères sont de ce type, avec un motif central de polyoxypropylène hydrophobe entouré d'unités hydrophiles de polyoxyéthylène. L'ancrage à la surface des particules se fait donc à partir de la séquence centrale du polymère. Les poloxamères trouvent de multiples applications comme détersif, agent dispersant, mouillant et émulsifiant (Koller, 1987).

Peu de polymères de type BAB ont été développés comme agent stabilisant. Les excipients comme les poly(éthylène glycol) distéarate ou dilaurate sont de ce type mais sont surtout utilisés comme émulsifiant ou comme opacifiant. Ils ont la propriété de former une auréole en boucle autour de la particule plutôt qu'en brosse.

### *B. Les surfactifs anioniques*

Les groupes les plus importants de surfactifs anioniques comprennent les sulfates d'alkyles et les carboxylates. Les détergents sont de cette dernière famille et possèdent la structure générale  $\text{RCOO}^-\text{M}^+$  où R est une chaîne aliphatique saturée ou insaturée. Le cation,  $\text{M}^+$ , est généralement un ion sodium, ammonium ou potassium. La longueur limite de la chaîne est d'environ 20 carbones car au-delà de cette limite, l'acide gras est peu soluble en milieu aqueux. Les carboxylates de stéroïdes, tels que les sels biliaires et leurs dérivés, sont aussi utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour la solubilisation de certains médicaments. Finalement, les sulfates d'alkyles sont des monoesters de l'acide sulfurique et sont formés par la réaction entre un alcool gras de l'acide sulfurique.

### *C. Les surfactifs cationiques*

Les sels d'ammonium quaternaires sont utilisés dans les préparations pharmaceutiques pour usage topique surtout en raison de leur activité antibactérienne et de leur forte adsorption sur les surfaces négatives, incluant la peau (Lawrence, 1970).

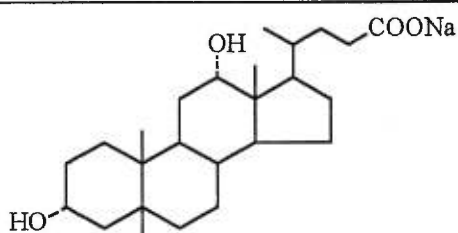
### *D. Les surfactifs amphotériques*

Ce dernier groupe de surfactifs sont zwitterioniques à un pH donné, c'est à dire qu'ils possèdent une charge négative et un charge positive à l'intérieur de la même molécule. Or, leur charge peut changer tout dépendant du pH auquel ils sont exposés. Les dérivés de l'acide acrylique, tels que les acides alkylaminodipropioniques et les phosphatides, font parti de ce groupe. Les phosphatides naturels comme la lécithine sont très utilisés dans l'industrie pharmaceutique entrant notamment dans la composition des liposomes.

Le tableau 1.2 regroupe quelques exemples de surfactifs communément utilisés dans les industries pharmaceutique et/ou cosmétique.



**Tableau 1.2:** Structures et applications de certains surfactifs

Structure	Nom	Catégorie et applications
$  \begin{array}{c}  \text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_w \quad (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH} \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{O} \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{CH}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z\text{O-COR}  \end{array}  $ <p style="text-align: center;">où  <math>\text{R} = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-</math> et <math>w+x+y+z = 20</math></p>	<p>Polysorbate 40 (Tween 40)</p>	<p>Surfactif non ionique, émulsifiant</p>
$  \begin{array}{c}  \text{RCO}-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{150}-\text{O-COR} \\  \text{où } \text{R} = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}-  \end{array}  $	PEG-150 distéarate	<p>Surfactif non ionique, solubilisant</p>
$  \begin{array}{c}  \text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-(\text{CH}(\text{CH}_2\text{O})_y-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_z\text{H} \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $ <p style="text-align: center;">où <math>x = z = 6</math> et <math>y = 67</math></p>	Poloxamère 401	<p>Surfactif non ionique, émulsifiant, solubilisant</p>
	Acide désoxycholique, sel de sodium	<p>Surfactif anionique, agent de suspension</p>
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$	Sulfate de lauryle, sel de sodium	<p>Surfactif anionique, émulsifiant</p>
$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_3 \text{ Br}^- \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	Bromure de cetrimonium	<p>Surfactif cationique, germicide</p>
$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2-\text{O-COR} \\    \\  \text{CH-O-COR}' \\    \\  \text{CH}_2-\text{O-PO}_2^--\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3  \end{array}  $ <p style="text-align: center;">où  R et R' sont des chaînes d'hydrocarbures</p>	Lécithine	<p>Surfactif amphotérique, émulsifiant</p>

### 2.6.1.2 Stabilisation des suspensions

Le mouillage des ingrédients suspendus est un des aspects les plus importants dans la formulation des suspensions de solides hydrophobes. Dans le cas de ces solides, l'angle de contact est inférieur à  $90^\circ$ , ce qui requiert l'utilisation d'un agent tensio-actif pour faciliter leur dispersion. Certains surfactifs tels que les Tweens et les poloxamers sont communément utilisés comme agents mouillants. Ceux-ci réduisent l'angle de contact entre la surface de la particule et le liquide mouillant. Les surfactifs non ioniques possédant une valeur de balance hydrophile/lipophile (HLB) comprise entre 7 et 10, procurent un maximum d'efficacité (Martin et Bustamante, 1993). Une attention particulière doit être portée à la quantité de surfactif utilisée. Une concentration trop élevée peut conduire à la défloculation de la suspension menant à une coagulation du sédiment, difficile à redisperser.

Les surfactifs sont aussi utilisés comme agents flocculants afin de former des agrégats ou des flocons lâches en suspension. En réduisant la charge à la surface de la particule, les surfactifs diminuent la force de répulsion électrostatique interparticulaire. Le potentiel zêta des particules doit être généralement inférieur à 25 mV pour obtenir une solution flocculée et un volume maximum de sédimentation non coagulé (Roesner et Grant, 1987). D'autre part, si le potentiel zêta est trop faible, la taille des agrégats pourra être trop importante, spécialement pour une suspension injectable. Ainsi, selon les forces présentes dans le milieu, un recours à une stabilisation par répulsion peut être nécessaire afin de modérer cet effet.

Les surfactifs ioniques sont souvent utilisés pour obtenir une stabilisation par répulsion électrostatique. L'application de charges à la surface des particules leur procure une barrière électrostatique qui empêche leur proximité et ainsi la prépondérance des forces de London. D'autre part, une stabilisation stérique peut provenir de la formation d'une couche diffuse à la surface des particules par l'adsorption de macromolécules hydrophiles. Pour être efficace, l'extension des chaînes de polymère doit se faire au-delà de la région spatiale où les forces de London sont présentes. Lorsque les particules se rapprochent, un encombrement stérique énergiquement défavorable forcera celles-ci à s'éloigner afin d'augmenter l'entropie du système et le degré de liberté des macromolécules (Daniel, 1988). Les stabilisations de type stérique ont l'avantage de n'être généralement que peu sensibles au pH ainsi qu'à la force ionique de la solution. Cependant, une augmentation de la température peut déstabiliser le système en réduisant le degré de solvation des chaînes par la diminution des ponts hydrogènes.

Pour obtenir une stabilisation stérique efficace, le polymère adsorbé doit, en plus d'être bien ancré à la surface des particules, posséder une compatibilité avec le solvant pour permettre une bonne solvation des chaînes. Une gamme importante de nouveaux polymères séquencés tels que les poloxamères a été développée afin de remplir ces conditions.

La capacité de certains polymères amphiphiles, tels que les dérivés du poly(éthylène glycol), à former une auréole diffuse à la surface de colloïdes chargés en suspensions peut notamment être démontrée par la diminution de leur potentiel  $\zeta$  absolu (Heiati et coll., 1998).

### 2.6.1.3 Influences des surfactifs sur la biodisponibilité et sur l'activité des substances biologiquement actives

Les surfactifs ne peuvent pas être considérés comme des adjuvants pharmaceutiques totalement inertes. Même si les surfactifs non ioniques sont généralement moins toxiques que les surfactifs ioniques, ils ne sont pas sans activités biologiques, que ce soit par leur affinité ou leur action sur les membranes biologiques. En effet, il a été démontré que le monooléate de polyoxyethylene sorbitan (Tween 80) possède une activité anticancéreuse, notamment dans le traitement de sarcomes du réticulum chez la souris (Crispens et Sorenson, 1988).

En plus de leurs propres effets biologiques ou toxicologiques, certains surfactifs non-ioniques peuvent, dans certains cas, agir en synergie avec le médicament pour promouvoir son absorption ou son activité. Par exemple, il a été démontré que le Tween 80 peut augmenter *in vitro* l'activité cytotoxique de quatre médicaments (adriamycin, épodyl, mitomycin-c, thiotépa) plus fréquemment administrés intravesicalement pour traiter les cancers superficiels de la vessie (Parris et coll., 1987). La capacité du Tween 80 à accroître la perméabilité des membranes des cellules tumorales et à augmenter ainsi la sensibilité aux substances thérapeutiques a aussi été évaluée par Keeney et coll. (1972) et par Lepers et coll. (1990) qui ont montré que le Tween 80 peut sensibiliser une soussignée de cellules ovariennes de hamster résistante à l'actinomycin et à la daunomycin. Ces effets sont généralement dûs à l'adsorption du surfactif sur la membrane biologique ainsi qu'à sa pénétration subséquente dans la membrane, altérant de cette manière la fluidité et la perméabilité de celle-ci. De plus, il a été démontré que la quantité de Tween

80 présente dans des émulsions de composantes mycobactériennes a une influence sur son activité antitumorale (Yarkoni et Rapp, 1980). L'activité de certains médicaments peut, au contraire, être réduite par le piégeage du principe actif dans les micelles qui diffusent lentement en plus de ne pouvoir pénétrer la membrane intact (Florence, 1977).

#### **2.6.1.4 Les tensioactifs et leur usage en formulation injectable**

Seul un nombre limité de surfactifs est considéré comme sécuritaire en terme de leur utilisation pour une administration parentérale. Les plus importants sont le Pluronic F68® (Poloxamer 188) et les Tweens 80 et 20. Le Poloxamer 188 (RheothRx, Glaxo Wellcome) a été notamment utilisé en infusion intraveineuse (iv) pour réduire la taille de l'infarctus (Justicz et coll., 1991; Schaer et coll., 1994). L'acide hyaluronique (HA) est aussi utilisé comme tel en solution saline comme agent viscosifiant pour le traitement de l'ostéoarthrite (Suplasyn®, Bioniche). Le Tween 80 est largement utilisé dans les formulations parentérales, comme par exemple dans le Librium® (Roche) pour l'administration intramusculaire, constitué d'hydrochlorure de déchlordiazepoxide formulé avec 4% de Tween 80. Le dodecyl sulfate de sodium (SDS) est normalement restreint à l'administration topique, mais il est présent dans une formulation commerciale d'Interleukin-2 pour l'administration parentérale contenant 0.15 mg/ml SDS (Aldesleukin®, Chiron Therapeutics). Enfin, parmi les surfactifs acceptés pour les administrations parentérales de produits pharmaceutiques, on retrouve aussi le désoxycholate de sodium, utilisé dans la formulation de l'amphotericin B pour traitement

antifongique systémique, contenant 4.1 mg/ml de désoxycholate de sodium (Fungizon®, Bristol MS).

#### **2.4.2 Les colloïdes hydrophiles**

Afin de maintenir les particules en suspension dans un état défloculé, les épaississants et les agents de suspension peuvent être utilisés. Ces agents augmentent la viscosité du milieu de suspension et réduisent le taux de sédimentation des particules. Divers colloïdes hydrophiles tels que la gélatine, l'acacia et le polyvinylpyrrolidone sont utilisés à cette fin. Toutefois, la grande viscosité de tels systèmes limite leur utilisation dans les suspensions parentérales, en plus de la propriété immunogène de certains d'entre eux (gélatine, acacia).

#### **2.4.3 Le système de solvant**

Le milieu de dispersion d'une suspension peut être aqueux ou non-aqueux. Le choix d'un système de solvant dépend de la solubilité, de la stabilité et des caractéristiques de libération désirées du médicament. Pour les suspensions injectables, l'eau est normalement le système de solvant privilégié. Toutefois, des agents non aqueux miscibles avec l'eau peuvent être utilisés comme cosolvants pour promouvoir la solubilité et la stabilité des préparations parentérales. L'éthanol, la glycérine et le propylène glycol sont des exemples de véhicules non-aqueux miscibles avec l'eau. L'utilisation de tels cosolvants peut être restreinte par des effets secondaires indésirables. Par exemple, Les

injections intramusculaires de mélanges de propylène glycol-eau, d'éthanol-eau, et de polyéthylène glycol (PEG) 400-eau ont été trouvés responsables de dommages aux muscles (Brazeau et Fung, 1989). De plus, la présence de cosolvants comme le propylène glycol, les PEG 200, 300 et 400, l'éthanol, et le glycérol peut provoquer la lyse de globules rouges humains (Reed et Yalkowski, 1986).

D'autres véhicules non-aqueux comme l'oléate d'éthyle, le benzoate de benzyle et les huiles sont utilisés dans les suspensions parentérales. Les huiles doivent être d'origine végétale, fluides à la température de la pièce et posséder une bonne stabilité thermique tant à haute qu'à basse température. La nature de l'huile utilisée peut aussi influencer l'effet thérapeutique d'un principe actif. Par exemple, il a été rapporté par Yarkoni et Rapp (1980) que l'activité antitumorale des préparations de paroi mycobactérienne de BCG peut être plus importante selon la nature de l'huile utilisée dans l'émulsion.

#### **2.4.4 Les agents osmotiques**

Afin de prévenir la douleur, l'irritation et les dommages des tissus au site d'administration, les préparations parentérales doivent être isotoniques. Divers électrolytes comme le chlorure de sodium sont utilisés à cette fin. Le dextrose, le mannitol ou le sorbitol s'emploient aussi pour maintenir l'osmolarité et la tonicité des suspensions pharmaceutiques.

### 3. OBJECTIFS

Les propriétés anticancéreuses des préparations de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* en font un traitement prometteur du cancer. Ces préparations offrent une alternative à l'utilisation actuelle du bacille de Calmette-Guérin (BCG) pour le traitement des cancers vésicaux. La formulation actuelle consiste en une émulsion d'huile minérale et, bien qu'elle soit appropriée pour une administration intravésicale, elle n'est pas recommandée pour une administration par voie intraveineuse. En effet, l'huile minérale possède une toxicité systémique et sa présence peut accentuer les effets indésirables reliés à l'usage des préparations de parois mycobactériennes, tels que la formation de granulomes. Il serait donc possible d'étendre l'utilisation des préparations de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* pour le traitement d'autres types de cancers par le développement d'une nouvelle formulation. Les fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* étant insolubles, la présente étude vise le développement d'une suspension aqueuse stabilisée par l'usage de surfactifs. En vue d'atteindre cet objectif général, la recherche se concentre sur différents points ayant trait tant à la stabilité des formulations développées qu'à leur activité *in vitro*. Les objectifs spécifiques relatifs à cette étude sont de:

1. Comparer le potentiel stabilisant de surfactifs disponibles commercialement pour la stabilisation de suspensions de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei*.



- Par l'étude granulométrique, en fonction du temps et de la température, des fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* maintenus en suspension avec divers agents tensioactifs.
  - Par la mesure du potentiel zêta des suspensions de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* stabilisées avec les divers surfactifs.
2. Étudier la stabilité chimique de l'ADN des fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* lors de l'incubation à diverses températures.
  3. Étudier l'inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses induite par les fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei*, ainsi que l'effet des surfactifs et de l'entreposage des préparations sur l'activité.
  4. Étudier la toxicité relative des suspensions de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* stabilisées avec les divers surfactifs sur les cellules cancéreuses et sur les macrophages de souris.

## **PRÉSENTATION DES MANUSCRITS**

## **CHAPITRE 2**

### **FORMULATION AND STABILITY OF *MYCOBACTERIUM PHLEI* CELL WALL FRAGMENT SUSPENSIONS**

## **FORMULATION AND STABILITY OF *MYCOBACTERIUM PHLEI* CELL WALL FRAGMENT SUSPENSIONS**

Emmanuelle Roux<sup>a</sup> and Nigel C. Phillips<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Pharmacy, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>b</sup> Bioniche Life Sciences Inc., 6100 Royalmount avenue, Montreal, Quebec, Canada H4P 2R2

Running title: Mycobacterial cell wall formulation

Key words: Mycobacterial cell wall, formulation, surface-active agents

\*Corresponding author. Tel.: (514) 496-7723; fax: (514) 496-7725;  
e-mail: nigel.phillips@nrc.ca or nphillips@bioniche.com

This manuscript was submitted to the *International Journal of Pharmaceutics*

## ABSTRACT

Pharmaceutical formulations containing mineral or organic oils are often restricted to topical administration because of systemic toxicity. Mycobacterial cell wall extracts from *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) formulated as mineral oil emulsions reduce tumor burden in patients with carcinoma *in situ* of the bladder following intravesicle administration. The use of mycobacterial cell wall preparations for the treatment of other cancers requires the development of stable aqueous formulations suitable for intravenous or parenteral administration. In this study, we have evaluated the ability of a number of surfactants to prevent the aggregation of mycobacterial cell wall fragments, and have determined the long-term stability of such formulations. Sub-micron (~500 nm diameter) sized cell wall fragments from *M. phlei* were stable in suspension at 4°C and 23°C, but aggregated at 37°C and 55°C. Poloxamer 188, sodium dodecyl sulfate or Tween 80 at concentrations of 1-5 mg/ml prevented aggregation during storage at 4°C, 23°C, 37°C and 55°C for up to 5 months. Sodium hyaluronate (1 mg/ml) prevented aggregation at 4°C, 23°C and 37°C but not at 55°C. Sodium deoxycholate did not prevent aggregation of the cell wall fragments. Pharmaceutical surfactants may therefore be appropriate replacements for mineral oil in preparing stable mycobacterial cell wall fragment suspensions.

## 1. INTRODUCTION

Immunostimulatory bacteria such as anaerobic corynebacteria (Archambault *et al.*, 1989) and mycobacteria (Garrec, 1986) are known to have modulatory effects on immune cells (Charley, 1983). Viable *Mycobacterium bovis* strain Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine has been tested in a number of clinical trials as a cancer immunotherapeutic, and is currently used as an intravesical treatment for superficial human bladder cancer and carcinoma *in situ* of the bladder (Morales, 1980; Lamm, 1995). Nonliving BCG preparations have been evaluated as a means of avoiding systemic infection following the administration of live BCG (Israel-Biet *et al.*, 1987; Orihuela *et al.*, 1987). The tumor-regressing activity of cell walls (CW) prepared from BCG and associated with oil droplets has been extensively studied (Ribi *et al.*, 1976; Zbar *et al.*, 1972, 1973). The efficacy of such preparations is enhanced following emulsification using various types of oil (Yarkoni and Rapp, 1980a). Trehalose-6,6'-dimycolate (TDM), one of the active cell wall structures that may contribute to the anti-tumor activity of BCG, has immune adjuvant activity that is enhanced when injected as an oil emulsion (Leclerc *et al.*, 1976). However, the capacity of TMD to stimulate anti-tumor reactivity when dispersed and administered in saline has been demonstrated, thus eliminating the serious inflammatory reactions associated with the use of oil (Orbach-Arbouys *et al.*, 1983).

Cell wall fragments derived from the non-pathogenic microorganism *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*), or heat-killed *M. phlei* have been shown to have anti-cancer activity in animal models when formulated as a water-in-oil-in-water emulsion (Gray *et al.*, 1975;

Yarkoni and Rapp, 1980b, 1982). Intravesical therapy with an emulsified *M. phlei* cell wall extract has also been shown to reduce cancer burden in patients with carcinoma *in situ* of the bladder following intravesicle administration (Morales and Chin, 1997).

Mycobacterial cell walls derived from *M. phlei*, consist of a partially delipidated and partially deproteinized macromolecular complex. Mycobacterial cell wall complex, a cell wall composition from *M. phlei* wherein mycobacterial DNA in the form of short oligonucleotides is complexed to the cell wall, has been shown to directly effect bladder cancer cells by inhibiting cellular division through the induction of apoptosis (Filion *et al.*, 1999). This process appears to be mediated by the presence of the complexed mycobacterial DNA (Filion *et al.*, 1999).

It may be possible to extend the use of mycobacterial cell wall preparations for the treatment of other cancers using parenteral routes of administration. Mineral oil emulsions of mycobacterial cell wall preparations are essentially restricted to external use because of the systemic toxicity and immune adjuvant activity that has been associated with this type of formulation (Steiner *et al.*, 1960; Tal and Laufer, 1960; Steblay, 1963; Miller *et al.*, 1996; Rollins *et al.*, 1997). Although emulsified cell wall preparations of BCG have been administered intravenously to patients with various types of cancer in phase-I clinical studies (Maroun *et al.*, 1979; Vosika and Gray, 1983), no systematic evaluation of inflammatory potential appears to have been carried-out. The absence of demonstrable anticancer activity in these patients following treatment with emulsified cell

wall may have been due to emulsion instability or inappropriate particle size, leading to reticuloendothelial capture and reduced anticancer activity. In this study we have evaluated the ability of a number of pharmaceutical surfactants to prevent the aggregation of mycobacterial cell wall fragments in the absence of oil, and have determined the stability of such formulations prior to initiating anticancer activity studies.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1. Materials*

Mycobacterial cell wall fragments prepared from *M. phlei* were supplied by Bioniche Life Sciences (London, Ontario, Canada) as a sterile, lyophilized hygroscopic powder. Tween 80, sodium deoxycholate and didecyldimethylammonium bromide (DDAB) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Pluronic F68 (poloxamer 188) was obtained from BASF (Rexdale, Ontario, Canada). Sodium dodecyl sulfate (SDS, molecular biology grade) was obtained from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). Sodium hyaluronate (HA) was supplied by Bioniche Life Sciences as a sterile 10 mg/ml solution in 0.85% NaCl (w/v). All other chemicals and reagents were of analytical grade or better. Endotoxin was determined using a commercial *Limulus* amoebocyte colorimetric kit (QLC1000) obtained from Whittaker BioProducts (Walkersville, MD).



## 2.2. Methods

### 2.2.1. Preparation of *M. phlei* cell wall fragment suspensions

All manipulations except microfluidization were carried-out in a class-100 laminar flow hood using sterile reagents and depyrogenated (180°C for 3 h) and sterilized glassware. Suspensions of *M. phlei* cell wall fragments in 0.85% NaCl (w/v) or phosphate-buffered saline (PBS, 0.85% NaCl containing 10mM sodium phosphate, pH 7.40) were sonicated using a tapered microtip (1/8") for up to 60 min at 1-2°C (Sonic Dismembrator, Model 550, Misonics, NY: power 550 W; frequency 20 kHz; intensity level 4) or microfluidized using a high-pressure homogenizer (Emulsiflex®-30, Avestin Inc., Ottawa, Canada) for 10 min at 20°C and 15 000 psi). The surfactants were sterilized as followed: Tween 80 and sodium deoxycholate solutions were sterilized by membrane filtration (0.22 micron), Poloxamer 188 solution was autoclaved (121°C for 20 min), and SDS was dissolved in chloroform, incubated for 30 minutes, after which the chloroform was removed by evaporation under vacuum. SDS was suspended in 100% ethanol and incubated for 30 minutes, after which the ethanol was removed by evaporation under vacuum. Sonicated cell wall fragments were mixed with the various surfactants (final cell wall concentration 1 mg/ml) and incubated at 4°C, 23°C, 37°C and 55°C in glass bottles in the dark for up to 20 weeks. Each suspension was prepared in triplicate.

### 2.2.2. Particle size measurement

The particle size distribution of unsonicated *M. phlei* cell wall fragments and of the sonicated cell wall fragments during incubation was determined by photon correlation spectroscopy (N4 Plus, Coulter Electronics, Miami, FL). Cell wall fragment suspensions were diluted with PBS to give a particle count rate of  $5 \times 10^4$ - $1 \times 10^6$  counts/s. Mean particle diameters were determined in size distribution mode (SDP) using the following conditions: 23°C temperature; 1.33 fluid refractive index; viscosity 0.93 centipoise; 90° measurement angle; 10.5  $\mu$ s sample time, and 60 s sample run time.

### 2.2.3. Particle zeta ( $\zeta$ ) potential

The  $\zeta$  potential of unsonicated *M. phlei* cell wall fragments and of the sonicated cell wall fragments in the absence or presence of the different surfactants was determined by Doppler electrophoretic light scattering using a DELSA 440SX (Coulter Electronics). The following measurement conditions were used: 25°C temperature; fluid refractive index 1.33; viscosity 0.93 centipoise; current 10 mA; dielectric constant 78.3; conductivity 13-17 ms/cm; 2.5 s on time; 0.5 s off time; 60s sample run time.

#### 2.2.4. Particle stability after autoclaving

Sonicated cell wall fragments and microfluidized cell wall fragments were autoclaved at 121°C for 20 min. The mean diameter and  $\zeta$  potential of the cell wall fragments were determined before and after autoclaving.

#### 2.2.5. Bacterial endotoxin determination

Bacterial endotoxin levels in the surfactant solutions and *M. phlei* cell wall fragments were quantified using a chromogenic *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test (Whittaker BioProducts). Four standard endotoxin solutions containing between 0.1 and 1.0 endotoxin units/ml were used to construct the calibration curve.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Size distribution and particle $\zeta$ potential of *M. phlei* cell wall fragments after sonication or microfluidization

Sonication of *M. phlei* cell wall fragments for 30-60 min was necessary to ensure a significant reduction in particle size (Table 1). A similar particle size distribution was obtained when *M. phlei* cell wall fragments were microfluidized, but in this case sub-micron (~0.5 microns mean diameter) cell wall fragment suspensions were obtained after only 5 min microfluidization. No significant change in  $\zeta$  potential was observed after particle size reduction by sonication or microfluidization. To ensure production of sub-

micron particles under aseptic conditions, only sonicated suspensions were used in the subsequent studies.

### *3.2. Effect of surfactant on cell wall particle $\zeta$ potential*

The potential interaction between the surfactants and *M. phlei* cell wall particles in suspension was evaluated by measurement of the  $\zeta$  potential of the different formulations. As a positive control, we used didecyldimethylammonium bromide (DDAB), a cationic surfactant, to ensure reaction with the negatively charged cell wall fragments. As shown in figure 1, only DDAB neutralized the  $\zeta$  potential of the cell wall particles ( $p < 0.05$ , Student's t-test, at 5 and 10 mg/ml versus control cell wall fragments). None of the other surfactants had any significant effect ( $p > 0.05$ , Student's t-test) on cell wall fragment  $\zeta$  potential. There was a trend to increasing electronegativity with the highest concentration of SDS.

### *3.3. Effect of storage on physical stability*

The physical stability of *M. phlei* cell wall fragment suspension in the absence of surfactant and in the presence of SDS, HA, Poloxamer 188, and Tween 80 at various concentrations during storage at 4°C, 23°C, 37°C and 55°C was initially determined over a period of 4 weeks. Figure 2A-D shows the mean diameter of *M. phlei* cell wall particles after this period of time. The initial mean diameters of the cell wall fragment formulations ranged from 335 to 540 nm except for suspensions containing 5 mg/ml HA, where

immediate aggregation resulted in a mean diameter of 940 nm. Figure 2A shows that sub-micron sized *M. phlei* cell wall particles containing no surfactant were stable during 4 weeks of incubation at 4°C. SDS gave relatively stable suspensions, with a trend towards increasing particle size at the higher concentrations (fig 2A). The *M. phlei* cell wall particle formulation containing 1 mg/ml SDS was the most stable. Tween 80 gave stable suspensions, with a trend towards increasing stability at higher concentrations (fig 2A). Poloxamer 188 gave stable suspensions at every concentration tested (fig 2A). HA at 1 mg/ml resulted in a stable suspension, while the presence of 0.1 and 0.5 mg/ml resulted in some aggregation. Aggregation of the *M. phlei* cell wall particles occurred immediately in the presence of 5 mg/ml HA at 4°C (fig 2A).

As shown in figure 2B, *M. phlei* cell wall fragment suspensions containing no additive were relatively stable after 4 weeks incubation at 23°C, with a final diameter of ~800 nm. Stability in the presence of the various surfactants was similar that observed following incubation at 4°C, with particularly stable suspensions being observed with 1mg/ml SDS, 10 mg/ml Tween 80, 1 mg/ml HA and 1 mg/ml poloxamer 188 (fig 2B).

Figure 2C shows the final diameter of the cell wall fragment suspensions after incubation at 37 °C. *M. phlei* cell wall fragments in the absence of surfactant showed significant aggregation after 4 weeks, with a final mean particle diameter of ~1300 nm. The presence of the various surfactants gave results similar to those observed after incubation at 4°C or 23°C.

As shown in figure 2D, *M. phlei* cell wall suspension containing no surfactant were relatively stable after 4 weeks incubation at 55°C. The presence of 1mg/ml SDS, 10 mg/ml Tween 80 and Poloxamer 188 at 1, 5 and 10 mg/ml resulted in enhanced stability. Significant aggregation occurred in the presence of low concentrations of Tween 80. HA undergoes significant degradation at 55°C (Lowry and Beavers, 1994), and significant aggregation of the cell wall fragments was observed at HA concentrations of less than 1 mg/ml.

The effect of sodium deoxycholate at 1, 2 and 4 mg/ml on cell wall fragment suspension stability was also determined. Sodium deoxycholate caused significant aggregation when suspensions were incubated at 37°C or 55°C at every concentration tested, with increases in mean particle diameter from 350 nm to 890, 740, 1400 and 6600 nm respectively at 4°C, 23°C, 37°C and 55°C after 4 weeks at 4 mg/ml (data not shown). The increases in diameter increased with concentration, maximal aggregation being observed at 4 mg/ml. This concentration is comparable to that used in Fungizone®, a commercial formulation of Amphotericin B for systemic administration that contains 4.1 mg/ml sodium deoxycholate (Trissel, 1996).

Following the completion of the short-term stability study, a long-term study over a period of 22 weeks was carried-out using the surfactant concentrations that gave the most stable suspensions.

Figure 3A shows the stability of *M. phlei* cell wall fragments in the absence and in the presence of the selected surfactants during incubation at 4°C. A significant ( $p < 0.05$ , Student's t-test) increase in the mean diameter of *M. phlei* cell wall fragments in suspension in the absence of surfactants was observed over this period. All the cell wall fragment suspensions formulated with surfactant were stable over a period of 22 weeks. Similar results were obtained for cell wall fragments incubated at 23°C in the absence and presence of surfactant, as shown in figure 3B.

Aggregation of *M. phlei* cell wall fragments in suspension without surfactant occurred at 37°C, while the presence of all the selected surfactants gave stable suspensions (figure 3C). Similar results were obtained at 55°C, (figure 3D), where the presence of all the selected surfactants except HA resulted in stable suspensions. Aggregation of the particles suspended in HA during incubation at 55°C lead to a particle diameter of  $\geq 1000$  nm after 22 weeks.

#### *3.4. Effect of autoclaving on physical stability and $\zeta$ potential*

Production of *M. phlei* cell wall fragments in suspension under aseptic conditions is time-consuming and complex. Heat sterilization by autoclaving is a convenient method of post-manufacturing sterilization of both *M. phlei* cell wall fragments and surfactant. Heat sterilization by autoclaving has been used for liposomes and nanoparticles (Zuidam *et al.*, 1992; Heiati *et al.*, 1998). However, particle size should remain unchanged during the process, and we have therefore evaluated the ability of the different surfactants to

prevent aggregation during autoclaving. As shown in figure 4, a greater than two-fold increase in mean particle diameter was observed for the cell wall fragments in the absence of any surfactant following autoclaving. Only the addition of SDS (0.1-10 mg/ml) or Tween 80 (0.1 mg/ml) to the *M. phlei* cell wall fragments prevented aggregation, while the presence of the other surfactants gave either no protection or a significant increase in particle diameter.

The  $\zeta$  potential of the *M. phlei* cell wall fragments was significantly reduced by autoclaving ( $-14.73 \pm 1.33$  mV to  $-10.67 \pm 1.95$  mV,  $p < 0.01$ , Student's t-test, mean of 3 experiments  $\pm$  SD, table 2), suggesting that significant chemical and or physical changes occur that change the charge density at the surface of the particles. Poloxamer 188 significantly decreased the  $\zeta$  potential of the fragments ( $p < 0.05$ , Student's t-test), while SDS significantly increased the  $\zeta$  potential of the fragments ( $p < 0.05$ , Student's t-test). HA had no significant effect on autoclaved *M. phlei* cell wall fragment  $\zeta$  potential, and although there was a trend for Tween 80 to decrease the  $\zeta$  potential, it was not significant (table 2).

### 3.5. Endotoxin levels of *M. phlei* cell wall fragments suspensions

*M. phlei* cell wall fragments suspensions containing no surfactant, HA (1 mg/ml), Poloxamer 188 (5 mg/ml), SDS (0.5 mg/ml) or Tween 80 (2 mg/ml) and surfactant solutions alone at the same concentrations were tested after 2 months of incubation at 55°C. Endotoxin levels in these preparations were found to be less than 0.3 EU/ml.



## 4. DISCUSSION

### *4.1. Preparation of M. phlei cell wall fragments suspensions*

*M. phlei* cell wall fragments undergo significant aggregation when initially suspended in aqueous solution. It is therefore necessary to use a convenient method of disruption of the fragment aggregates as well as a means of inhibiting their subsequent re-aggregation if they are to be used for intravenous or parenteral administration. Mineral oil emulsions achieve this via the localization of cell wall fragments at the water-oil interface during emulsification (Zbar *et al.*, 1972). *M. phlei* cell wall fragments formulated as triphasic W/O/W emulsions have a mean emulsion particle size of 0.3-0.5 microns (unpublished data). In the present study, sonication as well as high pressure microfluidization were both effective in obtaining a sub-micron (~0.5 micron diameter) cell wall fragment suspension comparable in diameter to that seen in water-oil emulsions. Although sonication takes significantly longer than microfluidization (30-60 min versus 5 min), it is the preferred method for small-scale preparations. Microfluidization, which is preferable for large scale preparation of cell wall fragments (>50 ml), is not appropriate for small volume preparation (1-10 ml) because of the significant dead volume space in the equipment (5-6 ml). For this reason, sonication of the cell wall fragments was the method of choice for subsequent stability studies. There was no significant difference in particle diameter or  $\zeta$  potential following sonication or microfluidization, indicating that neither process changes the inherent physical or chemical characteristics of the particles.

#### 4.2. Physical interaction between *M. phlei* cell wall fragments and surfactants

The ability of amphiphilic polymers such as amphiphilic PEGs to act as a hydrophilic shield has been shown in many studies. (Klibanov *et al.*, 1990; Tröster *et al.*, 1992). Similarly, steric stabilization of charged solid particles can be demonstrated by the changes in particle  $\zeta$  potential, PEG effectively increasing the hydrodynamic sphere surrounding the particle (Zeisig *et al.*, 1996; Woodle *et al.*, 1994). *M. phlei* cell wall fragments have a negative  $\zeta$  potential, indicative of a net negative surface charge (this study). Contributing molecules may be the phosphodiester backbone of DNA contained in *M. phlei* cell wall fragments or negatively charged phospholipids. Several lines of evidence indicate that cell wall fragment-associated DNA contributes significantly to the overall surface negative charge. Firstly, treatment of the cell wall fragments with the nuclease DNase-I results in a significant reduction in DNA content that is associated with a decrease in the  $\zeta$  potential (-14 mV to -7 mV, unpublished data). Secondly, autoclaving the cell wall fragment suspensions results in a significant degradation of DNA (unpublished data). *M. phlei* cell wall fragments contain lipids and phospholipids that could facilitate the association of surfactants possessing hydrophobic moiety(ies). It was therefore initially expected that a diminished  $\zeta$  potential would be observed with the use of neutral surfactants such as Poloxamer 188 or Tween 80. However, as shown in figure 1, no significant change in  $\zeta$  potential was observed indicating that there was little if any physical interaction between these surfactants and *M. phlei* cell wall fragments. There was however a trend to an increasingly negative  $\zeta$  potential with SDS, indicating that there was some degree of association with the cell wall fragments. Autoclaving of

suspensions containing high concentrations of Poloxamer 188 (and to a lesser extent Tween 80) did however result in a reduction of particle  $\zeta$  potential. Thermal energy and reduction in particle surface charge probably allows some degree of interaction between the polymer chains of these surfactants and the (presumably) hydrophobic surface of the cell wall fragments. This conclusion is supported by the observation that in the presence of the anionic surfactant SDS, autoclaving increases the cell wall fragment  $\zeta$  potential to a more negative value. These results support a mechanism whereby the aliphatic moiety associates with or inserts into the cell wall fragments, thus orientating the negatively charged phosphate group at the surface of the fragment. However, with the exception the cationic lipid DDAB, where an expected neutralization of surface charge occurred, the other surfactants appear to act primarily as solvent bulking agents in the absence of autoclaving when improving suspension stability.

#### *4.3. Stability of *M. phlei* cell wall fragments suspensions*

The stability of a parenteral suspension is largely dependent on the dispersed phase particle size distribution (Lilley *et al.*, 1996; Chansiri *et al.*, 1999). Safety of application is highly dependent on the particle size distribution of the solid phase, since particles  $\geq 5$  microns in diameter given intravenously can lead to emboli formation in peripheral capillaries (Mawson *et al.*, 1982). *M. phlei* cell wall fragment suspension containing no surfactant was not stable over the 22 week incubation period, particle aggregation being observed during storage at 37°C and 55°C. Unexpectedly, particle aggregation occurring at 37°C after storage for 22 weeks was significantly greater than at 55°C. The ability of

DNA to form electrostatic bonds with positively charged cell wall peptidoglycan may be reduced at 55°C because of the cleavage of phosphodiester linkages, thus causing a degradation of the fragments structure that can balance the aggregation of the particles. Preliminary data strongly indicates significant decreases in DNA oligonucleotide chain length following incubation at 55°C (unpublished data). The stability of the DNA molecules in the cell wall formulations is currently being investigated in detail.

Only a limited number of surfactants are regarded as safe for parenteral administration, of which the most important are Pluronic F68® (Poloxamer 188) and Tween 80 and 20. Poloxamer 188 has been notably used as RheothRx injection (Glaxo Wellcome), administered as an intravenous (i.v.) infusion that has been shown in animal models and human studies to markedly reduce infarct size (Justicz *et al.*, 1991; Schaer *et al.*, 1994). Hyaluronic acid (HA) is also used as a viscosupplementation agent for the treatment of osteoarthritis (Altman *et al.*, 1998; Frizziero *et al.*, 1998). Tween 80 is largely used in parenteral formulations (Webster *et al.*, 1997) and often at high concentrations, for example in Librium® (Roche; chlordiazepoxide HCl formulated with 4% Tween 80) for intramuscular administration (Trissel, 1996). Although sodium dodecyl sulfate (SDS) is normally restricted for topical administration, a commercial formulation of Interleukin-2 for parenteral administration contains 0.15 mg/ml SDS (Proleukin®, Chiron Therapeutics) (Trissel, 1996). Sodium deoxycholate is used in commercial formulations of amphotericin B for systemic administration (Fungizone® Intravenous, Apothecan) (Trissel, 1996). We have therefore restricted our studies to those surfactants that are known to be acceptable for parenteral administration. Sodium deoxycholate did not

prevent aggregation of *M. phlei* cell wall fragments, but the use of 1 mg/ml SDS, 5 mg/ml Poloxamer 188 or 10 mg/ml Tween 80 in the formulation stabilized the suspended fragments. *M. phlei* cell wall fragments formulated with 1 mg/ml HA were stable at 4°C, 23°C and 37°C, but aggregation occurred at 55°C. HA undergoes considerable hydrolysis at 55°C over prolonged incubation periods (Lowry and Beavers, 1994), indicating that HA polymer chain length is important for preventing aggregation of *M. phlei* cell wall fragments.

These results indicate that a number of conventional surfactants used for parenteral administration of drugs in humans can be used to stabilize sub-micron *M. phlei* cell wall fragment suspensions. It should be noted however that stable suspensions are only obtained following sterilization of these cell wall suspensions by autoclaving in the presence of SDS. We are currently evaluating the *in vitro* and *in vivo* anticancer activity of these formulations.

## 5. CONCLUSION

This study demonstrates that the surface charge ( $\zeta$  potential) of *M. phlei* cell wall fragments is not significantly modified by the presence of SDS, HA, Poloxamer 188 and Tween 80 in the absence of autoclaving. However, these surfactants at specific concentrations can provide a stabilization effect against aggregation of *M. phlei* cell wall fragments in suspension. Formulations of *M. phlei* cell wall fragments containing 1 mg/ml SDS, 5 mg/ml Poloxamer 188 or 10 mg/ml Tween 80 are stable for up to 5 months when

stored at 4°C, 23°C, 37°C and 55°C, while suspension containing 1 mg/ml HA are stable at every temperature except 55°C. Heat sterilization by autoclaving of the final suspensions can be achieved only if SDS is chosen as the stabilizing surfactant, unacceptable particle aggregation being observed with the 3 other surfactants.

## REFERENCES

Altman, R.D., Moskowitz, R., 1998. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. Hyalgan Study Group. *J. Rheumatol.*, 25, 2203-12.

Archambault, D., Morin, G., Elazhary, Y., 1989. Effect of sodium diethyldithiocarbamate, *Corynebacterium parvum* and mycobacterium cell wall extract on in vitro blastogenic responses of bovine blood lymphocytes. *Cornell. Vet.*, 79, 11-24.

Chansiri, G., Lyons, R.T., Patel, M.V., Hem, S.L., 1999. Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. *J. Pharm. Sci.*, 88, 454-8.

Charley, B., 1983. In vitro effects of lipopolysaccharides and mycobacterial cell wall components on swine alveolar macrophages. *Res. Vet. Sci.*, 34, 212-217.

Filion, M.C., Lépicier, P., Morales, A., Phillips, N.C., 1999. *Mycobacterium phlei* cell wall complex directly induces apoptosis in human bladder cancer cell. *Brit. J. Cancer*, 79, 229-35.

Frizziero, L.; Govoni, E., Bacchini, P., 1998. Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee: clinical and morphological study. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 16, 441-9.

Garrec, Y.L., 1986. Immunomodifiers of bacterial origin. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 9, 137-141.

Gray, G.R., Ribi, E., Granger, D., Parker, R., Azuma, I., Yamamoto, K., 1975. Immunotherapy of cancer: tumor suppression and regression by cell walls of *Mycobacterium phlei* attached to oil droplets. *J. Natl Cancer Inst.*, 55, 727-30.

Heiati, H., Tawashi, R., Phillips, N.C., 1998. Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization. *J. Microencapsul.*, 15, 173-84.

Israel-Biet, D., Venet, A., Sandron, D., Ziza, J.M., Chretien, J., 1987. Pulmonary complications of intravesical Bacille Calmette-Guérin immunotherapy. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 135, 763-765.

Justicz, A.G., Farnsworth, W.V., Soberman, M.S., Tuvlin, M.B., Bonner, G.D., Hunter, R.L., Martino-Saltzman, D., Sink, J.D., Austin, G.E., 1991. Reduction of myocardial infarct size by poloxamer 188 and mannitol in a canine model. *Am. Heart J.*, 122, 671-80.



Klibanov, A.L., Maruyama, K., Torchilin, V.P., Huang, L., 1990. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.*, 268, 235-237.

Lamm, D.L., 1995. BCG in perspective: advances in the treatment of superficial bladder cancer. *Eur. Urol.*, 27S1, 2-8.

Leclerc, C., Lamensans, A., Chedid, L., Drapier, J.C., Petit, J.F., Wietzerbin, J., Lederer, E., 1976. Non-specific immunoprevention of L1210 leukemia by cord factor (6-6'-dimycolate of trehalose) administered in a metabolizable oil. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1, 227-232.

Lilley, E.M., Isert, P.R., Carasso, M.L., Kennedy, R.A., 1996. The effect of the addition of lignocaine on propofol emulsion stability. *Anaesthesia*, 51, 815-8.

Lowry, K.M., Beavers, E.M., 1994. Thermal stability of sodium hyaluronate in aqueous solution. *J. Biomed. Mater. Res.*, 28, 1239-44.

Maroun, J.A., Quesada, J.R., Hersh, E.M., Gutterman, J.U., Richman, S., Schwarz, M.A., Parker, N., 1979. Phase I toxicity study of methanol-extracted residue of *Bacillus Calmette-Guérin* by the iv route. *Cancer Treat. Rep.*, 63, 1781-6.

Mawson, J.B., Gavin, J.B., Herdson, P.B., 1982. A comparison of the effects of ischemia and of selective occlusion of capillaries, pre-capillaries and terminal arterioles on coronary reperfusion. *Pathology*, 14, 369-73.

Miller, M.J., Lonardo, E.C., Greer, R.D., Bevan, C., Edwards, D.A., Smith, J.H., Freeman, J.J., 1996. Variable responses of species and strains to white mineral oils and paraffin waxes. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 23, 55-68.

Morales, A., 1980. Treatment of superficial bladder cancer. *Can. Med. Assoc. J.*, 122, 1133-1138.

Morales, A., Chin, J.L., 1997. Mycobacterial cell wall (MCW) as an alternative to BCG in the treatment of carcinoma-in-situ (CIS) of bladder: an efficacy study. *J. Urol.*, 157, A214.

Orbach-Arbouys, S., Tenu, J.P., Petit, J.F., 1983. Enhancement of in vitro and in vivo antitumor activity by cord factor (6-6'-dimycolate of trehalose) administered suspended in saline. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immun.*, 71, 67-73.

Orihuela, E., Herr, H.W., Pinsky, C.M., Withmore, W.F. Jr, 1987. Toxicity of intravesical BCG and its management in patients with superficial bladder tumors. *Cancer*, 60, 326-333.

Ribi, E., Milner, K.C., Granger, D.L., Kelly, M.T., Yamamoto, K., Brehmer, W., Parker, R., Smith, R.F., Strain, S.M., 1976. Immunotherapy with nonviable microbial components. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 277, 228-38.

Rollins, C.E., Reiber, G., Guinee, D.G. Jr, Lie, J.T., 1997. Disseminated lipogranulomas and sudden death from self-administered mineral oil injection. *Am. J. Forensic. Med. Pathol.*, 18, 100-3.

Schaer, G.L., Hursey, T.L., Abrahams, S.L., Buddemeier, K., Ennis, B., Rodriguez, E.R., Hubbell, J.P., Moy, J., Parrillo, J.E., 1994. Reduction in reperfusion-induced myocardial necrosis in dogs by RheothRx injection (Poloxamer 188 N.F.), a hemorheological agent that alters neutrophil function. *Circulation*, 90, 2964-75.

Stebly, R.W., 1963. Glomerulonephritis induced in monkeys by injection of heterologous glomerular basement membrane and Freund's adjuvant. *Nature*, 197, 1173-1176.

Steiner, J.W., Langer, B., Schatz, D.L., 1960 The local and systemic effects of Freund's adjuvant and its fractions. *Arch. Pathol.*, 70, 424-434.

Tal, C., Laufer, A., 1960. Amyloidosis in mice following injections with Freund's adjuvant or its components, given separately or in homologous liver-adjuvant mixture. *Brit. J. exp. Pathol.*, 41, 605-609.

Trissel, L.A., (1996) Handbook on injectable drugs, 9th Ed., American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD.

Tröster, S.D., Wallis, K.H., Müller, R.H., Kreuter, J., 1992. Correlation of surface hydrophobicity of  $^{14}\text{C}$ -poly(methyl methacrylate) nanoparticles to the body distribution. *J. Control. Release*, 20, 247-253.

Vosika, G.J., Gray, G.R., 1983. Phase I study of iv mycobacterial cell wall skeleton and cell wall skeleton combined with trehalose dimycolate. *Cancer Treat. Rep.*, 67, 785-90.

Webster, L.K., Linsenmeyer, M.E., Rischin, D., Urch, M.E., Woodcock, D.M, Millward, M.J., 1997. Plasma concentrations of polysorbate 80 measured in patients following administration of docetaxel or etoposide. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 39, 557-60.

Woodle, M.C., Newman, M.S., Cohen, J.A., 1994. Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. *J. Drug Target.*, 2, 397-403.

Yarkoni, E., Rapp, H.J., 1980a. Influence of type of oil and surfactant concentration on the efficacy of emulsified *Mycobacterium bovis* BCG cell walls to induce tumor regression in guinea pigs. *Infect. Immun.*, 28, 881-6.

Yarkoni, E., Rapp, H.J., 1980b. Immunotherapy of experimental cancer by intralesional injection of emulsified nonliving mycobacteria: comparison of *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium phlei*, and *Mycobacterium smegmatis*. *Infect. Immun.*, 28, 887-92.

Yarkoni, E., Rapp, H.J., 1982. Immunotherapy of guinea pigs with a transplanted hepatoma: comparison of intralesionally injected emulsions containing heat-killed *Nocardia rubra*, *Mycobacterium bovis* (BCG) and *Mycobacterium phlei*. *Oncology*, 39, 314-8.

Zbar, B., Ribí, E., Rapp, H.J., 1972. Tumor suppression by cell walls of *mycobacterium bovis* attached to oil droplets. *J. Natl Cancer Inst.*, 48, 831-835.

Zbar, B., Ribí, E., Rapp, H.J., 1973. An experimental model for immunotherapy of cancer. *Natl Cancer Inst. Monogr.*, 39, 3-6.

Zeisig, R., Shimada, K., Hirota, S., Arndt, D., 1996. Effect of sterical stabilization on macrophage uptake in vitro and on thickness of the fixed aqueous layer of liposomes made from alkylphosphocholines. *Biochim. Biophys. Acta*, 1285, 237-45.

Zuidam, N.J., Lee, S.S., Crommelin, D.J., 1993. Sterilization of liposomes by heat treatment. *Pharm. Res.*, 10, 1591-6.

**Table 1.** Effect of sonication and microfluidization on particle size and  $\zeta$  potential of *M. phlei* cell wall fragments.

Process	Particle size (nm)	$\zeta$ potential, (mV)
None	>10 000 <sup>a</sup>	-12.78 $\pm$ 4.06 <sup>b</sup>
Sonication		
15 min	4131.2 $\pm$ 418.2	-17.80 $\pm$ 2.44
30 min	1008.4 $\pm$ 66.9	-13.93 $\pm$ 0.49
45 min	733.3 $\pm$ 171.5	-14.27 $\pm$ 2.37
60 min	447.6 $\pm$ 81.4	-15.80 $\pm$ 0.69
Microfluidization		
2 min	1570.4 $\pm$ 549.5	-16.60 $\pm$ 0.82
4 min	677.2 $\pm$ 107.7	-16.00 $\pm$ 0.92
6 min	479.6 $\pm$ 138.1	-16.23 $\pm$ 0.35
8 min	515.8 $\pm$ 189.1	-14.30 $\pm$ 1.18
10 min	459.7 $\pm$ 70.1	-14.00 $\pm$ 0.92

<sup>a</sup>N4 Plus limit for particle diameter measurement is 10 000 nm in SDP mode.

<sup>b</sup>Mean  $\pm$  SD of three experiments.

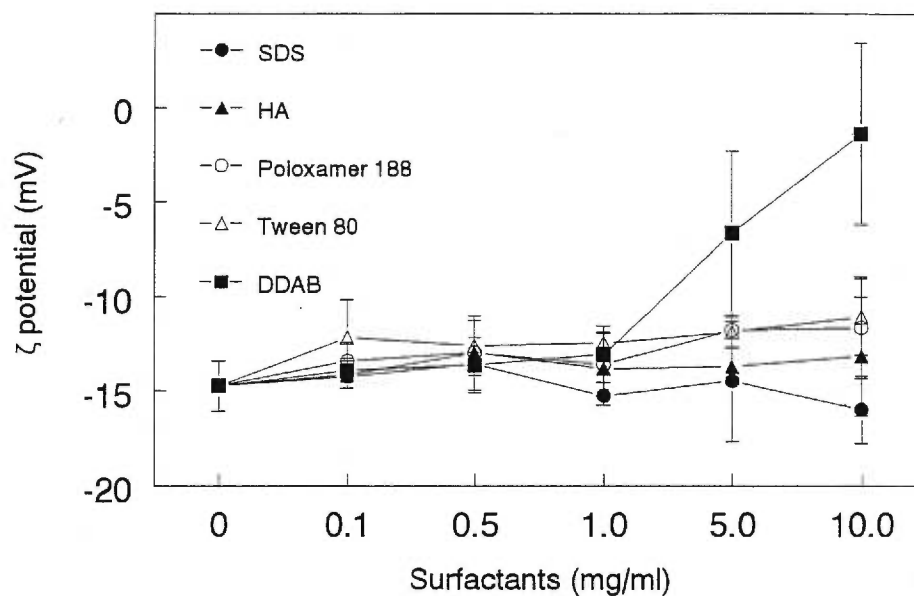
**Table 2.** Effect of autoclaving in the presence of surfactants on *M. phlei* cell wall fragment  $\zeta$  potential.

Surfactant	$\zeta$ potential (mV)
No surfactant <sup>a</sup>	-10.67 $\pm$ 1.95 <sup>b</sup>
5 mg/ml HA	-10.76 $\pm$ 1.51
10 mg/ml SDS	-18.00 $\pm$ 4.35 <sup>c</sup>
10 mg/ml Poloxamer 188	-6.44 $\pm$ 1.85 <sup>c</sup>
10 mg/ml Tween 80	-7.72 $\pm$ 3.14

<sup>a</sup>The  $\zeta$  potential of the mycobacterial cell wall fragments before autoclaving was -14.73  $\pm$  1.33 mV.

<sup>b</sup>Mean  $\pm$  SD of three experiments.

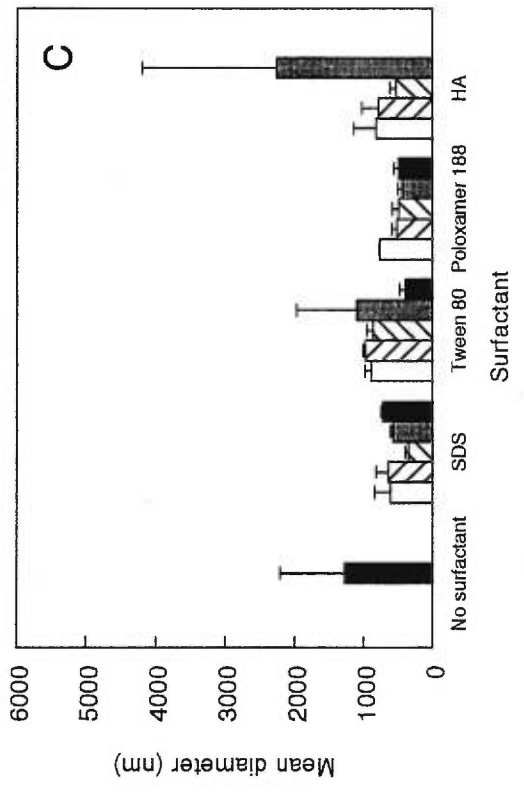
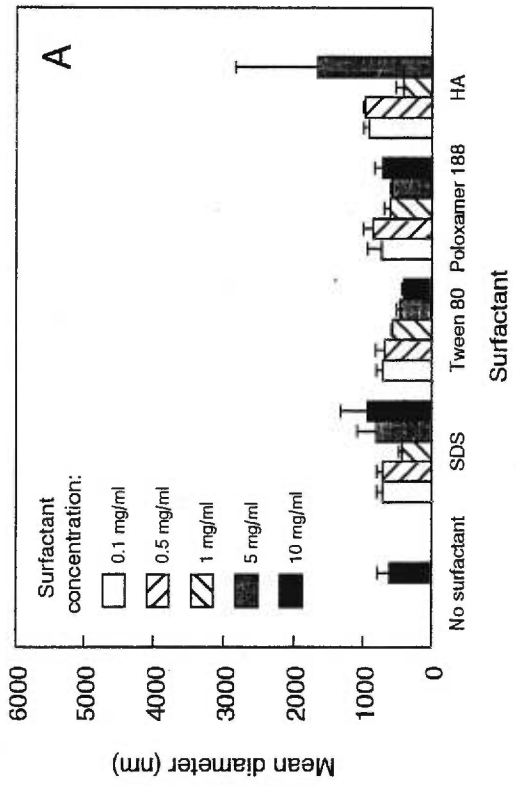
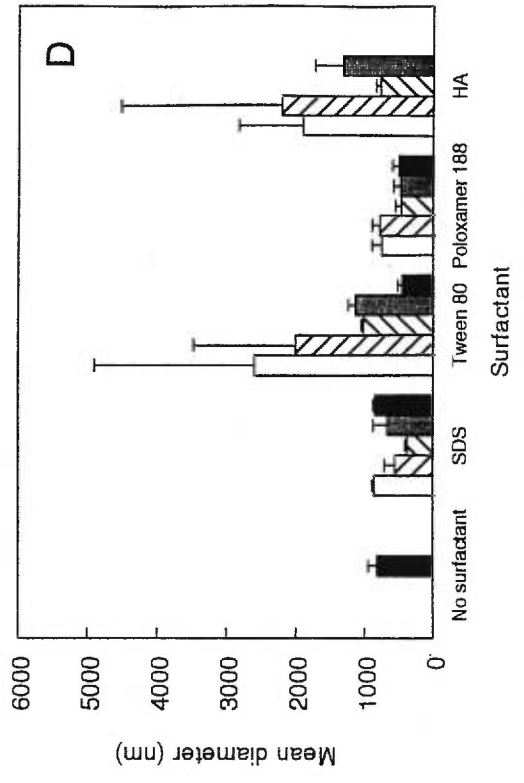
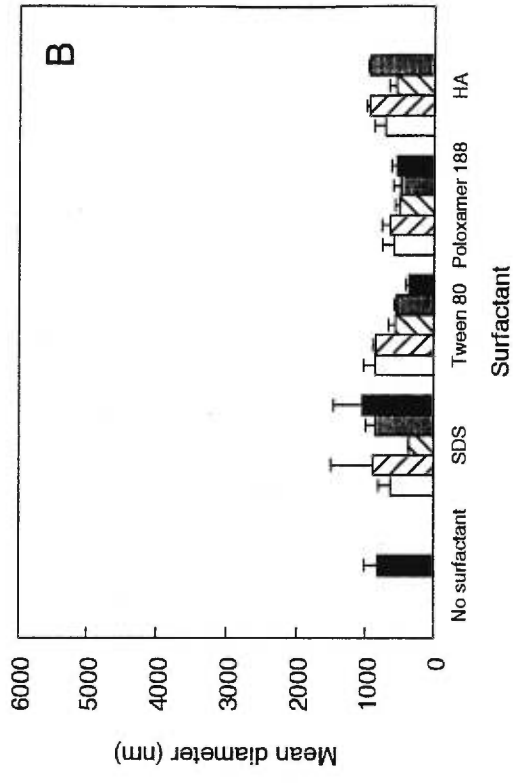
<sup>c</sup> Significantly different from autoclaved *M. phlei* cell wall fragments in the absence of surfactant ( $p < 0.05$ , Student's t-test).



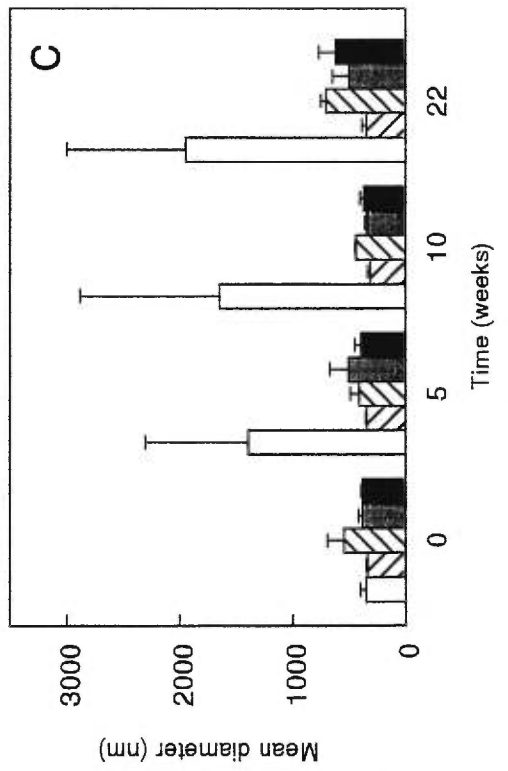
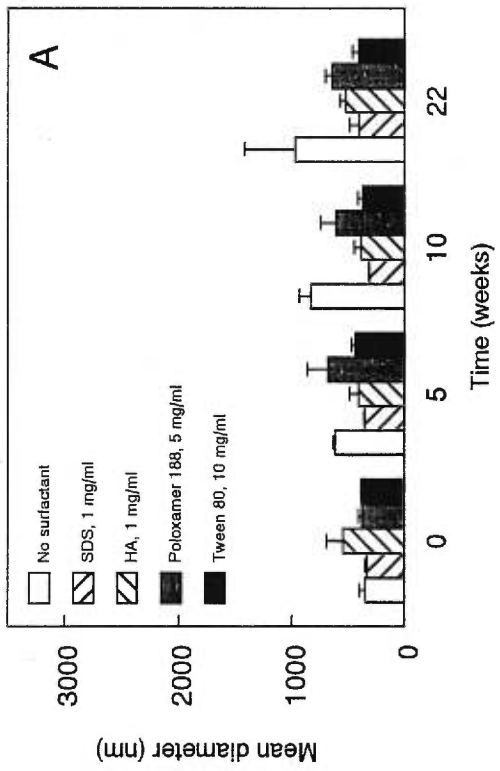
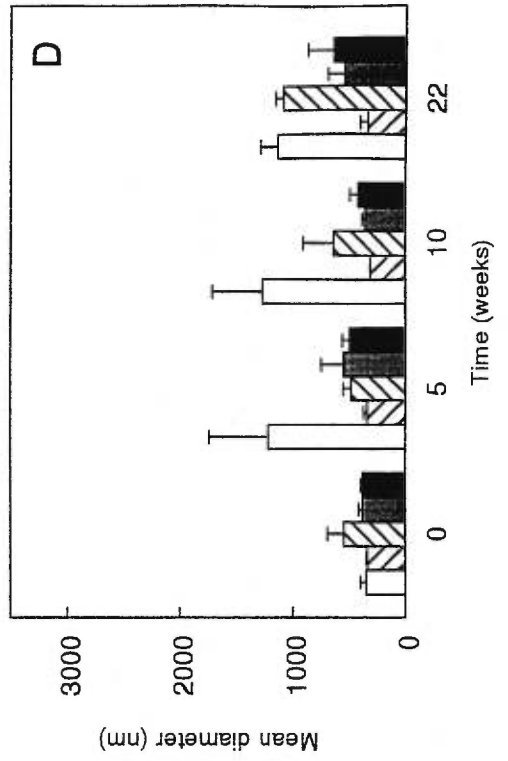
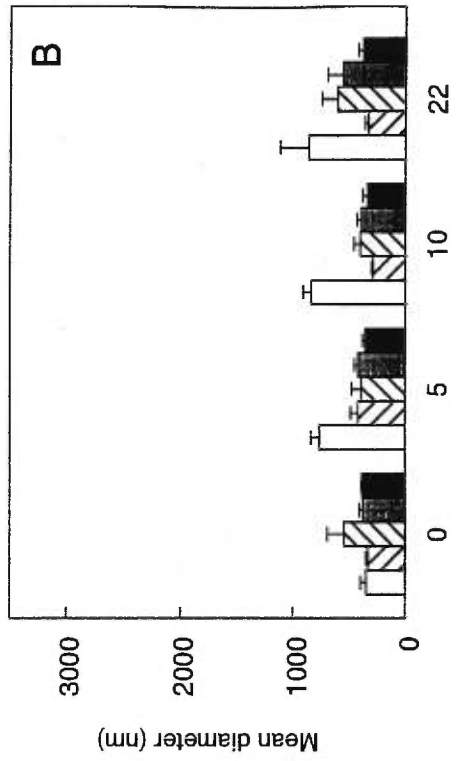
**Figure 1:** The effect of different surfactants on the  $\zeta$  potential of *M. phlei* cell wall fragments. The  $\zeta$  potential of *M. phlei* cell wall fragment suspensions was determined in the presence of the different surfactants in the concentration range 0.1 to 10  $\mu\text{g/ml}$ . With the exception of the cationic surfactant DDAB (5 and 10  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0.05$  versus control, Student's t-test), none of the surfactants had any significant effect on cell wall fragment  $\zeta$  potential. The results shown are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

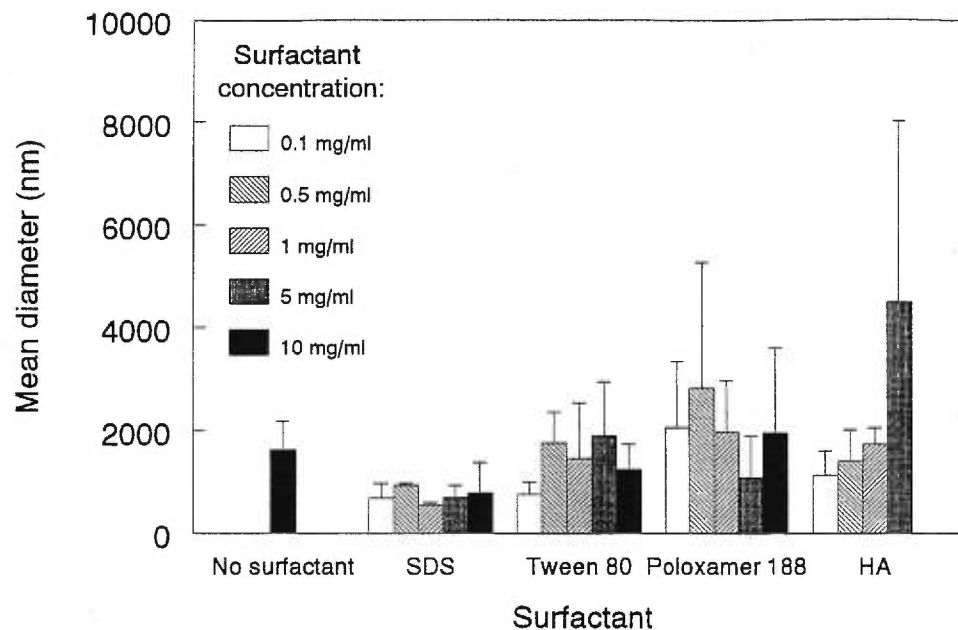


**Figure 2:** Average particle size of *M. phlei* cell wall fragment suspensions after 4 weeks of storage at (A) 4°C, (B) 23°C, (C) 37°C and (D) 55°C. Initial *M. phlei* cell wall fragment diameters were all between  $334.7 \pm 15.1$  and  $542.1 \pm 99.6$  nm except for the case of the suspension containing 5 mg/ml HA, where the initial diameter after formulation was  $941.2 \pm 75.4$  nm. The results shown are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.



**Figure 3:** Average particule size of *M. phlei* cell wall fragments suspensions during 22 weeks of storage at (A) 4°C, (B) 23°C, (C) 37°C and (D) 55°C. The results shown are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.





**Figure 4:** Changes in mean particle size of *M. phlei* cell wall fragments suspensions after autoclaving at 121°C for 20 minutes. Freshly prepared *M. phlei* cell wall fragments suspensions (initial diameter  $536.3 \pm 294.9$ ) were formulated with the surfactants at the indicated final concentrations, and immediately autoclaved. Particle size was determined 24 h after autoclaving. The results shown are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

## **CHAPITRE 3**

**TUMOR CELL DIVISION INHIBITORY ACTIVITY AND CELLULAR  
TOXICITY OF *MYCOBACTERIUM PHLEI* CELL WALL SUSPENSIONS**

**TUMOR CELL DIVISION INHIBITORY ACTIVITY AND  
CELLULAR TOXICITY OF *MYCOBACTERIUM PHLEI* CELL  
WALL SUSPENSIONS**

Emmanuelle Roux<sup>1</sup> and Nigel C. Phillips<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>2</sup> Bioniche Inc., 6100 Royalmount, Montreal, Quebec, Canada H4P 2R2

Running title: Mycobacterial cell wall activity

Key words: Mycobacterial cell wall, antitumor activity, cellular toxicity

Correspondence to:

Nigel C. Phillips, Ph.D.,  
Bioniche Life Sciences Inc.,  
6100 Royalmount,  
Montreal, Quebec, Canada H4P 2R2  
H4P 2R2

Telephone: (514) 496-7723

Fax: (514) 496-7725

E-mail: [nigel.phillips@nrc.ca](mailto:nigel.phillips@nrc.ca) or [nphillips@bioniche.com](mailto:nphillips@bioniche.com)

This manuscript was submitted to the *Journal of Pharmacy and Pharmacology*

## ABSTRACT

Cell wall extracts from *Mycobacterium phlei* formulated as mineral oil emulsions reduce carcinoma *in situ* of the bladder tumor burden following intravesical administration. Pharmaceutical formulations containing mineral or organic oils are often restricted to topical administration because of systemic toxicity. It may however be possible to extend the use of mycobacterial cell wall extracts for the systemic treatment of other cancers by the development of formulations appropriate for parenteral administration. In this study we have evaluated the stability, *in vitro* antitumor activity and cellular toxicity of a mycobacterial cell wall extract from *M. phlei*, formulated as a suspension with the surfactants poloxamer 188, sodium dodecyl sulfate, sodium hyaluronate and Tween 80. The *in vitro* antitumor activity was determined using B16 murine melanoma cells and THP1 human leukemia cells, and toxicity was determined using these tumor cell lines and murine macrophages. The results demonstrate that SDS and Tween 80 (with or without cell wall fragments) were toxic towards murine macrophages, B16 melanoma cells and THP1 leukemia cells. Cell wall fragments formulated with HA or poloxamer 188 were however non-toxic, stable, and maintained their ability to inhibit tumor cell division on storage at 4°C-55°C. These formulations may therefore be suitable for parenteral administration.



## INTRODUCTION

Mycobacterial cell wall extracts derived from the non-pathogenic microorganism *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) and formulated as mineral oil emulsions have been shown to have antitumor activity in animal models of cancer (Kadhim *et al.*, 1993; Chin *et al.*, 1996, Morales *et al.*, 1995). Intravesical therapy of patients with carcinoma *in situ* of the bladder with such emulsions has also been shown to reduce bladder cancer burden (Morales and Chin, 1997).

Mycobacterial cell wall extracts from *M. phlei* are partially delipidated and partially deproteinized macromolecular complexes. A number of molecular structures contained within macromolecular complexes associated with mycobacterial or bacterial cell wall preparations are known to possess indirect and direct antitumor activity both *in vitro* and *in vivo*. Peptidoglycan, a major constituent of bacterial cell walls that stimulates host defense cells (Rasanen and Arvilommi, 1982; Lawrence and Nauciel, 1998), also has a direct cytotoxic effect on tumor cells (Fichera and Giese, 1994). N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP), the minimal structure of cell wall peptidoglycan possessing biological activity, enhances nonspecific resistance to cancer by modulating the activity of immune effector cells such as monocytes/macrophages and T- and B-lymphocytes (Oppenheim *et al.*, 1980; Dozmorov *et al.*, 1991). MDP stimulates the synthesis of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), IL-6 and interferon- $\gamma$  (Adams *et al.*, 1995; Choon Yoo *et al.*, 1995; Parant *et al.*, 1995), but does not have a direct effect on tumor cells (Fidler *et al.*, 1982; Phillips *et al.*, 1984; Moras *et al.*, 1985).

Mycolic acid derivatives such as trehalose dimycolate (TMD) have been used in combination with MDP or mycobacterial cell wall skeleton for the nonspecific immunotherapy of cancer as emulsions in mineral or organic oils (Yarkoni *et al.*, 1981; Vosika, 1983). A direct effect of mycolic acid derivatives on tumor cells has not been reported. Complex polysaccharides isolated from BCG or *M. vaccae* have antitumor activity *in vivo*, but do not appear to directly affect tumor cells (Lou *et al.*, 1994; Tian *et al.*, 1999). In contrast to the lack of direct activity shown in the above studies, we have recently shown that a mycobacterial cell wall complex from *M. phlei* directly inhibit the division of human bladder tumor cells, and that this inhibition is associated with the induction of apoptosis (Filion *et al.*, 1999).

The systemic toxicity and immune adjuvant pathology associated with mineral oil emulsions is well known (Miller *et al.*, 1996; Rollins *et al.*, 1997). Although aqueous preparations of mycolic acid derivatives do not induce granuloma following intravenous injection, formulation in mineral oil emulsions can lead to profound granuloma formation and immunotoxicity (Behling *et al.*, 1993). Because of the presence of mycolic acids in mycobacterial cell wall extracts, formulation as mineral oil emulsions is essentially restricted to external application or low-dose parenteral administration. It may be possible to extend the use of mycobacterial cell wall extracts for the treatment of cancer by the use of surfactant-based formulations that are appropriate for parenteral administration.

In this study, we have evaluated the stability of mycobacterial cell wall fragments formulated with various surfactants appropriate for intravenous or parenteral administration, and have determined their *in vitro* toxicity towards murine macrophages as well as their antitumor activity towards B-16 murine melanoma cells and THP1 human leukemia cells.

## MATERIALS AND METHODS

### *Materials*

Mycobacterial cell wall extract from *M. phlei* was supplied by Bioniche Life Sciences (London, Ontario, Canada) as a sterile, lyophilized hygroscopic powder. Tween 80, dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide (MTT) and a colorimetric lactate dehydrogenase (LDH) assay kit were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Pluronic F68 (poloxamer 188) was obtained from BASF (Rexdale, Ontario, Canada). Sodium dodecyl sulfate (SDS, molecular biology grade) was obtained from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). Hyaluronic acid, sodium salt (HA) was supplied by Bioniche Life Sciences as a 10 mg/ml sterile solution in 0.85% NaCl (w/v). All other chemicals and reagents were of analytical grade or better. Eagle's minimum essential medium (MEM), RPMI 1640 medium, MEM non-essential amino acids,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS, gentamycin sulfate, fetal bovine serum, trypsin, 96-well tissue culture plates and T75 tissue culture flasks were obtained from Gibco Life Sciences (Burlington, Ontario, Canada). B16 murine melanoma cells and THP1 human leukemia cells were obtained

from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD) and maintained in culture as recommended. Brewer's thioglycollate broth powder was obtained from Difco (Detroit, MI).

## *Methods*

### *Preparation of M. phlei cell wall fragment suspensions*

All preparations were carried-out in a class-100 laminar flow hood using sterile reagents and depyrogenized (180°C, 4 h) and sterilized glassware. Suspensions of *M. phlei* cell wall extract in 0.85% NaCl (w/v) or phosphate-buffered saline (PBS, 0.85% NaCl containing 10mM sodium phosphate, pH 7.40) were fragmented by sonication using a tapered microtip (1/8") for up to 60 min at 1-2 °C (Sonic Dismembrator, Model 550, Misonics, NY: power 550 W; frequency 20 kHz; intensity level 4). The surfactants were sterilized as followed: Tween 80 solution was sterilized by membrane filtration (0.22 micron), poloxamer 188 solution was autoclaved, and sodium dodecyl sulfate was suspended in 100% ethanol, incubated for 30 minutes, after which the ethanol was removed by evaporation under vacuum. Sonicated cell wall fragments (final concentration 1 mg/ml) were mixed with the various surfactants and incubated at 4°C, 23°C, 37°C and 55°C in glass bottles in the dark for up to 22 weeks. Each suspension was prepared in triplicate.

### *Particle size measurement*

The particle size distribution of the *M. phlei* cell wall preparation and of the sonicated cell wall fragments during incubation was determined by photon correlation spectroscopy (N4 Plus, Coulter Electronics, Miami, FL). Cell wall fragment suspensions were diluted with PBS solution to give a particle count rate of  $5 \times 10^4$ - $1 \times 10^6$  counts/s. Mean particle diameters were determined in size distribution mode (SDP) using the following conditions: 23°C measurement temperature; 1.33 fluid refractive index; viscosity 0.93 centipoise; 90° measurement angle; 10.5  $\mu$ s sample time, and 60 s sample run time.

### *Inhibition of B16 melanoma cell and THP1 leukemia cell proliferation*

Cell wall preparations from *M. phlei* have been shown to inhibit cancer cell proliferation *in vitro* (Filion *et al.*, 1999). The ability of *M. phlei* cell wall fragments formulated with different surfactants to inhibit B16 melanoma cell and THP1 leukemia cell proliferation *in vitro* was determined using a cell proliferation assay. Monolayers of B16 melanoma cells in MEM containing 10% v/v decompemented fetal bovine serum (56°C, 30 min), 10  $\mu$ g/ml gentamycin sulfate and 1 x non-essential amino acids (MEM-FCS) were washed with  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS containing 10  $\mu$ g/ml gentamycin sulfate, trypsinized (1 ml containing 10  $\mu$ g/ml), suspended in MEM-FCS, and then plated in 96-well tissue culture plates (100  $\mu$ l MEM-FCS containing  $5 \times 10^3$  viable cells). Monolayers of THP1 leukemia cells in RPMI 1640 containing 10% v/v heat-inactivated fetal bovine serum and 10  $\mu$ g/ml

gentamycin sulfate (RPMI-FCS) were treated as for B16 melanoma cells and then plated in 96-well tissue culture plates (100  $\mu$ l RPMI-FCS containing  $5 \times 10^3$  viable cells). *M. phlei* cell wall fragments or the equivalent concentration of surfactants alone were added to each well, after which the tumor cells were incubated for 48 hours at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Tumor cell division was measured by the reduction of MTT as described by Mosman (1983). Briefly, MTT (10  $\mu$ l containing 5 mg/ml MTT in PBS) was added to the tumor cell cultures at the end of 48 hours, and incubation was carried-out for a further 4 hours at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Acid-isopropanol (100  $\mu$ l containing 0.4 M HCl) was added to each well to dissolve reduced MTT, which was then measured at a wavelength of 570 nm in an ELISA plate reader.

#### *Murine peritoneal inflammatory exudate macrophages*

CD1 female mice (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada; 12-15 weeks of age) were injected i.p. with 2 ml sterile Brewer's thioglycollate broth. Peritoneal inflammatory exudate cells were harvested 4 days later by peritoneal lavage with 10 ml MEM containing 10  $\mu$ g/ml gentamycin sulfate. The inflammatory exudate (consisting of  $\geq 85\%$  macrophages) was washed by centrifugation (150 x g, 4°C, 10 min), and the cell pellet suspended in MEM-FCS. Total and viable cells (trypan blue exclusion) were determined using an hemocytometer.

### *Toxicity*

Cellular necrosis is associated with the release of the cytoplasmic enzyme LDH. The *in vitro* toxicity of *M. phlei* cell wall fragments or of the different surfactants towards normal murine macrophages, murine B16 melanoma cells or THP1 leukemia cells was determined by modification of a commercial LDH assay kit (Phillips *et al.*, 1996). Peritoneal inflammatory exudate macrophages were plated in 96-well culture plates (100  $\mu$ l medium containing  $1 \times 10^5$  macrophages), and allowed to adhere for a minimum of 4 hours at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The cells were washed with medium to remove non-adherent cells, and 100  $\mu$ l fresh MEM-FCS was added to each well, after which the cells were incubated for 48 hours at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. B16 melanoma cells and THP1 leukemia cells were plated in 96-well tissue culture plates (100  $\mu$ l MEM-FCS containing  $5 \times 10^3$  viable cells plates or 100  $\mu$ l RPMI-FCS containing  $5 \times 10^3$  viable cells respectively) as described for the MTT assay. *M. phlei* cell wall fragment preparations or the equivalent concentration of surfactants alone were added to each well, after which the cells were incubated for 48 hours at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. LDH activity in the supernatant was used as an indicator of cell death due to necrosis. Total LDH content was determined by incubating the cells with 1% v/v final concentration Triton X-100 to induce cell lysis.

### *Nitric oxide synthesis*

Murine macrophage activation by bacterial cell wall components such as lipopolysaccharide (LPS) (Gram-negative bacteria) or muramyl dipeptides (MDP) (Gram-negative and Gram-positive bacteria) results in the induction and synthesis of nitric oxide (NO $\cdot$ ) (Barrat *et al.*, 1991), a toxic free radical associated with host defense mechanisms (Moncada *et al.*, 1991). The ability of *M. phlei* cell wall fragments, either alone or in combination with the different surfactants, to induce NO $\cdot$  synthesis was therefore determined. NO $_2^-$  (a stable degradation product of NO $\cdot$ ) in the supernatant of the treated macrophages was determined by mixing 50  $\mu$ l cell culture supernatant with 50  $\mu$ l Griess reagent (1% w/v sulfanilamide in 2.5% v/v H $_3$ PO $_4$  mixed with an equal volume of 0.1% w/v N-(1-naphthyl)ethylenediamine HCl in H $_2$ O) and determining the absorbance at 570 nm against NaNO $_2$  standards (Phillips and Gagné, 1995).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### *Effect of storage on physical stability*

The stability of nanoparticle-sized suspensions is strongly dependent on the particle size and charge distribution of the solid phase, with particle charge neutralization often leading to aggregation (Douglas *et al.*, 1987; Freitas and Muller, 1999). Nonionic surfactants such as Tween 80 (Kronberg *et al.*, 1990) or ionic surfactants such as oleic acid (Yamaguchi *et al.*, 1995) are capable of stabilizing such formulations. The physical



stability of *M. phlei* cell wall fragment suspensions in the absence of surfactant and in the presence of SDS, HA, Poloxamer 188 and Tween 80 at various concentrations during storage at 4°C, 23°C, 37°C and 55°C was initially evaluated over a period of 4 weeks (data not shown). For each surfactant, the concentration giving the most stable suspension was selected for a longer-term stability study over 22 weeks.

Figure 1 shows the stability of *M. phlei* cell wall fragments without surfactant and in the presence of 1 mg/ml SDS, 1 mg/ml HA, 5 mg/ml Poloxamer 188 and 10 mg/ml Tween 80 at 4°C (figure 1A), 23°C (figure 1B), 37°C (figure 1C) and 55°C (figure 1D). *M. phlei* cell wall fragments and their formulations with the various surfactants were all stable during incubation at 4°C as well as at 23°C over the 22 week period. However, aggregation of *M. phlei* cell wall fragments occurred at 37°C and 55°C. With the exception of HA, the surfactants prevented aggregation at all temperatures. Formulations of *M. phlei* cell wall fragments containing 1 mg/ml HA were stable at 4°C, 23°C and 37°C but not at 55°C (particle diameter of  $\approx 1000$  nm after 22 weeks of incubation), a temperature at which HA undergoes considerable degradation (Lowry and Beavers, 1994). A long-term stability study was also carried-out with SDS at 0.15 mg/ml, a concentration that is used commercially for the formulation of Interleukin-2 for parenteral administration (Proleukin®, Chiron Therapeutics). *M. phlei* cell wall fragment suspensions containing 0.15 mg/ml SDS were also stable over the 22 week incubation period.

### *Inhibition of cancer cell division by M. phlei cell wall fragments*

*M. phlei* cell wall complexes have been shown to have a direct effect on cancer cell proliferation (Filion *et al.*, 1999). We have therefore evaluated the ability of *M. phlei* cell wall fragment suspensions to the division of B16 murine melanoma cells and of THP1 human leukemia cell. As shown in figure 2, *M. phlei* cell wall fragment suspensions inhibit B16 murine melanoma cell division in a dose-dependent manner with an IC<sub>50</sub> of  $0.6 \pm 0.08$  µg/ml (mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments). *M. phlei* cell wall fragment suspensions also inhibited THP1 leukemia cell division, but with an IC<sub>50</sub> of  $23.8 \pm 1.7$  µg/ml (mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments).

A number of surfactants have been shown to possess significant cytotoxic activity, either alone (Arechabala *et al.*, 1999) or in combination with chemotherapeutic agents (Tsuji no *et al.*, 1999). To study the activity of the various surfactant formulations, we evaluated the activity of the surfactants alone or in combination with *M. phlei* cell wall fragments towards B16 melanoma cells and THP1 leukemia cells. Figure 3A shows that SDS at concentrations greater than 100 µg/ml either alone or in formulation inhibits cellular division of B16 melanoma cells and to a lesser extent THP1 leukemia cells (data not shown). In contrast HA has practically no inhibitory activity towards B16 cells, as shown in figure 3B, and it does not affect the activity of *M. phlei* cell wall fragments. However, HA had significant activity (29% inhibition of cell division) towards THP1 leukemia cells at concentrations greater than 500 µg/ml. Poloxamer 188 also inhibited B16 cell proliferation, but was non-additive with *M. phlei* cell wall fragments, as shown in figure

3C. Poloxamer 188 had no activity towards THP1 leukemia cells. Tween 80 inhibited B16 melanoma cell division at concentrations above 100  $\mu\text{g/ml}$ , but was non-additive with *M. phlei* cell wall fragments, as shown on figure 3D. Tween 80 had no intrinsic inhibitory towards THP1 leukemia cells at low concentrations ( $<100 \mu\text{g/ml}$ ), but inhibited cell division at concentrations greater than 500  $\mu\text{g/ml}$ .

*Effect of storage on M. phlei cell wall fragment formulation antitumor cell activity*

The ability of *M. phlei* cell wall fragment formulations to inhibit the division of B16 melanoma cells was determined at the end of the 22 week incubation. No significant differences in the  $\text{IC}_{50}$  values compared to freshly prepared *M. phlei* cell wall fragments were observed for *M. phlei* cell wall fragments alone or formulated with HA (1 mg/ml), poloxamer 188 (5 mg/ml) or SDS (0.15 mg/ml) when incubated at 4°C, 23°C, 37°C or 55°C (3 separate experiments, 2-way ANOVA with replicates). There also were no significant differences between *M. phlei* cell wall fragments alone or formulated with surfactant, or between the different incubation temperatures. The effect of storage on the cell division inhibitory activity of *M. phlei* cell wall fragments formulated with Tween 80 was not examined.

### *Toxicity of M. phlei cell wall fragment formulations towards cancer cells*

It has been previously reported that *M. phlei* cell wall complexes are not cytotoxic towards human bladder cells (Filion *et al.*, 1999). The results of the present study show that *M. phlei* cell wall fragments are not toxic towards B16 murine melanoma cells, as determined by LDH release. Similarly, no toxicity was observed with THP1 human leukemia cells (data not shown).

To study the toxicity of the formulations, we evaluated the activity of the surfactants alone and in combination with *M. phlei* cell wall fragments towards B16 melanoma cells and THP1 leukemia cells. In general, the toxicity of the formulations towards THP1 cells was comparable to that of B16 melanoma cells, and only the results for B16 melanoma are reported. As shown in figure 4A, SDS and SDS cell wall formulations exhibit significant toxicity towards B16 melanoma cells at a concentration of 100 µg/ml SDS. Toxicity determinations at higher concentrations were not possible because of interference in the LDH assay by SDS. However, the results obtained with the cellular division assays (100% inhibition, fig 3A) are strongly indicative of complete cell death following treatment with 500 and 1000 µg/ml SDS. HA and HA-formulated *M. phlei* cell wall fragments were non-toxic towards B16 melanoma cells, with <20% LDH release at every concentration tested (figure 4B). Similar results were obtained with THP1 leukemia cells. Poloxamer 188 was not toxic towards B16 melanoma cells (figure 4C) or THP1 leukemia cells (data not shown). Although Tween 80 alone was not toxic at 500 µg/ml, Tween 80-formulated *M. phlei* cell wall fragments had significant toxicity towards

B16 melanoma cells, as shown in figure 4D. The toxicity of Tween 80 at 1000  $\mu\text{g/ml}$  was also enhanced when formulated with *M. phlei* cell wall extract fragments. Similar results were obtained with THP1 leukemia cells (data not shown).

The surfactant Tween 80 has previously been shown to have little or no toxicity towards cultured fibroblasts (Arechabala *et al.*, 1999). The effect of a variety of detergents (non-ionic, ionic and bile derivatives) on B16 melanoma cells after short-term exposure (2 and 30 min) has been previously examined by Partearroyo *et al.* (1990). Of the surfactants that we have tested in this study, only the effect of SDS appears to have been previously reported. The  $\text{IC}_{50}$  of SDS for B16 melanoma cells found in the present study ( $97 \pm 19$   $\mu\text{g/ml}$ , mean  $\pm$  SD, 3 experiments) is significantly less than the reported CMC value ( $\approx 2400$   $\mu\text{g/ml}$ , Wade and Weller, 1994), indicating that the monomeric, not the micellar form, is responsible for the observed toxicity. Comparable results have been previously obtained on rabbit corneal epithelial cells after treatment for 1h with SDS, where an  $\text{IC}_{50}$  of  $50\mu\text{g/ml}$  was observed (Grant *et al.*, 1992).

The *in vitro* effect of surfactants, especially Tween 80, on the modulation of the cytotoxic activity of a number of antitumor agents has been extensively studied (Bar-Shira-Maymon *et al.*, 1980; Parris *et al.*, 1987; Tsujino *et al.*, 1999). Tween 80 appears to act as a membrane-active agent that increases cell membrane permeability to drugs. The antitumor activity of emulsified mycobacterial components containing Tween 80 administered intratumorally in mice has been shown to be dependent on the concentration of Tween 80 in the emulsions (Yarkoni and Rapp, 1980). The results of the present study

indicate that the *in vitro* antitumor activity of *M. phlei* cell wall fragments is enhanced only in combination with a cytotoxic concentration of surfactant.

#### *Toxicity of M. phlei cell wall fragments towards murine macrophages*

With the exception of Tween 80 (Kronberg *et al.*, 1990), the toxicity of surfactants towards macrophages does not appear to have been investigated. Similarly, although the ability of macrophages to kill ingested mycobacteria is well established (Gros *et al.*, 1983; Radzioch *et al.*, 1991), the effect of mycobacterial cell wall fragments on macrophage viability does not appear to have been determined. We have therefore evaluated the toxicity of the *M. phlei* cell wall fragments and the surfactant-containing formulations towards murine macrophages. As shown on figure 5A, *M. phlei* cell wall fragments were not toxic towards macrophages at low concentrations, but were toxic at 10 and 100 µg/ml. The induction of apoptosis in murine macrophages by *M. tuberculosis* has been shown to be related to the induction of NO<sup>•</sup> synthesis (Rojas *et al.*, 1998). The effect of *M. phlei* cell wall fragments on NO<sup>•</sup> synthesis by macrophages was therefore determined. As shown on figure 5B, *M. phlei* cell wall fragments stimulated the synthesis of NO<sup>•</sup> by murine macrophages in a dose-dependent manner that correlated with LDH release (fig 5A). We have not formally carried-out apoptosis measurements such as genomic DNA fragmentation or caspase activation in macrophages following treatment with *M. phlei* cell wall fragments. These data indicate that should such a mechanism occur, necrosis and LDH release rapidly follow it.

To evaluate the toxicity of *M. phlei* cell wall fragment formulations, we have examined surfactant toxicity alone and in combination with 1 µg/ml *M. phlei* cell wall fragment, a concentration that is non-toxic. Only SDS and Tween 80 at high concentration were toxic (65% toxicity for SDS at 100 µg/ml and 75% toxicity for Tween 80 at 500 µg/ml). In the course of a systemic study of detergents effect using 11 different cell lines, it has been shown that the surfactant concentration modulating cell division is dependent on the detergent rather than upon the cell type (Tobler *et al.*, 1980). Similar conclusions can be draw from the present study. It is clear that in view of their toxicity, SDS and Tween 80 may be not acceptable as surfactants for the parenteral administration of *M. phlei* cell wall fragments. In contrast, HA and Poloxamer 188 appear to have satisfactory particle stabilizing activity and minimal toxicity.

## REFERENCES

Adams, J.L., Czuprynsky, C.J. (1995) Ex vivo induction of TNF-alpha and IL-6 mRNA in bovine whole blood by *Mycobacterium paratuberculosis* and mycobacterial cell wall components. *Microb. Pathog.* 19: 19-29.

Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, L.J., de Roeck-Holtzhauer, Y. (1999) Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J. Appl. Toxicol.* 19: 163-5.

Barrat, G.M., Raddassi, K., Petit, J.F., Tenu, J.P. (1991) MDP and LPS act synergistically to induce arginine-dependent cytostatic activity in rat alveolar macrophages. *Eur. J. Immunol.* 13: 159-165.

Bar-Shira-Maymon, B., Michowitz, M., Gibli, O., Klein, O., Pinchasov, A., Leibovici, J. (1992) Effect of a membrane-active agent on uptake of adriamycin in Lewis lung carcinoma cells derived from 'primary' and 'metastatic' growths. *Chemotherapy* 38: 66-73.

Behling, C.A., Perez, R.L., Kidd, M.R., Staton, G.W. Jr, Hunter, R.L., (1993) Induction of pulmonary granulomas, macrophage procoagulant activity, and tumor necrosis factor-alpha by trehalose glycolipids. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 23: 256-66.



Chin, J.L., Kadhim, S.A., Batislam, E., Karlik, S.J., Garcia, B.M., Nickel, J.C., Morales, A. (1996) Mycobacterium cell wall: an alternative to intravesical bacillus Calmette Guérin (BCG) therapy in orthotopic murine bladder cancer. *J. Urol.* 156: 1189-1193.

Choon Yoo, Y., Yoshimatsu, K., Hatsuse, R., Tamura, M., Yoshida, R., Tonooka, S., Arikawa, J., Azuma, I. (1995) Effect of MDP-Lys (L18), a derivative of MDP, on enhancing host resistance against Hantaan virus infection in newborn mice. *Vaccine* 13: 1300-1305.

Douglas, S.J., Davis, S.S., Illum, L. (1987) Nanoparticles in drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 3: 233-61.

Dozmorov, I.M., Bagaeva, L.V., Kuzin, I.I., Svirshchevskaya, E.V. (1991) Target cells for immunomodulatory action of muramyl dipeptide. *Biomed. Sci.* 2: 193-7.

Fichera, G.A., Giese, G. (1994) Non-immunologically-mediated cytotoxicity of *Lactobacillus casei* and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. *Cancer Lett.* 85: 93-103.

Fidler, I.J., Barnes, Z., Fogler, W.E., Kirsh, R., Bugelski, P., Poste, G. (1982) Involvement of macrophages in the eradication of established metastases following

intravenous injection of liposomes containing macrophage activators. *Cancer Res.* 42: 496-501.

Filion, M.C., Lépicier, P., Morales, A., Phillips, N.C. (1999) *Mycobacterium phlei* cell wall complex directly induces apoptosis in human bladder cancer cell. *Brit. J. Cancer* 79: 229-35.

Freitas, C., Muller, R.H. (1999) Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion after addition of electrolyte. *J. Microencapsul.* 16: 59-71.

Grant, R.L., Yao, C., Gabaldon, D., Acosta, D. (1992) Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. *Toxicology* 76: 153-76.

Gros, P., Skamene, E., Forget, A. (1983) Cellular mechanisms of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J. Immunol.* 131: 1966-72.

Kadhim, S.A., Chin, J.L., Batislam, E., Karlick, S., Garcia, B.M., Nickel, J.C., Morales, A. (1993) Modification of intravesical bacillus Calmette Guerin (BCG) therapy in orthotopic murine bladder tumor by the use of mycobacterial cell wall extract (MCWE). *J. Urol.* 149: A225.

Kronberg, B., Dahlman, A., Carlfors, J., Karlsson, J., Artursson, P. (1990) Preparation and evaluation of sterically stabilized liposomes: colloidal stability, serum stability, macrophage uptake, and toxicity. *J. Pharm. Sci.* 79: 667-71.

Lawrence, C., Nauciel, C. (1998) Production of interleukin-12 by murine macrophages in response to bacterial peptidoglycan. *Infect. Immun.* 66: 4947-9.

Lou, Y., Groves, M.J., Klegerman, M.E. (1994) In vivo and in vitro targeting of a murine sarcoma by gelatin microparticles loaded with a glycan (PS1). *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 863-6

Lowry, K.M., Beavers, E.M. (1994) Thermal stability of sodium hyaluronate in aqueous solution. *J. Biomed. Mater. Res.* 28: 1239-44.

Miller, M.J., Lonardo, E.C., Greer, R.D., Bevan, C., Edwards, D.A., Smith, J.H., Freeman, J.J. (1996) Variable responses of species and strains to white mineral oils and paraffin waxes. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 23: 55-68.

Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.

Morales, A., Chin, J.L. (1997) Mycobacterial cell wall (MCW) as an alternative to BCG in the treatment of carcinoma-in-situ (CIS) of bladder: an efficacy study. *J. Urol.* 157: A214.

Morales, A., Nickel, J.C., Downey, J., Clark, J., van der Linden, I. (1995) Immunotherapy of an experimental adenocarcinoma of the prostate. *J. Urol.* 153: 1706-10.

Moras, M.L., Phillips, N.C., Bahr, G.M., Chedid, L. (1985) *In vitro* inhibition of murine B-cell tumor growth by MDP, MDP(D-D) and Vaccin is mediated by macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* 7: 515-24.

Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.

Oppenheim, J.J., Togawa, A., Chedid, L., Mizel, S. (1980) Components of mycobacteria and muramyl dipeptide with adjuvant activity induce lymphocyte activating factor. *Cell. Immunol.* 50: 71-81.

Parant, M.A., Pouillart, P., Le Contel, C., Parant, F.J., Chedid, L.A., Bahr, G.M. (1995) Selective modulation of liposaccharide-induced death and cytokine production by various muramyl peptides. *Infect. Immun.* 63: 110-115.

Parris, C.N., Masters, J.R., Walker, M.C., Newman, B., Riddle, P., English, P. (1987) Intravesical chemotherapy: combination with Tween 80 increases cytotoxicity *in vitro*. Urol. Res. 15: 17-20.

Partearroyo, M.A., Ostolaza, H., Goni, F.M., Barbera-Guillem, E. (1990) Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. A study using B16 melanoma cells. Biochem. Pharmacol. 40: 1323-8.

Phillips, N.C., Gagné, L. (1995) Modulation of murine macrophage nitric oxide synthesis by liposomal phospholipids: Correlation with liposome immune adjuvant activity. J. Drug Target. 3: 137-147.

Phillips, N.C., Bahr, G.M., Modabber, F.Z., Chedid, L. (1984) Modulation of the growth of murine thymoma cell lines having different Lyt-phenotypes by MDP and MDP(D-D): macrophage-mediated inhibition of *in vitro* cell growth. Int. J. Immunopharmacol. 6: 577-85.

Phillips, N.C., Gagné, L., Ivanoff, N., Riveau, G. (1996) Influence of phospholipid composition on antibody responses to liposome encapsulated protein and peptide antigens. Vaccine 14: 898-904.

Radzioch, D., Hudson, T., Boule, M., Barrera, L., Urbance, J.W., Varesio, L., Skamene, E. (1991) Genetic resistance/susceptibility to mycobacteria: phenotypic expression in bone marrow derived macrophage lines. *J. Leukoc. Biol.* 50: 263-72.

Rasanen, L., Arvilommi, H. (1982) Cell walls, peptidoglycans, and teichoic acids of Gram-positive bacteria as polyclonal inducers and immunomodulators of proliferative and lymphokine responses of human B and T lymphocytes. *Infect. Immun.* 35: 523-7.

Rojas, M., Barrera, L.F., Garcia, L.F. (1998) Induction of apoptosis in murine macrophages by *Mycobacterium tuberculosis* is reactive oxygen intermediate-independent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 436-42.

Rollins, C.E., Reiber, G., Guinee, D.G. Jr, Lie, J.T. (1997) Disseminated lipogranulomas and sudden death from self-administered mineral oil injection. *Am. J. Forensic. Med. Pathol.* 18: 100-3.

Tian, X.X., Li, A., Zhou, W., Farrugia, I.V., Groves, M.J. (1999) Isolation and biological activities of an antineoplastic protein-polysaccharide complex (PS4A) obtained from *Mycobacterium vaccae*. *Anticancer Res.* 19: 237-43.

Tobler, J., Watts, M.T., Fu, J.L. (1980) An *in vitro* and *in vivo* investigation of three surface-active agents as modulator of cell proliferation. *Cancer Res.* 40: 1173-1180.

Tsujino, I., Yamazaki, T., Masutani, M., Sawada, U., Horie, T. (1999) Effect of Tween-80 on cell killing by etoposide in human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43: 29-34.

Vosika, G.J. (1983) Clinical immunotherapy trials of bacterial components derived from *Mycobacteria* and *Nocardia*. *J. Biol. Response Mod.* 2: 321-42.

Wade, A., Weller, P.J. (1994) Handbook of pharmaceutical excipients, 2<sup>nd</sup> edn. Ed.: Ainley Wade and Paul J. Weller. Pharmaceutical Press, Washington, DC.

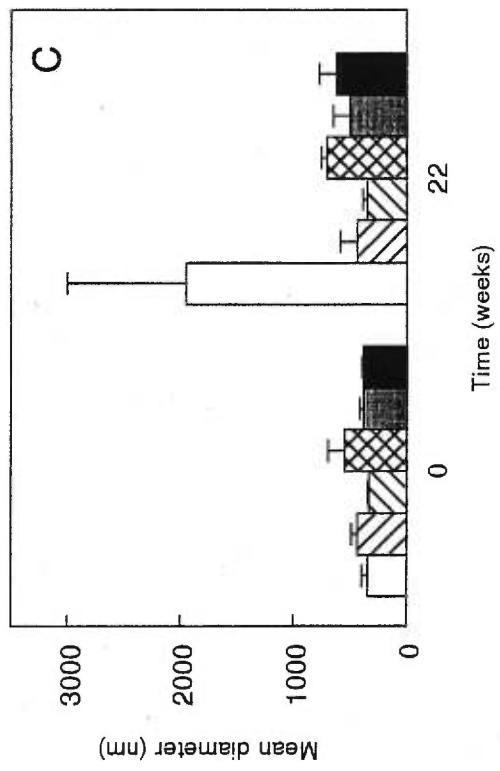
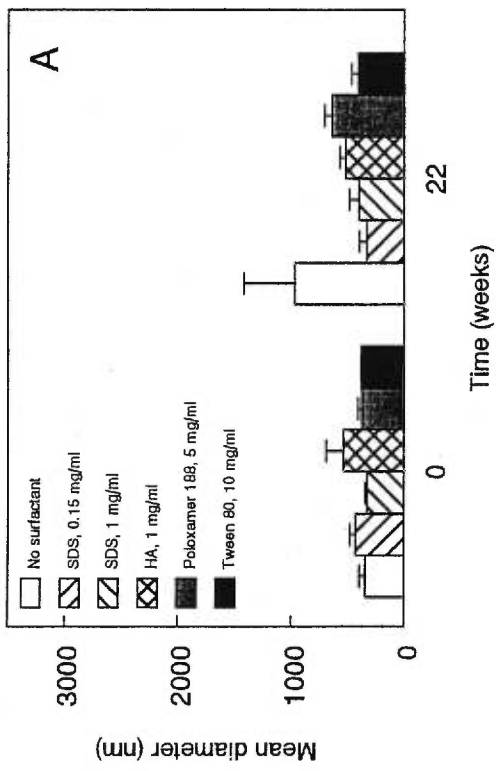
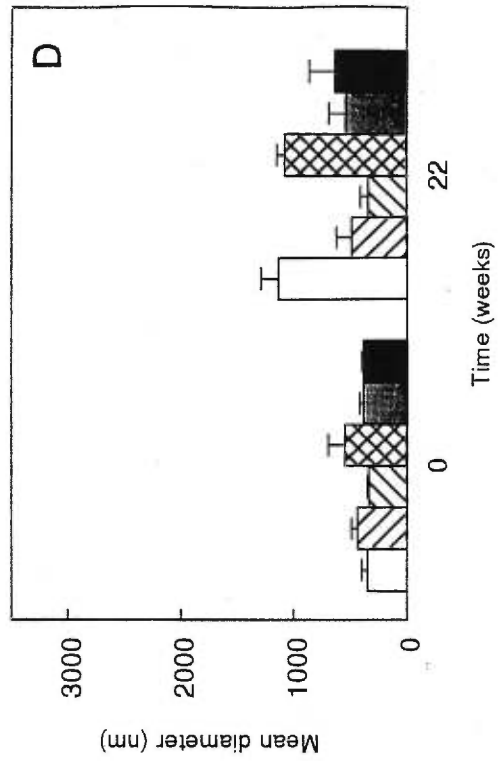
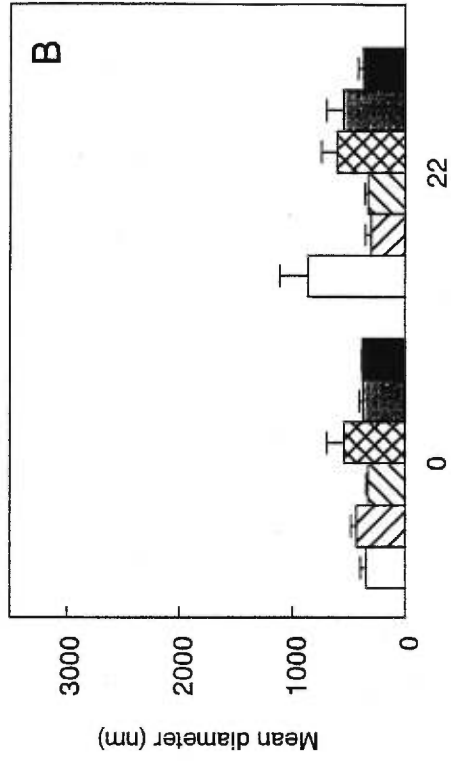
Yamaguchi, T., Nishizaki, K., Itai, S., Hayashi, H., Ohshima, H. (1995) Physicochemical characterization of parenteral lipid emulsion: influence of cosurfactants on flocculation and coalescence. *Pharm. Res.* 12: 1273-8.

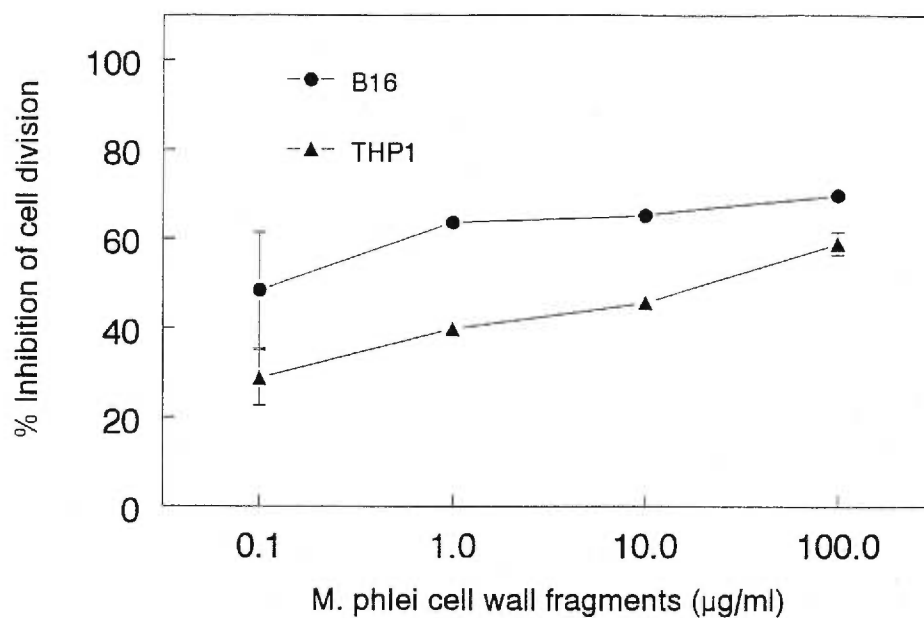
Yarkoni, E., Rapp, H.J. (1980) Influence of surfactant concentration on the antitumoral activity of emulsified components of mycobacteria. *Cancer Res.* 40: 975-8.

Yarkoni, E., Lederer, E., Rapp, H.J. (1981) Immunotherapy of experimental cancer with a mixture of synthetic muramyl dipeptide and trehalose dimycolate. *Infect. Immun.* 32: 273-6.

**Figure 1.** Effect of storage on *M. phlei* cell wall fragment particle size. The mean particule size of *M. phlei* cell wall fragments suspensions was determined after 22 weeks of storage at (A) 4°C, (B) 23°C, (C) 37°C and (D) 55°C by photon correlation spectroscopy. The results shown are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

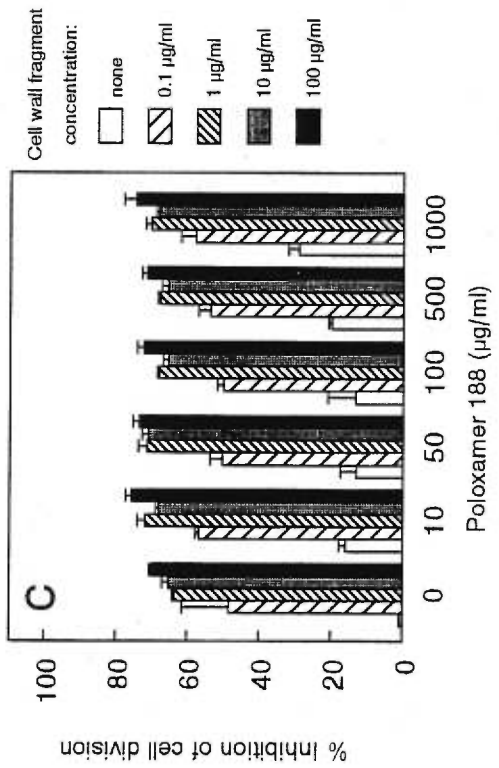
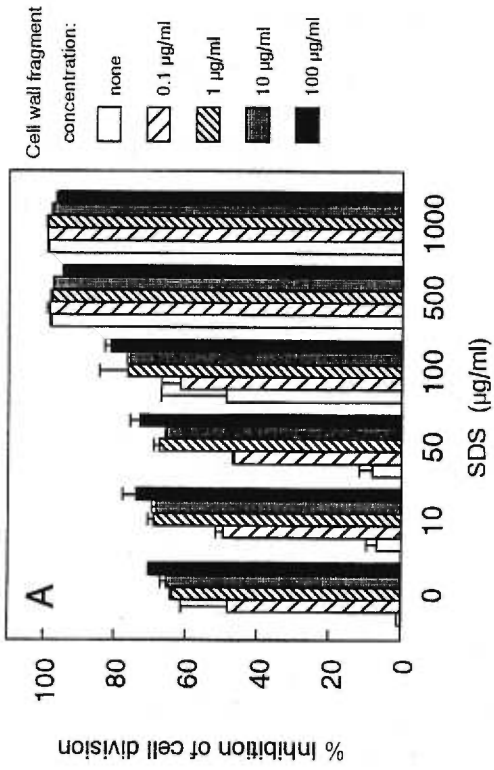
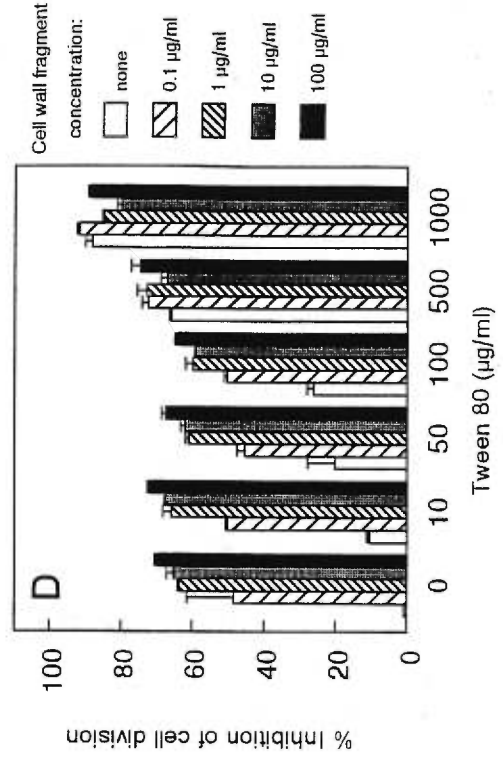
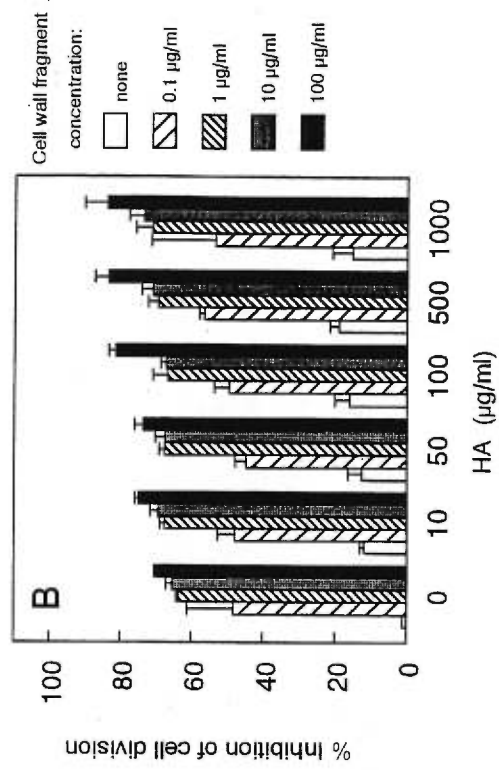




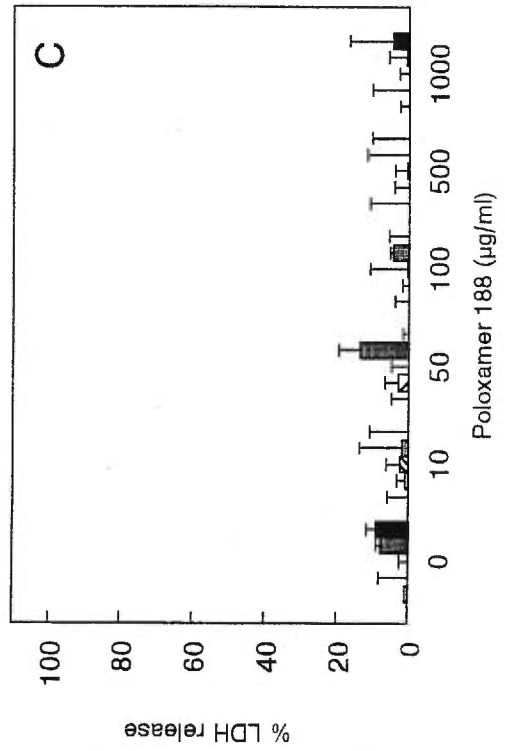
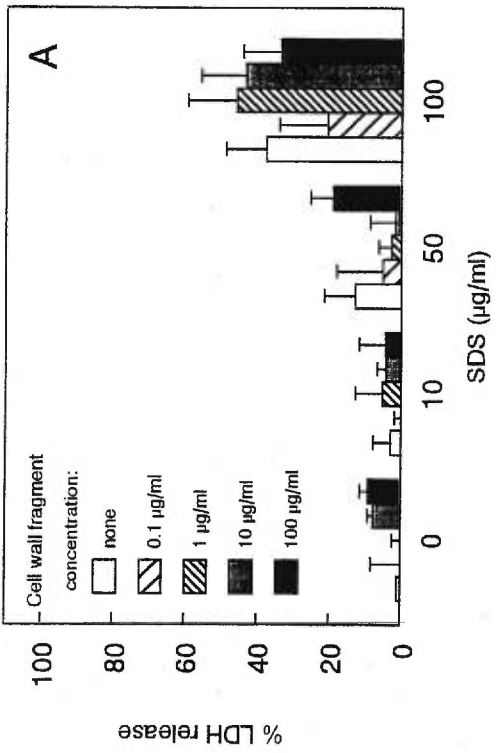
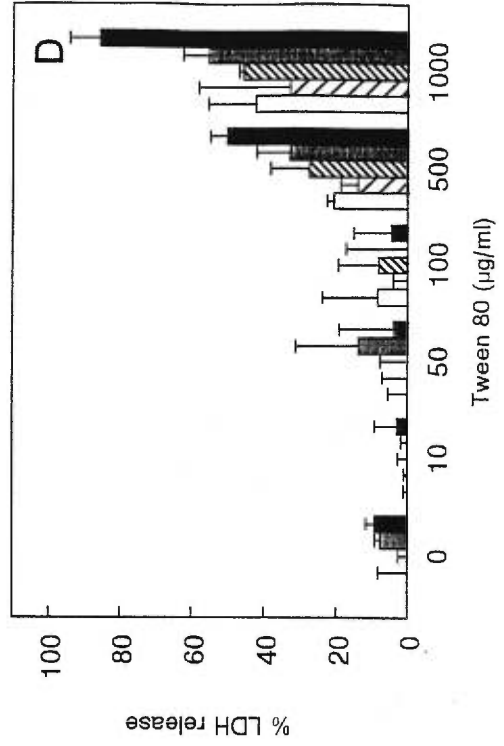
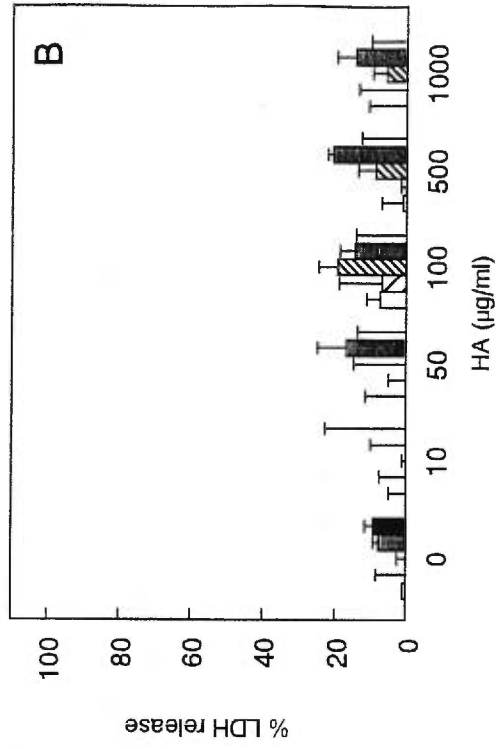


**Figure 2.** *M. phlei* cell wall fragments inhibit cell division of B16 melanoma cells and THP1 leukemia cells. B16 melanoma cells and THP1 leukemia cells were incubated with *M. phlei* cell wall fragments at the indicated concentrations. Cell division was determined by the reduction of MTT as described in the Materials and Methods. The results shown are the mean  $\pm$  SD of 3 replicate wells from one of three representative experiments.

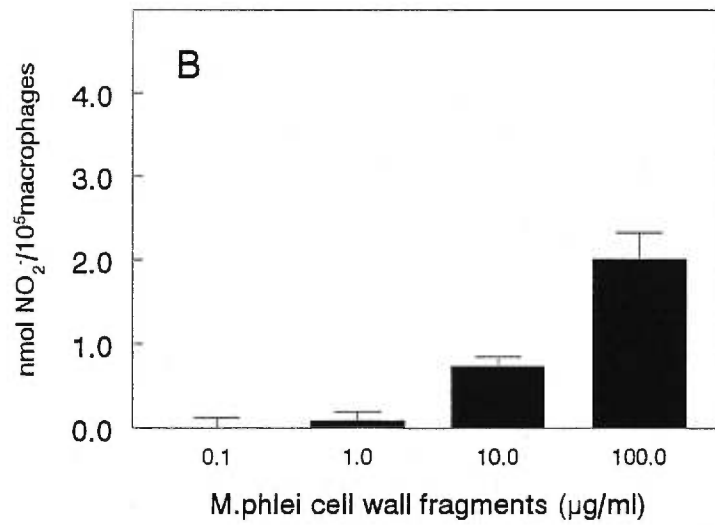
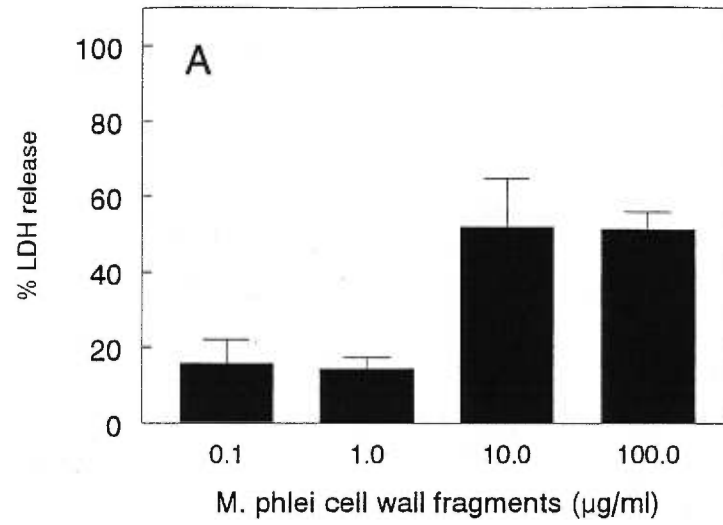
**Figure 3.** *M. phlei* cell wall fragments formulated with different surfactants inhibit cell division of B16 melanoma cells. The effect of the different surfactants alone or in combination with *M. phlei* cell wall fragments (0.1-100 µg/ml) on B16 melanoma cell division was determined. *M. phlei* cell wall fragments formulated with different concentration of (A) sodium lauryl sulfate, (B) sodium hyaluronate, (C) poloxamer 188 and (D) Tween 80. The results shown are the mean  $\pm$  SD of 3 replicate wells from one of three representative experiments.



**Figure 4.** Cytotoxicity of *M. phlei* cell wall fragments formulated with the different surfactants towards B16 melanoma cells. Cytotoxicity was determined by the release of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH). The results shown are calculated as a percentage of total LDH released by Triton X-100 treatment. The cytotoxic activity of the different surfactants alone or in combination with *M. phlei* cell wall fragments (0.1-100 µg/ml) was determined. *M. phlei* cell wall fragments formulated with different concentration of (A) sodium dodecyl sulfate, (B) sodium hyaluronate, (C) poloxamer 188 and (D) Tween 80. The results shown are the mean  $\pm$  SD of 3 replicate wells from one of three representative experiments.



**Figure 5.** (A) Cytotoxicity of *M. phlei* cell wall fragments formulated with the different surfactants towards murine macrophages. Cytotoxicity was determined by the release of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH). The results shown are calculated as a percentage of the total LDH released by treatment of control macrophages with Triton X-100. The results shown are the mean values  $\pm$  SD of 3 replicate wells from one of three representative experiments. (B) Induction of macrophage NO $\cdot$  synthesis by *M. phlei* cell wall fragments. NO $\cdot$  synthesis after *M. phlei* cell wall fragment treatment of macrophages was determined by measurement of the degradation product NO $_2^-$  in the medium. Mean values  $\pm$  SD of 3 replicate wells from one of three representative experiments.





## **CHAPITRE 4**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION**

## DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet de maîtrise avaient pour but de développer une formulation de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* vouée à un usage parentéral, que ce soit pour une administration intraveineuse, intramusculaire ou intratumorale. Les propriétés antitumorales des préparations de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* en font un traitement prometteur du cancer. Dispersés dans une émulsion d'huile minérale, ces fragments sont déjà utilisés en études cliniques pour le traitement de cancers vésicaux, offrant une alternative à l'utilisation du BCG. Étant donnée la toxicité systémique qu'elles possèdent, les formulations à base d'huile minérale sont normalement restreintes à une administration topique. Ainsi, il serait possible d'étendre l'utilisation des préparations de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* pour le traitement d'autres cancers par le développement d'une formulation aqueuse. Les fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* étant des complexes insolubles, nous avons fait une étude de formulation de suspensions de ces fragments stabilisées par l'utilisation de surfactifs.

La stabilité de suspensions parentérales est principalement reliée au maintien d'une de ses propriétés physiques inhérentes les plus importantes, la distribution de la taille des particules de la phase dispersée. L'application sécuritaire de telles suspensions est directement dépendante de la taille des particules de la phase solide, les particules de diamètre supérieur à 5  $\mu\text{m}$  administrées par voie intraveineuse pouvant conduire à une embolie *in vivo* (Takifuji et Tanimura, 1998). Les suspensions de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* (1 mg/ml) ne contenant pas d'additifs ne sont pas stables

lors d'un entreposage de 5 mois, une agrégation rapide des particules en suspension étant observée suite à l'incubation des suspensions à 37 et 55 °C. Contre toute attente, l'agrégation survenant à 37 °C est plus importante que celle se produisant à 55 °C. Bien que difficile à expliquer, ces résultats peuvent être dus à une diminution de la capacité de l'ADN à former des liaisons électrostatiques avec le peptidoglycane de la paroi mycobactérienne, chargé positivement. En effet, le clivage des liens phosphodiester de l'ADN mycobactérien est plus important à 55 °C qu'à 37 °C, tel que nous l'avons démontré par électrophorèse sur gel d'agarose, ce qui pourrait causer une dégradation de la structure des fragments pouvant contrebalancer leur agrégation.

Même si le diamètre moyen des fragments suspendus demeure sous 2 µm durant l'entreposage aux diverses températures, l'ajout de surfactifs aux suspensions peut leur procurer une plus grande stabilité. Seul un nombre restreint de surfactifs est accepté pour une administration parentérale, limitant nos choix à l'utilisation du poloxamer 188, du Tween 80, du HA, et du désoxycholate de sodium. Quoique l'ajout de ce dernier aux suspensions ne prévient pas l'agrégation des fragments, l'ajout de 5 mg/ml de poloxamer 188 ou de 10 mg/ml de tween 80 procure une suspension stable. Les formulations contenant 1 mg/ml de HA sont stables à 4, 23 et 37 °C, mais une agrégation des particules survient à 55 °C, le HA étant dégradé à cette température (Lowry et Beavers, 1994). Bien que l'utilisation du SDS soit normalement restreinte aux préparations topiques, nous l'avons inclus dans nos études considérant une formulation commerciale d'Interleukines-2 pour administration parentérale (Proleukin©; Chiron Therapeutics) contenant 0,15 mg/ml de SDS. À cette concentration, le SDS procure une formulation

stable, mais la déviation standard de la moyenne des échantillons auxquels on ajoute 1 mg/ml de SDS est plus faible.

La production de préparations pharmaceutiques dans des conditions stériles, bien que possible, est souvent chère et complexe. La stérilisation par chaleur humide des produits finaux est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Comme la taille des particules en suspensions se doit de demeurer inchangée durant ce procédé, nous avons aussi évalué la capacité des surfactifs à prévenir l'agrégation des fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* durant l'autoclavage. Que ce soit en absence ou en présence de surfactifs dans les suspensions, le passage à l'autoclave conduit à une forte agrégation des particules. Seul le SDS peut prévenir cette agrégation et ce, à toutes les concentrations étudiées. Ainsi, à moins qu'une formulation contenant du SDS ne soit retenue, l'autoclavage ne peut être utilisé comme moyen de stérilisation des suspensions finales.

Afin de caractériser les interactions possibles entre les fragment de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* et les surfactifs, nous avons mesuré le potentiel  $\zeta$  de différentes formulations. La capacité de polymères amphiphiles, tels que certains dérivés du PEG, à agir comme une barrière hydrophile a été rapportée dans plusieurs études (Klibanov et coll., 1990; Tröster et coll., 1992). La stabilisation stérique de particules chargée peut être démontrée par la modification du potentiel  $\zeta$  des particules, les polymères ancrés à leur surface masquant leur charge (Heydari et Phillips, 1996). L'ADN contenu dans les fragments de la paroi mycobactérienne est en grande partie responsable de sa charge négative, cette hypothèse étant appuyée par le fait que leur passage à l'autoclave diminue sa charge de façon significative, l'ADN étant partiellement dégradé

au cours de ce procédé (données non démontrées). Les fragments de la paroi mycobactérienne contiennent des lipides et des phospholipides pouvant permettre l'ancrage de la partie hydrophobe de certains surfactifs. Ainsi, une diminution du potentiel  $\zeta$  absolu était attendue avec l'ajout de surfactifs amphiphiles neutres comme le poloxamer 188 et le Tween 80. Or, aucun changement du potentiel  $\zeta$  des fragments n'est observé, indiquant qu'il n'y a pas d'interactions physiques proprement dites entre les surfactifs et les fragments. Seul le passage à l'autoclave des suspensions contenant de fortes concentrations de poloxamer 188 et le Tween 80 tend à réduire légèrement le potentiel  $\zeta$  des particules, l'énergie thermique ainsi acquise pouvant permettre un réarrangement des chaînes de polymères, ce qui favoriserait leur ancrage à la surface des particules. À l'exception du cas où l'ajout de DDAB, introduit ici comme contrôle positif, provoque la neutralisation de charges attendue, les surfactifs pouvant prévenir l'agrégation des fragments semblent agir en modifiant les propriétés de solvant, telles que la viscosité et/ou la densité plutôt qu'en modifiant les propriétés de surface des fragments de la paroi mycobactérienne.

Le deuxième volet de cette étude de formulation consistait à déterminer l'activité antitumorale des fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei*, ainsi qu'à étudier de l'effet des surfactifs sur cette activité. En effet, il a été démontré que les préparations de ces fragments peuvent avoir un effet direct sur la prolifération de cellules cancéreuses (Filion et coll., 1999). Nous avons étudié la capacité des surfactifs seuls et des formulations de fragments à inhiber la prolifération de 2 lignées de cellules cancéreuses, les mélanomes de souris B16 et les monocytes leucémiques humains THP1. Nous avons montré que le poloxamer 188 ne possède pas d'activité intrinsèque et ne modifie pas

l'activité des fragments sur les B16 et sur les THP1. Le HA est aussi sans activité sur les cellules B16, alors qu'il inhibe jusqu'à 30% de la prolifération des THP1 à partir de 500 µg/ml. Or récemment, Zeng et coll. (1998) ont rapporté que des oligomères d'hyaluronanes sont capables d'inhiber, *in vitro*, la croissance cellulaire des cellules B16F10 de 50-90% à des concentrations excédant 320 µg/ml, en plus d'inhiber la croissance des tumeurs *in vivo*. Ces cellules possèdent des récepteurs CD44 à leur surface qui peuvent interagir avec l'hyaluronane naturel déposé dans les matrices péricellulaires et extracellulaires de plusieurs tissus et il semble que cette interaction peut augmenter les croissances tumorale et métastatique. Les cellules B16F10 étant plus métastatiques que les cellules B16F1 que nous avons utilisés lors de nos études (Hill et coll., 1984), il est possible qu'elles expriment plus fortement les récepteurs CD44, ce qui pourrait expliquer nos résultats. En ce qui a trait aux cellules THP1, aucune étude ne rapporte la présence ou l'absence de ces récepteurs à leur surface. Il nous est donc impossible de spéculer quant à l'éventuelle implication des récepteurs CD44 dans cette baisse de prolifération cellulaire induite par le HA. Pour ce qui est de l'activité des autres surfactifs, le SDS et le Tween 80 inhibent de façon significative la prolifération cellulaire des B16 et des THP1 à partir de 100 µg/ml et augmentent l'activité des fragments à hautes concentrations. La toxicité de ces surfactifs est responsable de cette inhibition de la prolifération cellulaire, telle que nous l'avons montré par le dosage de la lactate déhydrogénase libérée dans le milieu de culture. Il a été démontré précédemment que les fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* ne sont pas cytotoxiques pour les cellules cancéreuses de la vessie (Filion et coll., 1999). Il en est de même pour les cellules B16 et THP1, mais la présence de SDS et Tween 80 à concentration élevée rendent ces

préparations toxiques. Peu d'études de toxicité de surfactifs *in vitro* ont été effectuées précédemment. L'effet d'un certain nombre de surfactifs (non-ioniques, ioniques et dérivés de sels biliaires) sur les mélanomes de souris B16 a cependant été examiné par Partearroyo et coll. (1990). Du nombre de surfactifs que nous avons étudié, seul l'effet du SDS y est rapporté. La perte de viabilité cellulaire ainsi que la lyse furent étudiées suite à un traitement de 2 et 30 min, mais des résultats similaires aux nôtres furent obtenus. Les détergents ioniques, représentés dans notre étude par le SDS, produisent une diminution de 50% de la viabilité cellulaire à une concentration inférieure à leur concentration micellaire critique (CMC). La valeur de CMC du SDS est d'environ 2400 µg/ml (Wade and Weller, 1994) et nous observons une inhibition de 50% de la croissance cellulaire suite au traitement des cellules avec 100 µg/ml de SDS (avec le dosage du MTT). Des résultats comparables ont aussi été rapporté par Grant et coll. (1992) sur des cellules épithéliales de cornées de lapins, où le SDS possède un EC<sub>50</sub> de 50 µg/ml après 1h de traitement. L'effet de surfactifs *in vitro*, plus particulièrement du Tween 80, sur la modulation de la cytotoxicité de certains agents antitumoraux a été largement étudié (Bar-Shira-Maymon et coll., 1980; Parris et coll., 1987; Tsujino et coll., 1999). Dans de tels cas, le Tween 80 agit en déstabilisant la membrane cellulaire ce qui augmente sa perméabilité aux médicaments. Aussi, l'influence du Tween 80 sur l'activité antitumorale de composantes mycobactériennes émulsionnées et administrées par voie intralésionale a été étudiée chez la souris (Yarkoni et Rapp, 1980). Il y est rapporté que l'activité de telles préparations est dépendante de la concentration de Tween 80 dans les émulsions. Nos résultats nous indiquent que l'activité des préparations de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* n'est augmentée qu'en présence d'une concentration

cytotoxique de surfactifs, mais qu'un surfactif ne possédant pas de toxicité intrinsèque n'influence pas l'activité des fragments.

Pour compléter les études de toxicité, nous avons aussi évalué la cytotoxicité des préparations de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* et de ses formulations sur les macrophages de souris. Les fragments ne sont pas toxiques pour les macrophages à faibles doses, mais deviennent très toxiques lorsque les cellules sont traitées avec 10 et 100 µg/ml, avec une libération de 50% de LDH. Cette toxicité est directement reliée à la synthèse d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages induite par les fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei*. Les surfactifs ont une toxicité sur les macrophages similaire à celle observée sur les cellules B16 et THP1. D'après nos résultats obtenus sur les 3 lignées de cellules, il est clair que la concentration de surfactifs produisant un effet donné est dépendante de la structure de l'agent tensioactif plutôt que du type de cellules traité. Nos résultats corroborent l'observation de Tobler et coll. (1980) qui ont effectué une étude systématique de l'effet de détergents sur 11 lignées de cellules différentes.



## CONCLUSION

Dans le cadre de ce travail nous démontrons pour la première fois le potentiel de certains surfactifs à procurer une formulation stable de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei*, dans l'optique d'une administration parentérale pour le traitement systémique du cancer. La caractérisation physique des suspensions aqueuses de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* ainsi que l'établissement de l'influence des surfactifs sur l'activité de ceux-ci nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

1. Les propriétés de surface des fragments de la paroi ne sont pas modifiées de façon significative par la présence de SDS, de HA, de Poloxamer 188 ou de Tween 80.
2. Ces surfactifs, à des concentrations spécifiques, peuvent procurer un effet stabilisant contre l'agrégation des fragments en suspension. Les formulations de fragments contenant 0,15 ou 1 mg/ml de SDS, 5 mg/ml de Poloxamer 188 ou 10 mg/ml Tween 80 sont stables pour 5 mois lors de leur entreposage à 4, 23, 37 et 55 °C, alors que les suspensions contenant 1 mg/ml de HA sont stables à toutes les températures exceptée à 55 °C.
3. Certains de ces surfactifs ont une influence importante sur l'activité des fragments *in vitro*. Bien que le HA et le Poloxamer 188 n'ont pas d'effets marqués sur l'inhibition de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses B16 et THP1 induite par les fragments, la présence de concentrations élevées de SDS ou de Tween 80 augmente significativement l'activité des fragments. Cet effet est toutefois dû à une toxicité directe

de ces surfactifs, alors que les fragments ne présentent pas de cytotoxicité pour ces cellules.

4. Par la mise en parallèle des résultats obtenus lors des études de stabilité avec ceux des études d'activité, nous concluons que l'utilisation en suspension de 0,15 mg/ml de SDS, de 1 mg/ml de HA ou de 5 mg/ml de Poloxamer 188 serait appropriée pour la formulation de fragments de la paroi mycobactérienne de *M. phlei* pour une administration parentérale.

## BIBLIOGRAPHIE

Adam A, Ciorbaru R, Ellouz F, Petit JF et Lederer E (1974) Adjuvant activity of monomeric bacterial cell wall peptidoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* **56**: 561-7.

Adams JL et Czuprynsky CJ (1995) Ex vivo induction of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA in bovine whole blood by *Mycobacterium paratuberculosis* and mycobacterial cell wall components. *Microb Pathog* **19**: 19-29.

Ambler L et Hudson AM (1984) Pharmacokinetics and metabolism of muramyl dipeptide ( $[^3\text{H}]$  labelled) in the mouse. *Int J Immunopharmacol* **6**: 133-9.

Asselineau C, Montrozier H et Promé JC (1969) Présence d'acides polyinsaturés dans une bactérie: isolement, à partir des lipides de *M phlei*, d'acide hexatriacontapentaène-4,8,12,16,20-oïque et d'acides analogues. *Eur J Biochem* **10**: 580-584.

Asselineau C, Montrozier H, Promé JC, Savagnac A et Welby M (1972) Étude d'un glycolipide polyinsaturé synthétisé par *Mycobacterium phlei*. *Eur J Biochem* **28**: 102-109.

Azuma I (1992) Inducer of cytokines in vivo: overview of field and romurtide experience. *Int J Immunopharmacol* **14**: 487-496.

Azuma I, Thomas DW, Adam A, Ghuysen JM, Bonaly R, Petit JF et Lederer E (1970) Occurrence of N-glycolylmuramic acid in bacterial cell walls. A preliminary survey.

*Biochim Biophys Acta*, **208**: 444-51.

Bar-Shira-Maymon B; Michowitz M; Gibli O; Klein O; Pinchasov A et Leibovici J

(1992) Effect of a membrane-active agent on uptake of adriamycin in Lewis lung carcinoma cells derived from 'primary' and 'metastatic' growths. *Chemotherapy* **38**: 66-73.

Beuter B (1990) The complex regulation and biology of TNF (cachectin). *Crit Rev Oncog* **2**: 9-18.

Birds AP (1987) CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet* **3**: 342-246.

Boylan JC, Fites AL et Nail SL (1996) Parenteral Products, *Modern Pharmaceutics*, 3rd ed., Banker GS, Rhodes CT, eds., Marcel Decker inc., New York, pp. 441-487.

Brazeau GA et Fung HL (1989) Use of an in vitro model for the assessment of muscle damage from intramuscular injection: In vitro-in vivo correlation and predictability with mixed solvent systems, *Pharm Res* **6**: 776-771.

Broderson, JR (1989). A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab Anim Sci* **39**: 400-405.

Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin AJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF et Green DR (1995) Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-Ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* **373**: 441-444.

Chien YW (1981) Long-acting parenteral drugs formulations. *J Parenter Sci Technol* **35**: 106-139.

Chin JL, Kadhim SA, Batislam E, Kalik SJ, Garcia BM, Nickel CJ et Morales A (1996) Mycobacterium cell wall: an alternative to intravesical bacillus Calmette Guerin (BCG) therapy in orthotopic murine bladder cancer. *J Urol* **156**: 1189-1193.

Choon Yoo Y, Yoshimatsu K, Hatsuse R, Tamura M, Yoshida R, Tonooka S, Arikawa J et Azuma I (1995) Effect of MDP-Lys (L18), a derivative of MDP, on enhancing host resistance against Hantaan virus infection in newborn mice. *Vaccine* **13**: 1300-1305.

Christensen KJ, Gubbins PO, Gurley BJ, Bowman JL et Buice RG (1998) Relative bioavailability of itraconazole from an extemporaneously prepared suspension and from the marketed capsules. *Am J Health Syst Pharm* **55**: 261-5.

Claassen E, de Leeuw W, de Greeve P, Hendriksen C, et Boersma W (1992). Freund's complete adjuvant: An effective but disagreeable formula. *Research Immunol* **143**: 478-483.

Clark-Curtiss JE (1990) Genome structure of mycobacteria. Dans *Molecular biology of mycobacteria*. Ed Johnjoe McFadden, Surrey University Press, London. pp77-96.

Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326** ( Pt 1): 1-16.

Collin MKL et Lopez-Rivas A (1993) The control of apoptosis in mammalian cells. *Trends in Biochem Sci* **18**: 307-309.

Creaven PJ, Cowens JW, Brenner DE, Dadey BM, Han T, Huben R, Karakousis C, Frost H, LeSher D, Hanagan J et coll. (1990) Initial clinical trial of the macrophage activator muramyl tripeptide-phosphatidylethanolamine encapsulated in liposomes in patients with advanced cancer *J Biol Response Mod* **9**: 492-8.

Crispens CG Jr et Sorenson JR (1988) Treatment of reticulum cell sarcoma in SJL/J mice with Tween 80. *Anticancer Res* **8**: 1341-3

Daemen T, Dontje BH, Veninga A, Scherphof GL et Oosterhuis WL (1990) Therapy of murine liver metastases by administration of MDP encapsulated in liposomes. *Sel Cancer Ther* **6**: 63-71.

Daniel JC (1988) Les latex synthétiques, *Pour la Science*, **125**: 54-63.

Delgado A, Parera GA et Gonzalez-caballero F (1990) A study of electrokinetic and stability properties of nitrofurantoin suspensions. II: Flocculation and redispersion properties as compared with theoretical interaction energy curves. *J Pharm Sci* **79**: 709-715.

Ellouz F, Adam A, Ciorbaru R et Ledeler E (1974) Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* **59**: 1317-1325.

Ernst AA, Marvez-Valls E, Nick TG, Mills T, Minvielle L et Houry D (1997) Topical lidocaine adrenaline tetracaine (LAT gel) versus injectable buffered lidocaine for local anesthesia in laceration repair. *Western Journal of Medicine*. **167**: 79-81.

Escabi RS et DeKay HG (1956) New developments in calamine lotion. *J Am Pharm Assoc, Pract Ed* **17**: 30-33, 47-49.

- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL et Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148: 2207-16.
- Fichera GA et Giese G (1994) Non-immunologically-mediated cytotoxicity of *Lactobacillus casei* and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. *Cancer Lett* 85: 93-103.
- Filion MC, L'épiciier P et Phillips NC (1997) *Mycobacterium phlei* cell wall complex, a new antitumoral agent, induces IL-12 synthesis by monocytes/macrophages. *Blood* 90:58b.
- Filion MC, L'épiciier P, Morales A et Phillips NC (1999) *Mycobacterium phlei* cell wall complex directly induces apoptosis in human bladder cancer cell. *Brit J Cancer* 79: 229-35.
- Florence AT (1977) Biological implications of micelle formation. Dans *Micellisation, Solubilisation and Micro-emulsion, Vol 1* (K. L. Mittal, ed.) Plenum Press, New York. pp 55-74.
- Freund J (1956) The mode of action of immunologic adjuvants. *Adj Tuberc Res* 7: 130-148.



Frost H, Murray JL, Chaudri HA et Van Damme J (1990) Interleukin-6 induction by a muramyltripeptide derivative in cancer patients. *J Biol Response Mod* **9**: 160-6.

Gable FB, Kostenbauder HB et Martin AN (1953) The calamine lotion problem. *J Am Pham Assoc, Pract Ed* **14**: 287-289.

Garrec YL (1986) Immunomodifiers of bacterial origin. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* **9**: 137-141.

Gerardin A, Dubois JP, Moppert J et Geller L (1990) Absolute bioavailability of carbamazepine after oral administration of a 2% syrup. *Epilepsia* **31**: 334-8.

Ghuysen J-M (1968) Use of bacteriolytic enzymes in the determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriological Reviews* **32**: 425-64.

Goldstein SW (1952) New formulas for calamine lotion. *J Am Pham Assoc, Pract Ed* **13**: 250-251, 278-280.

Grant RL, Yao C, Gabaldon D et Acosta D (1992) Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. *Toxicology* **76**: 153-76.

Gray GR; Ribi E; Granger D; Parker R; Azuma I et Yamamoto K (1975) Immunotherapy of cancer: tumor suppression and regression by cell walls of *Mycobacterium phlei* attached to oil droplets. *J Natl Cancer Inst* **55**: 727-30.

Griffin WC (1949) Classification of surface-active agents by "HLB". *J Soc Cosmet Chem* **1**: 311-326.

Griffin WC (1954) Calculation of HLB values of nonionic surfactants. *J Soc Cosmet Chem* **5**: 249-256.

Guillemard E, Geniteau-Legendre M, Mabboux B, Poilane I, Kergot R, Lemaire G, Petit JF, Labarre C et Quero AM (1993) Antiviral action of trehalose dimycolate against EMC virus: role of macrophages and interferon alpha/beta. *Antiviral Res* **22**: 201-13

Hadden, JW (1994) T-cell adjuvants. *Int J Immunopharmacol* **16**: 703-710.

Haines BA et Martin AN (1961) Interfacial properties of powdered material; Caking in liquid dispersions I. Caking and flocculation studies. *J Pharm Sci* **50**: 228-132.

Halpern MD, urlander RJ et Pisetsky DS (1996) Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol* **167**: 72-8.

Heiati H, Tawashi R et Phillips NC (1998) Solid lipid nanoparticles as drug carriers II. Plasma stability and biodistribution of solid lipid nanoparticles containing the lipophilic prodrug 3'-azido-3'-deoxythymidine palmitate in mice. *Int J Pharm* **174**: 71-80.

Hengartner MO et Horvitz HR (1994) The ins and out of programmed cell death during *C. elegans* development. *Phil Trans R Soc Lond B* **345**: 243-8.

Hergersberg M (1991) Biological aspects of cytosine methylation in eukaryotic cells. *Experientia* **47**: 1171-1185.

Heydari C et Phillips NC (1996) Modulation of cationic liposomal DNA zeta potential and liposome-protein interaction by amphiphilic poly(ethylene glycol). *Pharm Sci* **2**: 73-6.

Hill RP, Chambers AF, Ling V et Harris JF (1984) Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells. *Science* **224**: 998-1001

Hui GSN (1994) Liposomes, muramyl dipeptides derivatives, and nontoxic lipid A derivatives as adjuvants for human malaria vaccines. *Am J Exp Med Hyg* **50**: 41-51.

Israel-Biet D, Venet A, Sandron D, Ziza JM et Chretien J (1987) Pulmonary complications of intravesicular bacille Calmette-Guérin immunotherapy *Am Rev Respir Dis* **135**: 763-765.

Izquierdo MA, Degen D, Sypek JP et Von Hoff DD (1996) Antiproliferative effects of IL-12 on human colony-forming units taken directly from patients. *Anticancer Drugs* **7**: 275-280.

Justicz AG, Farnsworth WV, Soberman MS, Tuvlin MB, Bonner GD, Hunter RL, Martino-Saltzman D, Sink JD et Austin GE (1991) Reduction of myocardial infarct size by poloxamer 188 and mannitol in a canine model. *Am Heart J* **122**: 671-80.

Kadhim SA, Chin JL, Batislam E, Karlick S, Garcia BM, Nickel CJ et Morales A (1993) Modification of intravesical bacillus Calmette Guerin (BCG) therapy in orthotopic murine bladder tumor use of mycobacterium cell wall extract (MCWE). *J Urol* **149**: A225.

Keeney S et Linn S (1990) A critical review of permeabilised cell systems for studying mammalian DNA repair. *Mutant Res.* **236**: 239-252.

Keeney S, Reihm H, Biedler JL (1972) Potential of drug effect by Tween 80 in Chinese hamster cells resistant to actinomycin D and daunomycin. *Cancer Res.* **32**: 1195-1200.

Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Smith MA, Prerry G, Whitehouse PJ et Taniguchi T (1998) Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease. *Brain Res* **780**: 260-269.

Kleinman NR, Kier AB, Diaconu E et Lass JH (1993) Posterior paresis induced by Freund's adjuvant in guinea pigs. *Lab Anim Sci* **43**: 364-366.

Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP et Huang L (1990) Amphiphilic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* **268**: 235-237.

Koller C et Buri P (1987) Propriétés et intérêt pharmaceutiques des gels thermoréversibles à base de poloxamers et poloxamines. *S.T.P. Pharma*, **3**: 115-124.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST et van Oers MH (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**: 1415-20.

Krieg AM, Yi A-K, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA et Klinman DM (1995) CpG motifs presents in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**: 546-549.

Kushla GP, Zatz JL, Mills OH Jr et Berger RS (1993) Noninvasive assessment of anesthetic activity of topical lidocaine *J Pharm Sci* **82**: 1118-22.

Lawrence CA (1970) Germicidal properties of cationics surfactants. Dans: *Cationic surfactants*. E Jungermann, Ed., Marcel Dekker, New York, p. 491.

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirer GG et Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**: 346-347.

Lederer E, Adam A, Ciorbaru R, Petit JF et Wietzerbin J (1975) Cell walls of Mycobacteria and related organisms; chemistry and immunostimulant properties. *Mol Cell Biochem*, **7**: 87-104.

Lemaire G, Tenu JP, Petit JF et Lederer E (1986) Natural and synthetic trehalose diesters as immunomodulators. *Med Res Rev* **6**: 243-74.

Lepers A, Cacan R et Verbert A (1990) Permeabilized cells as a way of gaining access to intracellular organelles: An approach to glycosylation reactions. *Biochimie* **70**: 1-5.

Lepoivre M, Tenu JP, Lemaire G et Petit JF (1982) Antitumor activity and hydrogen peroxide release by macrophages elicited by trehalose diesters. *J Immunol* **129**: 860-6.

Liebes L, Walsh CM, Chachoua A, Oratz R, Richards D, Hochster H, Peace D, Marino D, Alba S, Le Sher D et coll. (1992) Modulation of monocyte functions by muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine in a phase II study in patients with metastatic melanoma. *J Natl Cancer Inst* **84**: 694-9.

Lin T, Brunner T, Tietz B, Madsen J, Bonfoco E, Reaves M, Huflet M et Green DR (1998) Fas ligand-mediated killing by intestinal intraepithelial lymphocytes. Participation in intestinal grft-versus-host disease. *J clin Invest* **101**: 570-574.

Lowry KM et Beavers EM (1994) Thermal stability of sodium hyaluronate in aqueous solution. *J Biomed Mater Res* **28**: 1239-44.

Majno G et Joris J (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**: 3-16.

Mallick BB, Kishore S, Das SK et Garg A (1985) Non-specific immunostimulation against viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **8**: 55-63.

Maroun JA, Quesada JR, Hersh EM, Gutterman JU, Richman S, Schwarz MA et Parker N (1979) Phase I toxicity study of methanol-extracted residue of *Bacillus Calmette-Guérin* by the iv route. *Cancer Treat Rep* **63**: 1781-6.

Martin A et Bustamante P (1993) Coarse dispersions. In: *Physical Pharmacy*, 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, p. 477.

Martin A, Swarbrick J et Cammarata (1983) *Physical pharmacy, physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*, 3rd Ed., Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 445-521.

Martin SJ et Cotter TG (1991) Ultraviolet B irradiation of human leukemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis *Int J Radiat Biol* **59**: 1001-1016.

Masihi KN, Brehmer W, Lange W, Ribí E et Schwartzman S (1984) Protective effect of muramyl dipeptide analogs in combination with trehalose dimycolate against aerogenic influenza virus and Mycobacterium tuberculosis infections in mice. *J Biol Response Mod* **3**: 663-71.

Matthews BA et Rhodes CT (1970) Aggregation mechanisms in pharmaceutical suspensions. *J Pharm Sci* **59**: 518-520.

McLaughlin CA, Parker R, Hadlow WJ, Toubiana R et Ribí E (1978) Moieties of mycobacterial mycolates required for inducing granulomatous reactions. *Cell Immunol* **38**: 14-24.



Meyer MC, Straughn AB, Ramachander G, Cavagnol JC et Biola Mabadeje AF (1978) Bioavailability of sulfadiazine solutions, suspensions, and tablets in humans. *J Pharm Sci* **67**: 1659-61.

Miller MJ, Lonardo EC, Greer RD, Bevan C, Edwards DA, Smith JH et Freeman JJ (1996) Variable responses of species and strains to white mineral oils and paraffin waxes. *Regul Toxicol Pharmacol* **23**: 55-68.

Miller T, Beausang LA, Meneghini M, Lidgard G (1993) Death-induced changes to the nuclear matrix: the use of anti-nuclear antibodies to study agents of apoptosis. *Biotechniques* **15**: 1042-1047.

Morales A (1980) Treatment of superficial bladder cell. *Can Med Assoc J* **122**: 1133-1138.

Morales A et Chin JL (1997) Mycobacterium cell wall (MCW) as an alternative to BCG in the treatment of carcinoma-in-situ (CIS) of bladder: an efficacy study. *J Urol* **157**: A214.

Nail SL, White JL et Hem SL (1976) Structure of aluminum hydroxide gel I: initial precipitate. *J Pharm Sci* **65**: 1188-91.

Nash RA (1996) Pharmaceutical suspensions. Dans: *Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems volume 2*. Lieberman HA, Rieger MM and Banker GS, eds., Macel Dekker Inc, New York.

Natsuhara Y, Oka S, Kaneda K, Kato Y et Yano I (1990) Parallel antitumor, granuloma-forming and tumor-necrosis-factor-priming activities of mycoloyl glycolipids from *Nocardia rubra* that differ in carbohydrate moiety: structure-activity relationships. *Cancer Immunol Immunother* **31**: 99-106.

Newell MK, Haughn LJ, Maroun CR et Julius MH (1990) Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* **347**: 286-288.

Nicholson DW et Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**: 299-306.

Nolibe D, Masse R, Tenu JP, Lepoivre M et Petit JF (1986) Activation of rat alveolar macrophages and protection against i.v. injected tumor cells by intratracheal administration of trehalose dimycolate. *Cancer Immunol Immunother* **23**: 200-6.

Obach R, Prunonosa J, Menargues A, Nomen M et Valles J (1988) Pharmacokinetics and bioavailability of methocarbamol in rats. *Biopharm Drug Dispos* **9**: 501-11.

Oppenheim JJ, Togawa A, Chedid L et Mizel S (1980) Components of mycobacteria and muramyl dipeptide with adjuvant activity induce lymphocyte activating factor. *Cell Immunol* **50**: 71-81.

Orbach-Arbouys S, Tenu JP et Petit JF (1983) Enhancement of in vitro and in vivo antitumor activity by cord factor (6-6'-dimycolate of trehalose) administered suspended in saline. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **71**: 67-73.

Orihuela E, Herr HW, Pinsky AU et Withmore WF (1987) Toxicity of intravesicular BCG and its management in patient with superficial bladder tumors. *Cancer* **60**: 326-333.

Oswald IP, Dozois CM, Petit JF et Lemaire G (1977) Interleukin-12 synthesis is a required step in trehalose dimycolate-induced activation of mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* **65**: 1364-9.

Overbeek JTG (1977) Recent developments in understanding of colloids stability. *J Colloid Int Sci* **58**: 408-422.

Papapetropoulou M, Tsintzou A et Vantarakis A (1997) Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. *Can J Microbiol* **43**: 499-502.

Parant M, Parant F, Chedid L, Drapier JC, Petit JF, Wietzerbin J et Lederer E (1977)

Enhancement of nonspecific immunity to bacterial infection by cord factor (6,6'-trehalose dimycolate). *J Infect Dis* **135**: 771-7.

Parant MA, Pouillart P, LE Contel C, Parant FJ, Chedid LA et Bahr GM (1995)

Selective modulation of liposaccharide-induced death and cytokine production by various muramyl peptides. *Infect Immun* **63**: 110-115.

Parris CN, Masters JR, Walker MC, Newman B, Riddle P et English P (1987)

Intravesical chemotherapy: combination with Tween 80 increases cytotoxicity in vitro. *Urol Res* **15**: 17-20.

Parrot EL (1971) Fluid pharmaceutical suspensions and emulsions. In: *Pharmaceutical Technology*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, p. 346.

Partearroyo MA, Ostolaza H, Goni FM et Barbera-Guillem E (1990) Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. A study using B16 melanoma cells. *Biochem Pharmacol* **40**: 1323-8.

Petit JF (1978) Structure chimique de la paroi des mycobactéries. *Ann Microbiol (Inst Pasteur)* **129 A**: 39-48.

Pisetsky DS et Reich C (1993) Stimulation of *in vitro* proliferation of murine lymphocytes by synthetic oligodeoxynucleotides. *Mol Biol Rep* **18**: 217-221.

Reed KW et Yalkowsky SH (1986) Lysis of red blood cells in the presence of various cosolvents. Part 3. Effect of differing NaCl concentrations, *J Parenter Sci Technol* **40**: 88-94.

Richman SP, Hersh EM, Gutterman JU, Hortobagyi GN, Blumenschein GR, Rios A et Ribi E (1981) Administration of BCG cell wall skeleton into malignant effusions: toxic and therapeutic effects. *Cancer Treat Rep* **65**: 383-7.

Rieger MM (1996) Surfactants. Dans: *Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems volume 1*. Lieberman HA, Rieger MM and Banker GS, eds., Macel Dekker Inc, New York.

Roesner M et Grant JP (1987) Intravenous lipid emulsions. *Nutr Clin Pract* **2**: 96-107.

Rollins CE, Reiber G, Guinee DG Jr et Lie JT (1997) Disseminated lipogranulomas and sudden death from self-administered mineral oil injection. *Am J Forensic Med Pathol* **18**: 100-3.

Sansom LN, O'Reilly WJ, Wiseman CW, Stern LM et Derham J (1975) Plasma phenytoin levels produced by various phenytoin preparations. *Med J Aust* **2**: 593-5.

Sava G, Giraldi T, Tomasic J et Hrsak I (1983) Immunotherapy of Lewis lung carcinoma with hydrosoluble peptidoglycan monomer (PGM). *Cancer Immunol Immunother* **15**: 84-6.

Schaer GL, Hursey TL, Abrahams SL, Buddemeier K, Ennis B, Rodriguez ER, Hubbell JP, Moy J et Parrillo JE (1994) Reduction in reperfusion-induced myocardial necrosis in dogs by RheothRx injection (poloxamer 188 N.F.), a hemorheological agent that alters neutrophil function. *Circulation* **90**: 2964-75.

Schwartzman RA et Cidlowski JA (1994) Glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells. *Int Arch Allergy Immunol* **105**: 347-54.

Sekine K, Toida T, Saito M, Kuboyama M, Kawashima T et Hashimoto Y (1985) A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res* **45**: 1300-7.

Shimada S, Yano O, Inoue H, Kuramoto E, Fukuda T, Yamamoto H, Kataoka T et Tokunaga T (1985) Antitumor activity of the DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors. *J Natl Cancer Inst* **74**: 681-8.

Sone S et Fidler IJ (1981) In vitro activation of tumoricidal properties in rat alveolar macrophages by synthetic muramyl dipeptide encapsulated in liposomes. *Cell Immunol* **57**: 42-50.

Sonntag H et Strenge K (1972) Coagulation and stability of dispersions systems. Halsted, New York, pp 13-43.

Stebly RW (1963) Glomerulonephritis induced in monkeys by injection of heterologous glomerular basement membrane and Freund's adjuvant. *Nature (Lond)* **197**: 1173-1176.

Steiner JW, Langer B and Schatz DL (1960) The local and systemic effects of Freund's adjuvant and its fractions. *Arch Path* **70**: 424-434.

Stern AS, Magram J, Presky DH (1996) Interleukin-12 an integral cytokine in the immune response. *Life Science* **58**: 639-654.

Stills HF et Bailey MQ (1991) The use of Freund's complete adjuvant. *Lab Animal* **20**: 25-30.

Stills, HF (1994) Polyclonal antibody production. Dans: *The Biology of the Laboratory Rabbit* P.J. Manning, D.H. Ringler and C.E. Newcomber, eds., Academic Press, Inc., New York, pp. 435-448.

Stine KC, Warren BA, Becton DL (1996) Apoptosis induced by interleukin-12 measured by DNA electrophoresis and *in situ* end labelling in leukemia. *Ann NY Acad Sci* **795**: 420-421.

Tabibi ES et Rhodes CT (1996) Disperse systems. In: *Modern pharmaceuticals*. Banker GS and Rhodes CT eds., Macel Dekker Inc, New York, p. 299.

Takifuji K et Tanimura H (1998) [Adverse effects of intravenous fat emulsion administration.] *Nippon Geka Gakkai Zasshi* **99**: 171-5.

Tal C et Laufer A (1960) Amyloidosis in mice following injections with Freund's adjuvant or it's components, given separately or in homologous liver-adjuvant mixture. *Brit J exp Path* **41**: 605-609.

Tewari AK, Sharma NN, Rao JR, Mishra AK et Das SK (1996) Effect of *Mycobacterium phlei* on the development of immunity to *Babesia bigemina*. *Vet Parasitol* **62**: 223-230.

Thomson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-1462.

Tobler J, Watts MT and Fu JL (1980) An *in vitro* and *in vivo* investigation of three surface-active agents as modulator of cell proliferation. *Cancer Res* **40**: 1173-1180.



Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T et coll. (1984) Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* **72**: 955-62.

Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, Kimura Y, Yamamoto T, Kataoka T et Yamamoto S (1992) Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol Immunol* **36**: 55-66.

Tröster SD, Wallis KH, Müller RH et Kreuter J (1992) Correlation of surface hydrophobicity of <sup>14</sup>C-poly(methyl methacrylate) nanoparticles to the body distribution. *J Control Release* **20**: 247-253.

Tsujino I; Yamazaki T; Masutani M; Sawada U et Horie T (1999) Effect of Tween-80 on cell killing by etoposide in human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **43**: 29-34.

Vanderlaan RK, White JL et Hem SL (1982) Formation of hydrotalcite in mixtures of aluminum hydroxycarbonate and magnesium hydroxide gels. *J Pharm Sci* **71**: 780-6.

Verwey EJW et Overbeek JTG (1948) Theory of the stability of lyophobic colloids, part III. Elsevier, Amsterdam.

Vosika GJ et Gray GR (1983) Phase I study of iv mycobacterial cell wall skeleton and cell wall skeleton combined with trehalose dimycolate. *Cancer Treat Rep* **67**: 785-90.

Wang L, Klimpel GR, Planas JM, Li H et Cloyd MW (1998) Apoptotic killing of CD4+ T lymphocytes in HIV-1-infected PHA-stimulated PBL cultures is mediated by CD8+ LAK cells. *Virology* **241**: 169-180.

Wietzerbin-Falszpan J, Das BC, Azuma I, Adam A, Petit JF et Lederer E (1970) Isolation and mass spectrometric identification of the peptide subunits of mycobacterial cell walls. *Biochem Biophys Res Commun*, **40**: 57-63.

Withmore RL (1955) The sedimentation of suspension of spheres. *Brit. J. Appl. Phys.* **6**: 239-245.

Wyllie AH (1997) Apoptosis: an overview. *British Med Bull* **53**: 451-465.