

Université de Montréal

**Modification des liposomes cationiques en utilisant des dérivés
de poly(éthylène glycol)**

par
Mireille Saoud

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)

Novembre 1998

© Mireille Saoud, 1998



QV
705
U58
1999
V.006

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé:

Modification des liposomes cationiques en utilisant des dérivés
de poly(éthylène glycol)

Présenté par:

Mireille Saoud

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Nigel Phillips
Dr. Louis Cartilier
Dr. Jean-Norbert McMullen

Mémoire accepté le: 99.04.26

SOMMAIRE

Les liposomes ayant des lipides cationiques (liposomes cationiques) sont évalués dans plusieurs domaines thérapeutiques pour la libération intracellulaire des oligonucléotides antisenses et des plasmides ayant différents gènes humains. La majorité de ces liposomes sont composés de dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE) pour assurer la déstabilisation de l'endosome suite à l'endocytose, et d'un lipide cationique pour assurer l'interaction avec les molécules d'ADN négativement chargés. Bien que les liposomes cationiques ont été administrés via les voies orale, pulmonaire et systémique, leur problème de stabilité dans différents milieux biologiques n'était pas complètement résolu. Il était déjà démontré que les liposomes cationiques ayant des ADN plamidiques sont déstabilisés par les protéines anioniques se trouvant dans le plasma.

Les liposomes ayant une couche de poly(éthylène glycol) (PEG) à la surface ont largement contribué au développement des liposomes à longue circulation à cause de l'interaction réduite avec les protéines plasmatiques et les membranes cellulaires.

Les liposome-PEG sont normalement préparés en faisant dissoudre le lipide-PEG avec les autres lipides et les phospholipides dans la phase organique avant l'hydratation et l'association des lipides en liposomes. Cette méthode conventionnelle d'incorporation de PEG possède plusieurs

inconvenients. D'une part, les chaînes polymériques sont incorporées dans l'espace interne aqueux et entre les bicouches lipidiques où l'eau est normalement enfermée. Ceci réduit significativement le volume aqueux interne et nuit à l'incorporation des médicaments dans les liposomes. D'autre part, les molécules d'ADN sont reconnues pour se lier aux lipides cationiques dans les liposomes par des forces électrostatiques en formant des complexes ADN/liposome assez stables.

Dans cette étude, nous présentons deux méthodes de modification des liposomes pré-formés, l'une est une réaction chimique ayant lieu dans le milieu aqueux et l'autre est une insertion des dérivés pégylés connus pour être non-toxiques et économiques. Ces nouvelles procédures de post-modification liposomique s'effectuent dans des conditions douces et dans des temps très courts.

L'efficacité de ces nouvelles méthodes a été prouvée par les mesures du changement de diamètre et de la charge apparente à la surface des liposomes. Les liposomes classiques DOPE/DOTAP (1:1) ont un potentiel zéta (ζ) moyen de +33 mV et l'incorporation par la méthode conventionnelle de 1 et 0.5 mol% de PE-PEG₂₀₀₀ (Phosphatidyléthanolamine-PEG₂₀₀₀) et PE-PEG₅₀₀₀ réduit complètement la charge des liposomes. Une concentration cinquante fois plus grande de M-SC-PEG (N-hydroxysuccinimidyl carbonate méthoxy-PEG) et BTC-PEG (Benzotriazolyl carbonate PEG) était nécessaire pour réduire la charge des liposomes pré-formés d'une façon significative.

La méthode d'insertion membranaire du PEG₁₇₆₀-monostéarate s'avère beaucoup plus avantageuse vu le temps très minime qu'elle requiert (1 minute) d'une part, et l'efficacité d'insertion proche de 95% d'autre part, une efficacité jamais préalablement atteinte.

Table des matières

ABRÉVIATIONS.....	i
MOLÉCULES CHIMIQUES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
REMERCIEMENTS.....	ix
1- INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1- DESCRIPTION GÉNÉRALE DES LIPOSOMES:	1
1.2- LES PROBLÈMES RELIÉS À L'APPLICATION THÉRAPEUTIQUE DES LIPOSOMES:	6
1.3- L'UTILISATION DES LIPOSOMES:	6
1.4- LA THÉRAPIE GÉNIQUE:	8
1.5- LIPOSOMES À LONGUE CIRCULATION:	12
1.6- LES PROBLÈMES DE LA MODIFICATION CONVENTIONNELLE:	17
2- LES SOLUTIONS PROPOSÉES	19
2.1- LA PÉGYLATION PAR RÉACTION CHIMIQUE:	19
2.2- L'INSERTION MEMBRANAIRE:.....	21
2.3- LA RÉACTION ÉLECTROSTATIQUE:	22
3- MÉTHODES ANALYTIQUES POSSIBLES	24
3.1- DÉTERMINATION DU DIAMÈTRE ET DU POTENTIEL ZÉTA (ζ) DES LIPOSOMES:.....	24
3.1.1- L'analyse de la distribution de taille:	27
3.1.2- La mobilité électrophorétique:	28
3.1.3- Le potentiel ζ:	29
3.2- ANALYSE QUANTITATIVE:	29
3.2.1- La colorimétrie:	30
3.2.2- La résonance magnétique nucléaire:	32
3.2.3- La séparation du surplus de PEG:	32
3.2.3.1- La dialyse:.....	33
3.2.3.2- La sédimentation:	34
3.2.3.3- La chromatographie de perméation de gel:	35
4- MATÉRIELS ET MÉTHODES	38
4.1- LES LIPIDES:	38
4.2- LES DÉRIVÉS PÉGYLÉS:	39
4.3- LE TAMPON:	41
4.4- PRÉPARATION DES LIPOSOMES:	41
4.5- LES MESURES DE DIAMÈTRE ET DU POTENTIEL ZÉTA (ζ) DES LIPOSOMES:	42

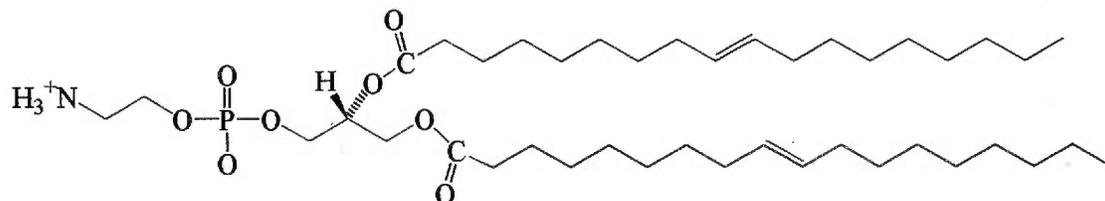
4.6- PEG INCORPORÉS DANS LES LIPOSOMES:.....	43
4.7- POST-MODIFICATION LIPOSOMIQUE PAR RÉACTION CHIMIQUE:.....	43
4.8- RÉACTIVITÉ DU M-SC-PEG EN FONCTION DU PH:.....	44
4.9- POST-MODIFICATION LIPOSOMIQUE PAR INSERTION MEMBRANAIRE:....	45
4.10- ANALYSE TURBIDIMÉTRIQUE DU DSPE-PEG ET PEG ₁₇₆₀ - MONOSTÉARATE:.....	45
4.11- POST-MODIFICATION LIPOSOMIQUE PAR INTERACTION ÉLECTROSTATIQUE:.....	46
4.12- LES ÉTUDES DU POTENTIEL ÉLECTROSTATIQUE DE LA MEMBRANE:....	46
4.12.1- En variant l'électrolyte:	46
4.12.2- En variant la composition lipidique	47
4.13- ANALYSE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE PEG-LIPOSOME:.....	47
4.14- ANALYSE SPECTROSCOPIQUE DE PEG-LIPOSOME:.....	49
4.15- SÉPARATION DU SURPLUS DE PEG DE LA SUSPENSION DES LIPOSOMES MODIFIÉS:.....	50
4.15.1- La dialyse:	50
4.15.2- La centrifugation:	51
4.15.3- La chromatographie:	52
5- RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	54
5.1- L'INCORPORATION CONVENTIONNELLE DES PEG:.....	54
5.1.1- DSPE-PEG:	54
5.1.2- PEG-stéarates:	57
5.2- PÉGYLATION DES LIPOSOMES PRÉ-FORMÉS:.....	62
5.2.1- Post-modification par réaction chimique:	62
5.2.2- Post-modification par insertion membranaire:	70
5.2.3- Post-modification par interaction électrostatique:	80
5.3- MÉTHODES ANALYTIQUES:.....	84
5.3.1- Analyses spectrophotométriques:	84
5.3.2- Séparation des PEG libres de la solution liposome-PEG: ..	89
5.3.2.1- La dialyse:.....	89
5.3.2.2- La centrifugation:.....	89
5.3.2.3- La chromatographie:.....	90
5.3.3- Analyse spectroscopique RMN:	94
6- CONCLUSION.....	103
RÉFÉRENCES	108

ABRÉVIATIONS

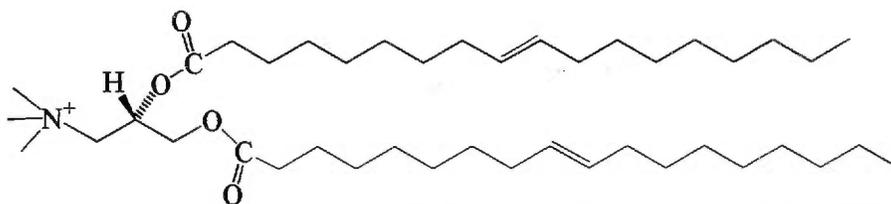
ADN	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
BTC-PEG	: Benzotriazolyl carbonate PEG
Chol	: Cholestérol
CMC	: Concentration micellaire critique
DOPE	: Dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOTAP	: Dioléoyltriméthylammonium propane
DSPE-PEG	: Distéoroylphosphatidyléthanolamine-PEG
GM ₁	: Monosialoganglioside
LUV	: Large vésicule unilamellaire
mARN	: Acide ribonucléique messenger
M-CM-PEG	: Carboxyméthyl méthoxy-PEG
MLV	: Large vésicule multilamellaire
M-SC-PEG	: N-hydroxysuccinimidyl carbonate méthoxy-PEG
PBS	: Tampon phosphate salin
PCS	: Spectroscopie de corrélation de photon
PE	: Phosphatidyléthanolamine
PEG	: Poly(éthylène glycol)
PEG-2-NHS	: PEG-2-succinimide
RES	: Système réticulo-endothélial
RI	: Indice de réfraction
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
rpm	: Révolutions par minute

- SDP : Processeur de distribution de taille
- SUV : Petite vésicule unilamellaire
- UV : Spectrophotométrie du rayonnement ultraviolet
- Potentiel ζ : Potentiel zéta

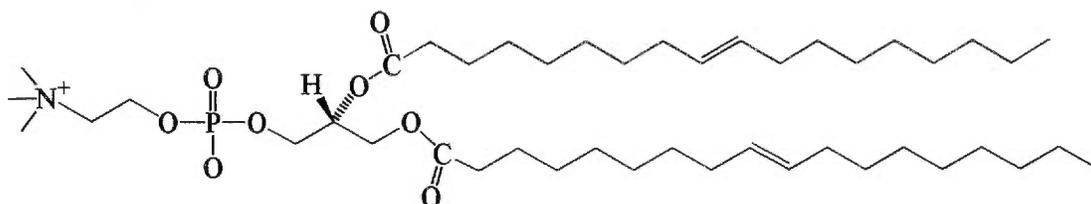
MOLÉCULES CHIMIQUES



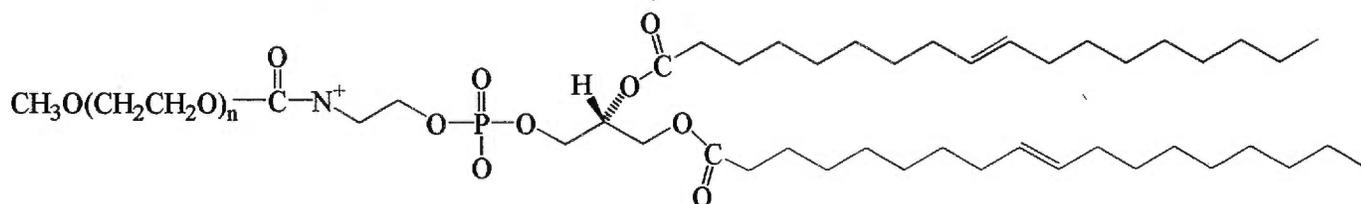
Dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE)



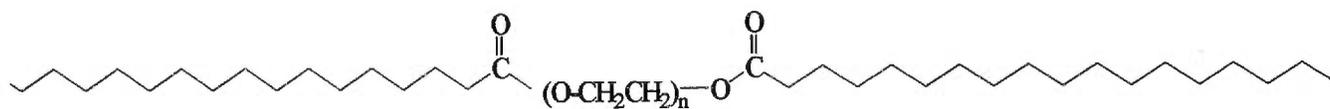
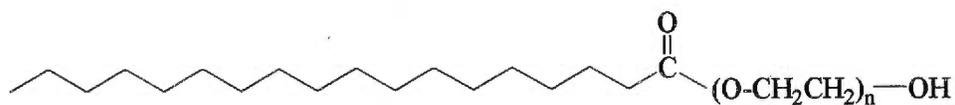
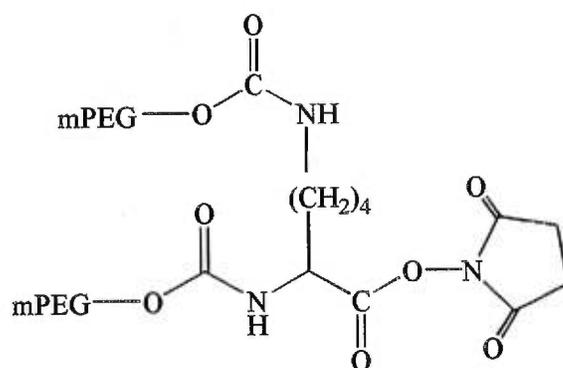
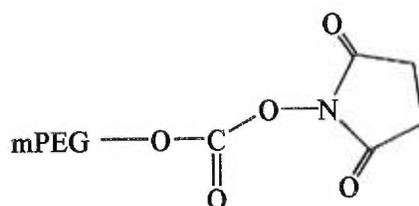
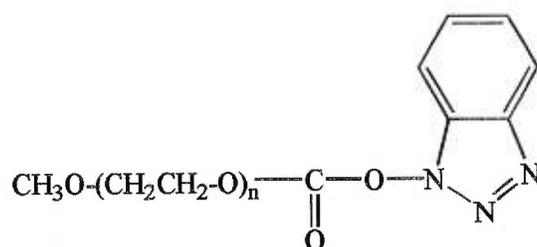
Dioléoyltriméthylammonium propane (DOTAP)



Dimyristylphosphatidylcholine (DMPC)



Phosphatidyléthanolamine-poly(éthylène glycol) (PE-PEG)

**PEG-distéarate****PEG-monostéarate****PEG2 Succinimide (PEG-NHS)****Succinimidyl carbonate de PEG (M-SC-PEG)****1-Benzotriazolyl-carbonate-PEG (M-BTC-PEG)**

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Formation des membranes liposomiques	3
<u>Figure 2</u> : Changement de la conformation de PE de la phase $L\alpha$ à la phase H_{II}	11
<u>Figure 3</u> : Inhibition de l'adsorption des protéines par les chaînes polymériques à la surface des liposomes	15
<u>Figure 4</u> : Représentation hypothétique de la rotation libre d'une chaîne polymérique à la surface de la bicouche liposomique	16
<u>Figure 5</u> : Illustration de la membrane du potentiel ζ à la surface d'une vésicule liposomique	26
<u>Figure 6</u> : Réduction du potentiel ζ des liposomes cationiques par l'incorporation de DSPE-PEG ₅₀₀₀	55
<u>Figure 7</u> : Réduction du ζ potentiel des liposomes cationiques par l'incorporation de DSPE-PEG ₂₀₀₀	56
<u>Figure 8</u> : Réduction du potentiel ζ des liposomes cationiques par l'incorporation de différents dérivés de PEG-stéarates	61
<u>Figure 9</u> : Réaction chimique ayant lieu entre DOPE et les dérivés de PEG activé soient M-SC-PEG et M-BTC-PEG	66
<u>Figure 10</u> : La réduction du potentiel ζ en fonction du mol% de PEG activé ajouté aux liposomes cationiques	68

<u>Figure 11</u> : Réduction du potentiel ζ des liposomes cationiques suite à l'incubation de différents mol% de DSPE-PEG et PEG ₁₇₆₀ -monostéarate à la température ambiante	72
<u>Figure 12</u> : Analyse turbidimétrique de DSPE-PEG ₂₀₀₀ , DSPE-PEG ₅₀₀₀ et PEG ₁₇₆₀ -monostéarate révélant les CMC de ces dérivés	77
<u>Figure 13</u> : Schéma décrivant l'insertion de PEG ₁₇₆₀ -monostéarate dans la membrane liposomique	78
<u>Figure 14</u> : Réactivité du Coomassie avec différentes formulations liposomiques ou micellaires	87
<u>Figure 15</u> : Réactivité du DOPE avec la Ninhydrine	88
<u>Figure 16</u> : Profil d'élution des liposomes DOPE/DOTAP après leur réaction avec 50 mol% de BTC-PEG ₂₀₀₀	
(A): liposomes/liposome-PEG	
(B): micelles de PEG ₂₀₀₀	
(C): monomères de PEG ₂₀₀₀	
(D): BTC hydrolysé	92
<u>Figure 17</u> : Profil d'élution de PEG ₃₄₀₀ diol déterminé par la mesure de l'indice de réfraction	93
<u>Figure 18</u> : Spectres de H ¹ RMN des liposomes DOPE/DOTAP ayant différents mol% de DSPE-PE ₂₀₀₀ , DSPE-PEG ₅₀₀₀ et PEG ₁₇₆₀	97
<u>Figure 19</u> : Courbes Standards décrivant la relation entre la concentration de DSPE-PEG ₂₀₀₀ , DSPE-PEG ₅₀₀₀ et PEG ₁₇₆₀	98

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1:</u> Caractéristiques physiques des PEG-stéarates	40
<u>Tableau 2:</u> Diamètre des liposomes cationiques formulés avec différentes quantités (mol%) de M-SC-PEG et BTC-PEG	60
<u>Tableau 3:</u> Diamètre des liposomes cationiques après leur réaction avec différentes quantités (mol%) de M-SC-PEG et BTC-PEG	67
<u>Tableau 4:</u> Réactivité du M-SC-PEG ₂₀₀₀ avec les liposomes cationiques en fonction du pH	69
<u>Tableau 5:</u> L'augmentation du diamètre des liposomes cationiques après insertion de DSPE-PEG ₂₀₀₀ et DSPE-PEG ₅₀₀₀	71
<u>Tableau 6:</u> Variation du diamètre et du potentiel ζ des liposomes après l'incubation avec 50 mol% de DSPE-PEG ₂₀₀₀ et DSPE-PEG ₅₀₀₀ à différentes températures	75
<u>Tableau 7:</u> Variation du diamètre et du potentiel ζ des liposomes après l'incubation avec 50 mol% de PEG ₁₇₆₀ -monostéarate à différentes températures	76
<u>Tableau 8:</u> Variation de la taille et de la charge des liposomes cationiques pré-formés après l'ajout de différentes quantités (mol%) de PEG ₁₇₆₀ -monostéarate.....	79
<u>Tableau 9:</u>	
(A) Le potentiel ζ de différentes formulations liposomiques	

(B) L'effet de différents électrolytes sur le potentiel ζ des liposomes DOPE/DOTAP	83
<u>Tableau 10</u> : Détermination de la quantité (mol%) de PEG activés attachés aux liposomes par la méthode spectroscopique de H ¹ RMN	101
<u>Tableau 11</u> : Détermination de la quantité de PEG ₁₇₆₀ -monostéarate, DSPE-PEG ₂₀₀₀ et DSPE-PEG ₅₀₀₀ insérés dans la membrane des liposomes cationiques tel qu'indiqués par la spectroscopie H ¹ RMN	102

Remerciements

Je tiens à remercier Dr. Nigel Phillips pour ses commentaires rares mais précieux, et pour sa collaboration en effectuant les figures 3, 4, 5 et 13.

Je remercie également tous ceux qui ont apporté leur aide et leur support au cours de la rédaction de cet ouvrage. J'aimerais mentionner tout particulièrement M. Georges Karam pour son aide inestimable apportée en m'offrant ses remarquables compétences en informatique.

Il convient aussi de signaler et de remercier mes parents Antoine et Jeanette, mon frère Raffoul et mes sœurs Liliane et Violette, pour leur soutien et leur support continu, en particulier ma mère pour tout ce qu'elle a enduré tout au long de ce travail.

Je remercie aussi tous mes amis pour leur support, surtout M. Chafic Chebli.

Je présente, en particulier, mes gratitudees à mes sœurs au Monastère de la Vierge Marie, à qui je prie qu'elle les protège toujours. Je tiens surtout à exprimer tous mes respects et mes sincères remerciements à ma très révérende mère Thekla pour son encouragement continuel, ses prières chaleureuses, sa patience illimitée et son courage de tenir ma croix. Un grand merci à mon très révérend père Efraim pour sa bénédiction qui m'accompagne toujours.

Merci pour votre appui à finir ce travail, pour tout ce que vous avez fait et pour tout ce que vous allez encore faire!

1- INTRODUCTION GÉNÉRALE

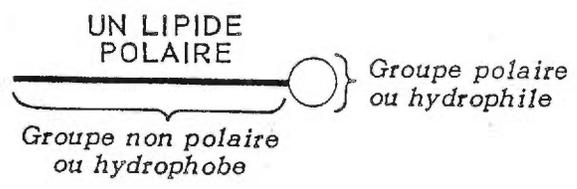
1.1- Description générale des liposomes:

Les liposomes ont été premièrement décrits dans les débuts des années 1960 par A.D. Bangham (1) et étaient initialement utilisés comme modèle pour l'étude des membranes biologiques. En raison de leur importante biocompatibilité et biodégradabilité, les liposomes étaient conçus comme système de libération de médicament surtout pour la livraison intraveineuse. De plus, à cause de leur caractère amphiphile et leur rapport important de surface à volume, les liposomes forment un système important de solubilisation et de dispersion pour un grand nombre de produits. Ils étaient exclusivement évalués comme des transporteurs de médicament (2). L'association des médicaments avec des transporteurs comme les liposomes a des effets significatifs sur le profil pharmacocinétique du médicament associé au transporteur. Les liposomes ont une habilité supérieure à diminuer la toxicité des médicaments associés aux liposomes par une modification de leur pharmacocinétique. Cette association peut retarder l'adsorption, modifier et restreindre la biodistribution et retarder le métabolisme du médicament. Elle peut également

augmenter significativement l'efficacité de grand nombre de traitements à base de médicaments (3). Puisque les liposomes peuvent notamment solubiliser des médicaments hydrophobes et hydrophiles, ils semblent être prometteurs pour la livraison locale. Ainsi, les liposomes peuvent prolonger l'action du médicament jusqu'à atteindre le site cible.

Les liposomes sont des vésicules sphériques dont le diamètre varie entre 40-80 nm et 5-10 μm . Les liposomes sont composés de molécules amphiphiles comportant une queue hydrophobe (insoluble dans l'eau) et une tête hydrophile (soluble dans l'eau), ou polaire (Figure 1a). Dans la plupart des cas, ces molécules sont constituées de deux chaînes d'acide gras, comportant chacune entre 10 et 24 atomes de carbone. Quand on mélange à de l'eau des lipides et des phospholipides en concentration suffisante, les queues hydrophobes se regroupent spontanément le plus loin possible de l'eau, tandis que les têtes hydrophiles se placent au contact des molécules d'eau. Ainsi, se forme une double couche où les queues d'acides gras sont dirigées vers l'intérieur de la membrane et les têtes polaires vers l'extérieur du liposome (Figure 1b). Normalement, la distance qui existe entre deux

A



B

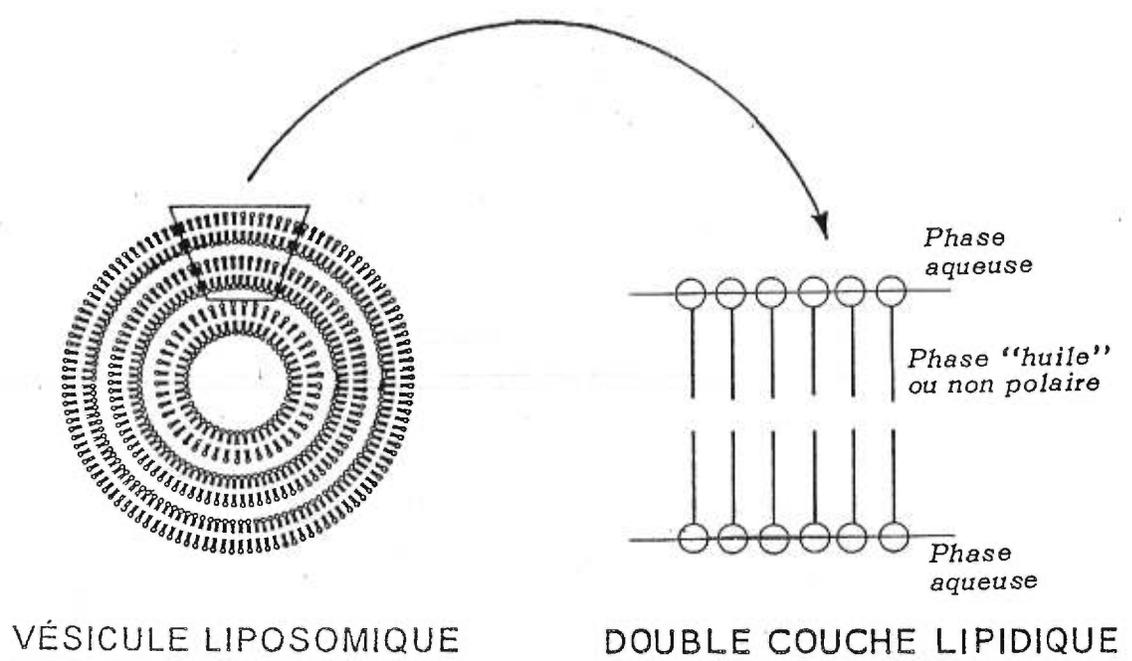


Figure 1: Formation des membranes liposomiques.

lipides opposés dans une bicouche est près de 6 nm, quoique cette distance dépend de l'activité ionique du solvant aqueux. Les liposomes sont classés par leurs tailles et leurs nombres de bicouches. Les liposomes qui sont constitués d'une seule couche lipidique entourant un petit volume de liquide sont dits unilamellaires. Parmi les liposomes à une seule couche, on distingue les petites vésicules unilamellaires (SUV) dont le diamètre est inférieur à 100 nm et les plus grosses classifiées comme larges vésicules unilamellaires (LUV). Il existe une dernière forme standard, les vésicules multilamellaires (MLV) qui sont constituées de plusieurs bicouches lipidiques séparées par un film d'une phase aqueuse. En raison de leur composition analogue à celle des membranes cellulaires, les liposomes suscitent les plus grands espoirs comme transporteurs de médicaments dans l'organisme. Ces propriétés remarquables sont surtout recherchées par les scientifiques afin de pouvoir livrer directement la dose de médicament nécessaire aux tissus malades en augmentant ainsi l'efficacité du médicament tout en réduisant la toxicité (4). Les liposomes peuvent dissoudre une quantité importante de médicament. Lorsqu'ils se forment, ils intègrent dans leur milieu toutes les molécules solubles présentes dans la solution initiale; par ailleurs, toute substance liposoluble ajoutée au

solvant se retrouve intégrée aux membranes liposomiques. Ces dernières, très similaires aux membranes cellulaires, interagissent facilement avec les cellules. Il existe plusieurs types d'interactions entre les liposomes et les cellules (5). La plupart des cellules adsorbent les liposomes qui libèrent lentement leur contenu. Tout dépendant de la nature du contenu et de la cellule cible, une certaine quantité du médicament passe à travers la membrane cellulaire et entre dans la cellule. Certains types cellulaires sont même capables d'assimiler les liposomes par endocytose. Ces derniers sont donc métabolisés par le lysosome, un organe intracellulaire à fonction digestive, puis les composants lipidiques sont recyclés dans la membrane de la cellule. Dans certains cas, les liposomes fusionnent avec les cellules, la membrane liposomique s'ajoute à la membrane cellulaire et le contenu du liposome est directement déversé dans le cytoplasme (6). Ainsi, capables d'être adsorbés par la plupart des cellules et de libérer lentement leur contenu, les liposomes sont de merveilleux systèmes de transport de médicaments à libération ciblée.

1.2- Les problèmes reliés à l'application

thérapeutique des liposomes:

Par ailleurs, quelques difficultés limitent encore certaines applications des liposomes en thérapie pharmaceutique. Quand les liposomes se trouvent dans la circulation, le système immunitaire les reconnaît et les détruit. Lorsque les liposomes circulent dans le sang, des protéines circulantes, comme les opsonines, les identifient comme des particules étrangères et les marquent, de sorte qu'ils sont ultérieurement détruits par d'autres éléments du système immunitaire (7). Les liposomes sont ainsi éliminés par le système réticulo-endothélial (RES), formé par les macrophages et par quelques autres cellules douées de phagocytose que l'on trouve surtout dans le foie et la rate. Ces cellules captent les liposomes de façon à empêcher la circulation dans le sang suffisamment longtemps pour atteindre les tissus cibles avec efficacité. Ainsi, les liposomes sont éliminés de la circulation sanguine, quelle que soit leur taille.

1.3- L'utilisation des liposomes:

Malgré les difficultés évoquées, le traitement de certaines maladies par voie liposomique a semblé être très efficace dans

de nombreux cas. Ainsi, des recherches de plus en plus approfondies ont conduit à une meilleure compréhension du comportement des liposomes et ceci a mené à de grands progrès .

En 1974, les liposomes étaient proposés comme un système de livraison pharmaceutique en thérapie du remplacement d'enzyme pour le traitement des maladies du stockage lysosomique (8). Depuis ce temps, l'application des liposomes à de nombreux domaines était proposée et évaluée. L'administration intraveineuse des médicaments enfermés dans les liposomes démontre un excellent potentiel de ciblage naturel pour les cellules du RES et possiblement aux cellules parenchymales du foie. L'incorporation des médicaments dans les liposomes a donné une meilleure efficacité thérapeutique surtout dans les domaines de la chimiothérapie du cancer (9), l'ophtalmologie (10), la thérapie anti-microbiale (11), les vaccins (12), la thérapie génique (13) et les applications diagnostiques (14). De plus, un meilleur contrôle de la stabilité des liposomes dans l'environnement biologique ainsi qu'un grand progrès dans la technologie liposomique ont contribué au développement de plusieurs formulations injectables à base de liposomes. AmBisome est un médicament fabriqué à partir de l'Amphotéricine B contenue dans des liposomes, qui est

développé contre les infections fongiques. Ce médicament se trouve déjà sur le marché pharmaceutique dans plus de 18 pays au monde. Un autre exemple de médicament administré par voie liposomique, approuvé et vendu dans les pharmacies, est la Daunorubicine. Celui-ci est développé pour traiter le sarcome de Kaposi. Plusieurs autres exemples de médicaments à base liposomique approuvés par l'administration des aliments et des médicaments (FDA) sont en voie de développement.

1.4- La thérapie génique:

Ces dernières années, la synthèse des lipides chargés a beaucoup contribué à l'élargissement du domaine d'application des liposomes (15). Ainsi, la densité de charge à la surface des liposomes était contrôlée pour formuler des liposomes de charge positive (cationiques) et des liposomes de charge négative (anioniques). La thérapie génique est une des plus importantes applications impliquant les liposomes cationiques (16). Ces derniers étaient utilisés pour faciliter la livraison des ADN (17-21), mARN (22), des oligomères antisenses (23,24), et des protéines (25,26) aux cellules vivantes. Depuis la publication initiale, un grand nombre de lipides cationiques

sont devenus commercialement disponibles (27-29) et plusieurs d'entre eux étaient connus pour posséder des avantages pratiques comme la réduction de la toxicité par rapport aux produits originaux (30-34). L'utilité générale des liposomes cationiques était surtout établie par les études *in vivo* qui montrent la dépendance des lipides cationiques livrant des gènes pour sonder les vaisseaux sanguins (35-38), les cellules épithéliales des poumons (39-41), les tissus du cerveau (42,43), l'embryon *Xenopus* (44,45), et la circulation systémique (intraveineuse et intrapéritonéale) (46,47). Les liposomes cationiques étaient administrés chez l'humain durant les essais cliniques en thérapie génique (48). La plupart des formulations lipidiques de charge positive requiert de la phosphatidyléthanolamine (PE) pour une activité optimale. Le mécanisme d'action de PE était attribué à sa capacité de transition de la phase L_{α} dans la bicouche à la phase hexagonale inversée H_{II} (Figure 2) qui facilite l'activité de transfection en permettant la libération de l'ADN incorporé dans le cytoplasme (49).

Toutefois, les liposomes cationiques, qui améliorent d'une façon significative la livraison de l'ADN, ARN et oligonucléotides antisenses (50,51), ont une tendance bien

marquée à se localiser dans les tissus du RES, particulièrement dans le foie et la rate (28). Il a été précédemment démontré que les liposomes cationiques contenant de l'ADN plasmidique sont déstabilisés par les protéines se trouvant dans le plasma (34) (albumine, IgG) et par les mucoprotéines/ mucopolysaccharides bucco-pharyngéales (52). D'autres études ont prouvé que les liposomes cationiques sont toxiques pour un certain nombre de cellules (17, 29, 53, 54). La disparition ou la déstabilisation des liposomes cationiques par le RES, suite à une administration intraveineuse, est connue pour être la limitation majeure de l'application clinique de la thérapie génique liposomique.

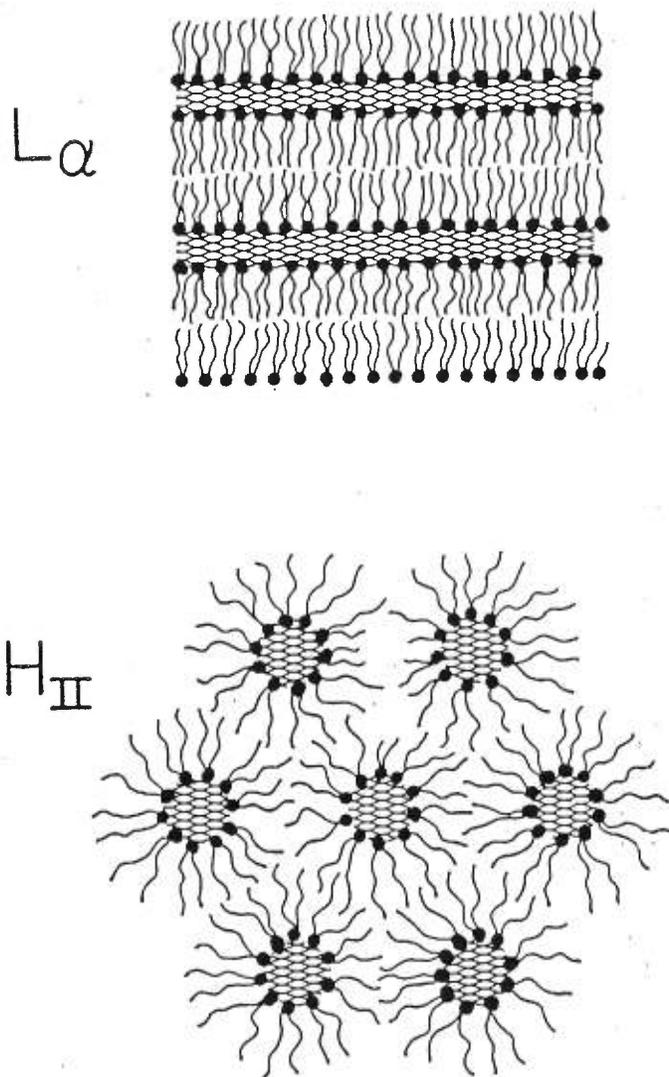


Figure 2: Changement de la conformation de PE de la phase L_{α} à la phase H_{II} .

1.5- Liposomes à longue circulation:

Les liposomes à longue circulation ou les liposomes stériquement stables étaient initialement introduits comme nouvelle approche pour prolonger la résidence des liposomes dans le sang en résistant à l'élimination par le RES (55-58). Il était démontré que les monosialogangliosides (GM_1) incorporés dans les liposomes augmentent leur résidence dans le sang (59). Cependant, puisqu'il est difficile d'obtenir une grande quantité de GM_1 , soit par extraction de sources naturelles ou par synthèse, les liposomes ayant des GM_1 ne sont pas pratiques pour l'application thérapeutique. Les problèmes potentiels reliés à l'accessibilité commerciale de ces liposomes stériquement stabilisés par les GM_1 ont mené à la recherche de remplaçants, soient des produits moins chers et non-toxiques ayant une plus grande accessibilité clinique.

Ces dernières années, des polymères amphipathiques composés de deux constituants, l'un hydrophobe et l'autre hydrophile, ont été proposés comme substituants des GM_1 utilisés comme outil pour la prolongation du temps de résidence des liposomes dans la circulation. Plusieurs polymères, ayant différentes propriétés physiques et

chimiques, ont été évalués pour leur capacité d'agir comme stabilisateurs efficaces ou protecteurs stériques (60-62).

Un matériel polymérique connu pour la stabilisation liposomique est le poly(éthylène glycol) (PEG) (63). Ce produit possède un ensemble de propriétés compatibles avec l'utilisation des liposomes. Ce polymère est d'une très basse toxicité (64), possède une excellente solubilité dans des solutions aqueuses (65) et une antigénicité et immunogénicité extrêmement faibles (66). Ce polymère est connu pour être non-biodégradable, cependant il est facilement excrétable après une administration dans les organismes vivants (67). Sa présence dans l'organisme ne nuit pas à la conformation des protéines ni à l'activité des enzymes, il montre de même, une excellente pharmacocinétique et une bonne biodistribution (68). Quand ce produit était injecté dans les animaux, une persistance remarquable dans le compartiment du sang était notée ainsi qu'une accumulation très minime dans les organes du RES, le foie et la rate (68-71).

Le PEG amphiphile contribue à réduire le taux d'adsorption protéique à la surface liposomique hydrophile (Figure 3). Il prévient l'interaction des composants du sérum avec les liposomes de manière à augmenter la stabilité de ces derniers

et réduire le taux d'interaction avec le RES (72). Ces effets ont été expliqués par la diminution de la charge à la surface si les liposomes sont chargés, et surtout par la mobilité élevée des chaînes de PEG qui est associée à la flexibilité conformationnelle et aux liaisons avec les molécules d'eau (72-75). Le mécanisme d'action relié à la protection par le PEG est sous une investigation continue. Différents groupes de chercheurs ont formulé des hypothèses expliquant le mécanisme de protection de ce polymère par sa flexibilité importante, c'est à dire la rotation libre des unités polymériques individuelles autour des liens inter-unités (Figure 4). Le mécanisme moléculaire de l'action protectrice du polymère est déterminé par sa grande flexibilité en solution exprimée par la formation d'une couche polymérique à la surface liposomique qui est imperméable à d'autres solutés (72, 76-78). La flexibilité polymérique joue un rôle important dans la protection stérique des liposomes, qui n'est possible que si les chaînes polymériques sont assez longues (45-115 unités).

Pour que le PEG soit capable de s'incorporer dans la membrane liposomique et s'y maintenir, un dérivé assez réactif de PEG hydrophile est normalement modifié, à une de ses extrémités, par l'ajout d'un groupement hydrophobique.

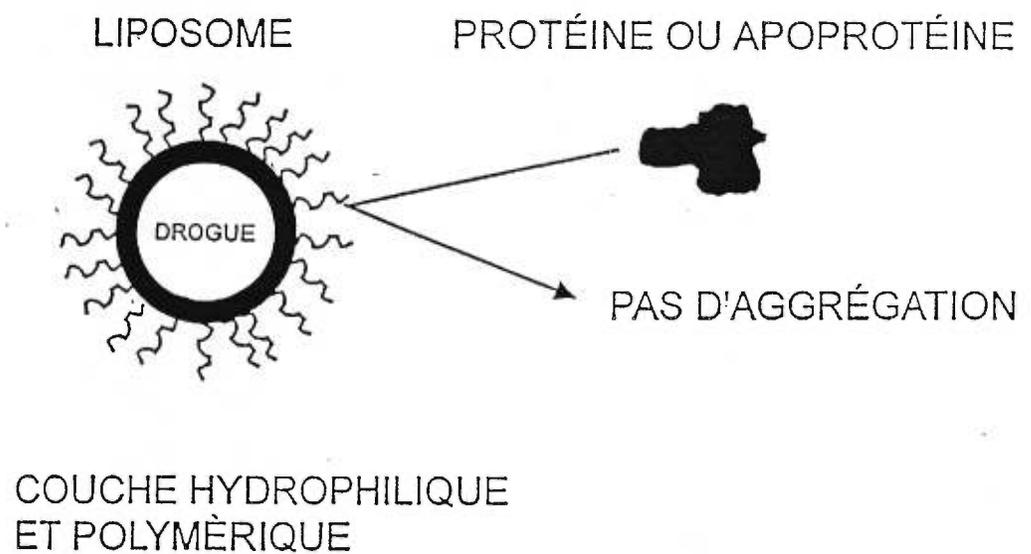


Figure 3: Inhibition de l'adsorption des protéines par les chaînes polymériques à la surface des liposomes.

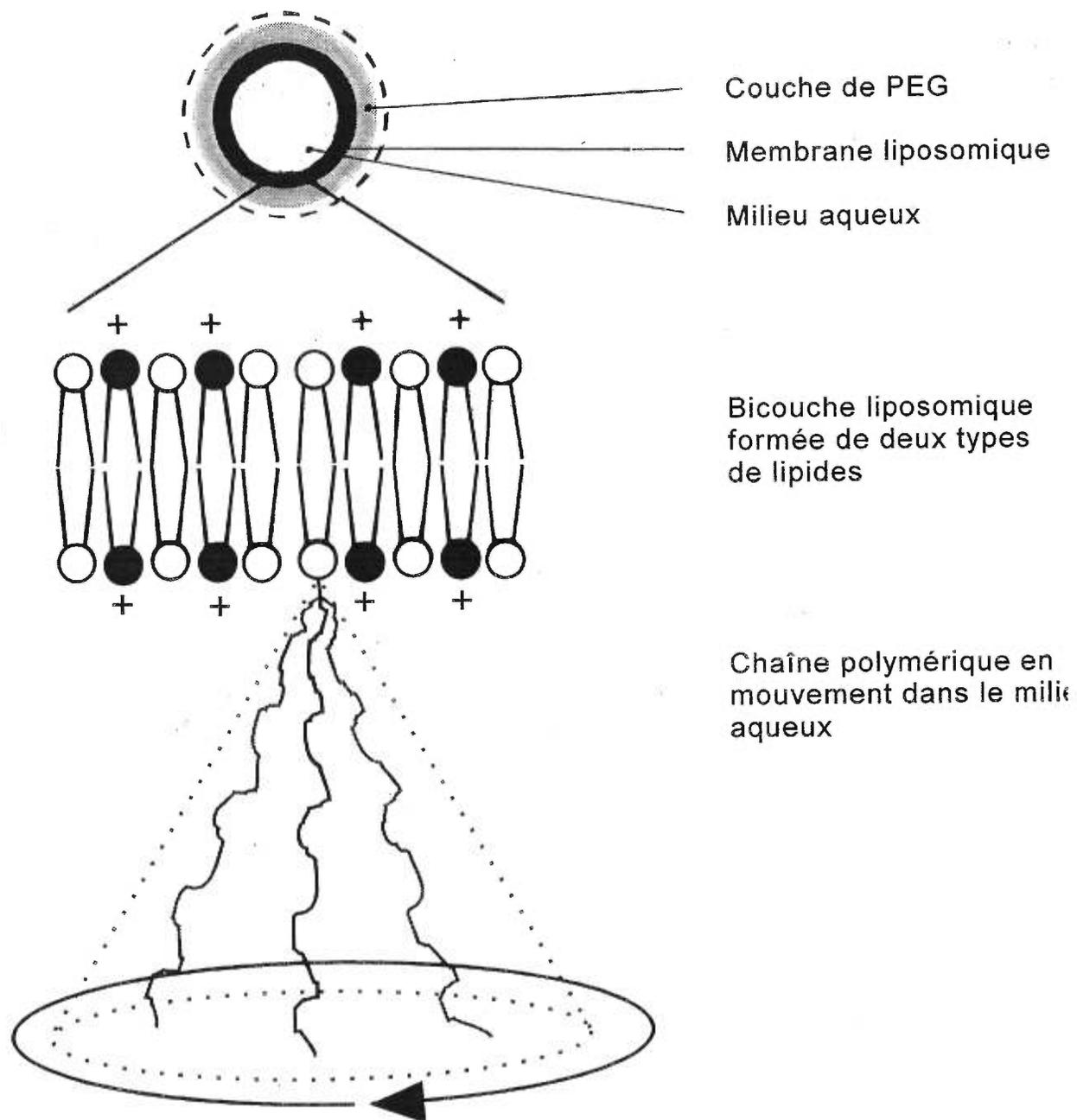


Figure 4: Représentation hypothétique de la rotation libre d'une chaîne polymérique à la surface de la bicouche liposomique.

Le lipide principalement utilisé pour la conjugaison avec les chaînes de PEG est le PE à cause de la réactivité du groupement amine. Le cholestérol-PEG et le céramide-PEG sont d'autres exemples de lipide-PEG qui ont été développés et qui prolongent également le temps de circulation des liposomes dans le sang en inhibant la déstabilisation dans le milieu biologique (79, 80). Les chaînes polymériques de PEG de différentes longueurs peuvent être couplées aux lipides par des liens covalents par le moyen de plusieurs réactifs de couplage. La procédure chimique globale du couplage de PEG aux PE prend toutefois beaucoup de temps à s'accomplir et est normalement laborieuse. Le mécanisme de réaction est une séquence de différentes étapes d'incubation, de chauffage, d'extraction, de filtration et finalement d'isolation par colonne chromatographique (81). Une fois la réaction complétée, les liposomes contenant des lipide-PEG peuvent être préparés par toutes les méthodes standards de préparation des liposomes.

1.6- Les problèmes de la modification

conventionnelle:

En incorporant les PEG dans les liposomes par les méthodes conventionnelles de préparation de liposomes, les PEG

amphiphiles se trouvent dans l'espace aqueux interne d'une part, et nécessairement entre les bicouches lipidiques des liposomes, d'autre part, où les molécules d'eau sont normalement enfermées. Ainsi, la phase aqueuse est significativement moins disponible pour l'incorporation du médicament.

La modification superficielle des liposomes par l'inclusion de ces conjugués (lipide-PEG) pour former des liposomes à longue circulation peut réduire le taux d'encapsulation de quelques médicaments causant ainsi des changements dans le modèle pharmacocinétique par rapport aux liposomes classiques non-modifiés. Quand les liposomes de charge positive sont enveloppés par une couche de PEG, la quantité totale d'ADN incorporé est certainement réduite et le rapport molaire lipide cationique/ADN est significativement réduit puisque la charge positive à la surface est principalement masquée. L'incorporation de PEG amphiphile dans les liposomes cationiques réduit d'une façon significative l'association avec l'ADN (N.C. Phillips résultats non-publiés).

2- LES SOLUTIONS PROPOSÉES

Les deux grandes limitations de la thérapie génique liposomique à contourner sont l'instabilité dans l'organisme d'une part, et l'incorporation réduite des gènes dans les liposomes cationiques de l'autre.

Des approches expérimentales différentes sont proposées. Principalement, en greffant du PEG à la surface des liposomes pré-formés, on pourrait incorporer des médicaments ou de l'ADN avant toute modification membranaire afin d'assurer une saturation liposomique en médicament.

2.1- La pégylation par réaction chimique:

La pégylation par réaction chimique est inspirée de la science pharmaceutique impliquant les protéines et a été initialement introduite par la conjugaison, par des liens covalents, des polymères avec des espèces biologiques (protéines, enzymes etc.) dans le but de régulariser le transport au site cible.

Pour pouvoir réduire l'immunogénicité des protéines introduites dans l'organisme, des PEG-protéines ont été développés. L'une des conséquences remarquables de la modification des

protéines par le PEG est la prolongation de la résidence dans la circulation par rapport aux protéines natives.

Pour pouvoir être capable de lier le polymère à la protéine, le groupe hydroxyl à l'extrémité du polymère devait être converti en un groupement réactif fonctionnel. Ce processus est fréquemment appelé "activation" et le produit final "PEG activé". Normalement, le groupe fonctionnel est choisi de façon à être capable de réagir avec les amines des protéines. La première approche à la formation des PEG activés a été présentée dans les années 70 et impliquait le chlorure cyanurique (82). La toxicité ainsi que la réactivité excessive du produit avec des groupes fonctionnels autres que l'amine ont nécessité le développement d'autres méthodes d'activation. Le carbodiimidazole avait une réactivité très lente et requérait un long temps de réaction pour la modification extensive des protéines (83). Un peu plus tard, les dérivés pégylés de succinimidyl succinate ont démontré une meilleure réactivité vu qu'ils se conjuguent rapidement aux protéines (84). Par ailleurs, les liens esters qui résultaient des conjugaisons entre le PEG et les protéines décrites ci-haut, avaient une stabilité limitée dans le milieu biologique. Toutefois, les liens uréthanes obtenus par la réaction des protéines avec d'autres PEG activés, comme le PEG-phénylcarbonate, ont montré une

stabilité chimique considérablement plus élevée que les liens esters, mais l'application thérapeutique de certains de ces dérivés était restreinte par plusieurs facteurs, notamment la toxicité des résidus hydrophobiques (85). Finalement, le N-hydroxysuccinimidyl carbonate méthoxypoly(éthylène glycol) ou M-SC-PEG était évalué et s'avérait être un dérivé très stable vu le lien uréthane obtenu en conjugant le PEG aux protéines. Le grand avantage de l'utilisation de ce produit est la rapidité de la réaction qui a lieu dans un temps ne dépassant pas 30 minutes et dans des conditions douces (86). Ce sont ces propriétés remarquables que nous utilisons afin de greffer les PEG aux liposomes pré-formés. Notre recherche nous a conduit à l'utilisation d'autres dérivés pégylés ayant des propriétés analogues au M-SC-PEG soient le BTC-PEG [benzotriazolyl carbonate-1-poly(éthylène glycol)] et le PEG-2-NHS [poly(éthylène glycol)-2-succinimide].

2.2- L'insertion membranaire:

Il avait déjà été démontré que le DSPE-PEG₁₉₀₀ pouvait être inséré dans des liposomes neutres et que l'insertion maximale n'était atteinte qu'à des températures élevées avec un temps d'incubation très long (87). En vu d'améliorer le taux d'insertion, une approche différente est proposée, celle

impliquant l'insertion des PEG-stéarates dans les liposomes. Les PEG-stéarates sont des co-polymères ayant des chaînes hydrocarbures hydrophobes qui peuvent s'insérer facilement dans les membranes liposomiques et s'y maintenir. Les PEG-stéarates sont de meilleurs candidats dans le cadre de l'insertion liposomique pour plusieurs raisons, soient la non-toxicité, leur reconnaissance par la FDA, leur accessibilité commerciale, leur utilisation commune dans le domaine pharmaceutique et surtout leur coût beaucoup moins élevé par rapport à d'autres dérivés de PEG. Ainsi, une étude détaillée de l'habilité de ces dérivés de PEG à réagir avec les liposomes cationiques pré-formés est décrite plus tard.

2.3- La réaction électrostatique:

Les phénomènes électrostatiques jouent un rôle important dans plusieurs processus biologiques. Pour les liposomes, ces phénomènes sont plus significatifs puisque les charges à la surface peuvent être contrôlées par l'inclusion des lipides synthétiques positifs ou négatifs. Les liposomes sont très dynamiques de nature, et les forces électrostatiques créées par les charges de surface ont permis l'interaction des lipides cationiques avec les ADN et l'introduction de ces complexes

dans les cellules (88). Il est bien clair que l'activité biologique des membranes cellulaires est surtout fonction des processus électrostatiques, ce qui explique évidemment le transfert ionique (cations/anions) intra- extra- cellulaire à travers les membranes dans le système. Cependant, ces membranes ne peuvent pas introduire des groupements de grosses tailles; ces derniers s'adsorbent alors à la surface par attraction électrostatique. Puisque les membranes liposomiques sont semblables aux membranes cellulaires, leur fonctionnement est nécessairement pareil. Ainsi, une attraction électrostatique pourrait avoir lieu entre les liposomes chargés et d'autres groupements de charge contraire. Se basant sur cette hypothèse, dans le but de protéger la surface de ces liposomes, la capacité d'interaction électrostatique entre les liposomes cationiques pré-formés et des polymères de charge négative est investiguée et documentée ci-après.

3- MÉTHODES ANALYTIQUES POSSIBLES

3.1- Détermination du diamètre et du potentiel zéta

(ζ) des liposomes:

La taille des particules influence grandement leur distribution dans les organes. Pour pouvoir circuler à travers les petits capillaires, la taille de la particule doit être plus petite que 5 μm . De plus, un diamètre de moins de 200 nm est requis pour éviter les effets de filtration de la rate (89). Les liposomes peuvent avoir un diamètre variant entre 200 Å et plusieurs microns, et l'accessibilité des liposomes à certains tissus peut effectivement être restreinte à cause de la barrière structurale des capillaires. Il est donc indispensable d'étudier la taille des liposomes, surtout que cette étude révèle très souvent, des informations sur la stabilité, la dégradation, l'agrégation etc. des vésicules qui peuvent avoir lieu dans le milieu réactionnel. De même, une des caractéristiques importantes des particules liposomiques est la possibilité de l'existence d'une charge électrique à leur surface. À cause de cette charge, les ions de charges contraires tendent à agréger à proximité, et une atmosphère ionique est formée. Une région de charge à

distinguer est celle de la couche presque immobile d'ions qui s'adhèrent fermement à la surface de la particule pouvant inclure des molécules d'eau (si celle-ci est le milieu de dispersion). Cette couche, appelée couche de solvation est en relation directe avec le potentiel électrique se trouvant à la surface (Figure 5). En milieu biologique, la stabilité des particules colloïdales est fonction de la charge apparente à la surface. Des études ont montré que les particules ayant une charge apparente neutre à la surface semblent être les plus appropriées quant à la résidence dans le sang (90,91). Ainsi, le masquage de la charge superficielle des liposomes ainsi que l'étude des phénomènes électrostatiques ayant lieu à la surface membranaire ne peuvent principalement être compris que par les mesures du potentiel zéta (ζ) des liposomes. Plusieurs techniques ont été développées pour l'analyse de la distribution de taille et pour l'étude de la mobilité électrophorétique. Ces techniques sont normalement basées sur l'étude mathématique du modèle physique des particules.

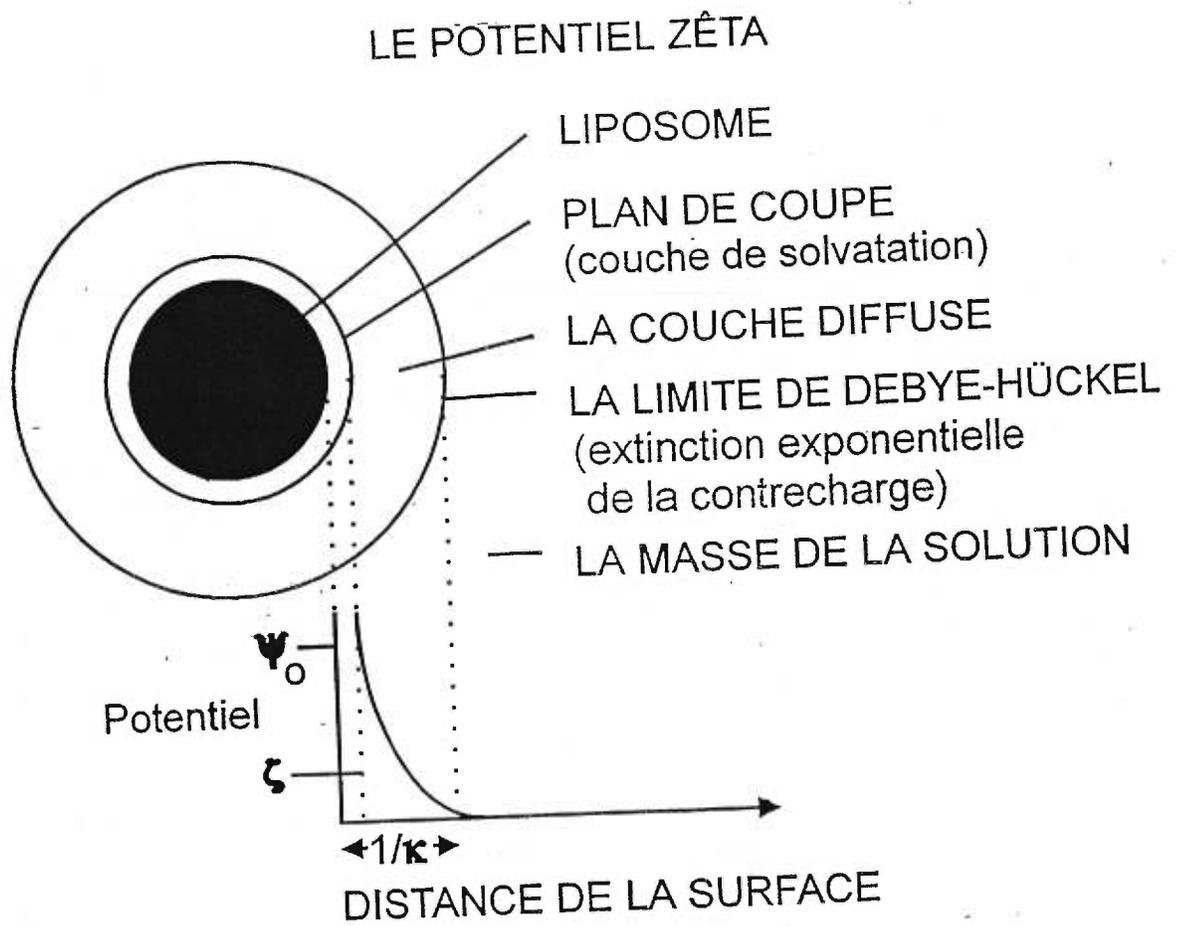


Figure 5: Illustration de la membrane du potentiel ζ à la surface d'une vésicule liposomique.

3.1.1- L'analyse de la distribution de taille:

L'analyse de la distribution de taille est principalement basée sur l'analyse spectroscopique de corrélation de photons (PCS). La technique de PCS détermine la taille particulaire en illuminant les particules dans un fluide à l'aide d'une lumière monochromatique. La lumière diffusée par les particules lors du mouvement Brownien crée des fluctuations dans l'intensité lumineuse qui peuvent être facilement caractérisées par la PCS. Le mouvement Brownien est un mouvement aléatoire des particules qui est dû aux collisions avec les molécules du fluide et qui cause une diffusion des particules à travers ce dernier. À cause de la nature aléatoire du mouvement Brownien, la distance qu'une particule parcourt dans une direction augmente avec la racine carrée du temps écoulé selon:

$$x^2 = D.t$$

où t = temps (s) et D est le coefficient de diffusion défini par:

$$D = (K_B T / 3\pi\eta d_i) \times 10^4 \quad \text{où}$$

d_i = le diamètre de la $i^{\text{ème}}$ espèce des particules (μm)

T = température ($^{\circ}\text{K}$)

η = la viscosité (poise)

K_B = la constante de Boltzmann (erg/K)

3.1.2- La mobilité électrophorétique:

Quand une particule suspendue dans un liquide est assujettie à un champ électrique appliqué, la particule accélère jusqu'à atteindre une vitesse terminale. Arrivée à cette vitesse, le trajet visqueux du mouvement de la particule est égal à la force du champ électrique qui agit sur la particule. Cette vitesse terminale est atteinte en quelques microsecondes. La mobilité électrophorétique (U) d'une particule est donnée par:

$$U = v/E \text{ (}\mu\text{m.cm/V.s)} \quad \text{où}$$

v = vitesse terminale ($\mu\text{m/s}$)

E = champ électrique appliqué (V/cm)

Pour les larges particules:

$$U = 10^4 (s/\eta\kappa) \quad \text{où}$$

s = la densité de charge à la surface de la particule (coulombs/cm²)

η = la viscosité du diluant (poise)

κ = le paramètre de Debye-Hückel (cm⁻¹)

Ainsi, U est proportionnelle à la densité de charges à la surface de la particule.

3.1.3- Le potentiel ζ :

Le potentiel ζ est un paramètre qui peut être déduit de la mobilité électrophorétique. Il est défini comme le potentiel électrique entre la masse de la solution et la couche de solvation autour de la particule. La couche de solvation est une sphère imaginaire couvrant la surface d'une particule dans laquelle le solvant migre avec la particule à travers la solution. Le potentiel ζ a le mV comme unité et est défini par:

$$\zeta = \eta U / \varepsilon \quad \text{où}$$

ε = la permittivité (farad/cm)

3.2- Analyse quantitative:

Bien que l'association de PEG aux liposomes est une technique très utilisée et bien répandue dans le domaine de la recherche impliquant les liposomes, peu de techniques d'analyse sont connues pour la quantification de PEG associés aux liposomes. Il n'existe néanmoins aucune technique d'analyse directe qui peut révéler, avec une certaine précision, le nombre de chaînes polymériques liées aux liposomes.

3.2.1- La colorimétrie:

Une méthode d'analyse indirecte souvent utilisée pour déterminer le nombre de molécules de PEG liés aux protéines et adoptée par les chercheurs de ce domaine les "liposomologistes" est la colorimétrie (81, 92-92). Souvent, d'autres essais comme la fluorescamine et la TNBS (95) sont également très employés pour ce genre d'analyse (80,96). Le Coomassie Brilliant Blue G-250 est un colorant connu depuis plus de vingt ans et qui se conjugue facilement avec les amines secondaires des protéines (97). L'intensité de la coloration bleue qui résulte de cette conjugaison peut être étudiée par spectrophotométrie à 595 nm, une longueur d'onde où l'absorption est maximale. La relation linéaire qui existe entre l'absorbance mesurée et la quantité de protéines présente dans le milieu a fait de cette technique une méthode d'analyse des protéines très courante. L'instrument utilisé pour mesurer la quantité de lumière absorbée à une longueur d'onde particulière, quand cette lumière se trouve dans le visible du spectre électromagnétique est appelé colorimètre. La lumière visible ordinaire passe à travers l'échantillon puis à travers un prisme, où la lumière de la longueur d'onde spécifique est choisie. Cette lumière est dirigée vers une

photocellule où son intensité est mesurée. Un appareil métrique offre une indication visible de l'intensité de la lumière de la longueur d'onde en question. Les PEG sont normalement liés aux liposomes par des liens uréthanes qui peuvent être révélés, d'une façon parallèle à l'analyse des protéines d'amines secondaires, par l'intermédiaire du Coomassie. Vu sa facilité et son utilité, la quantité de PE-PEG incorporés dans les liposomes est très souvent analysée par cette technique (94).

La méthode complémentaire à cette dernière est celle qui implique la Ninhydrine. Quand une solution aqueuse contenant un acide α -aminé est traitée par la Ninhydrine, une coloration violette est produite suite à une déamination oxidative. Cette coloration violette a une absorption significative à 570 nm, et l'intensité de l'absorption est directement proportionnelle à la quantité de l'amine présente dans la solution. Ainsi, les lipides faisant partie des liposomes et ayant une tête polaire d'amine primaire, qui n'ont pas réagi avec les chaînes de PEG, sont révélés par la Ninhydrine et donc la quantité de PEG liés aux liposomes peut théoriquement être calculée par une simple soustraction.

3.2.2- La résonance magnétique nucléaire:

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique instrumentale qui permet la détermination du nombre, du type et de la position relative de certains atomes dans une molécule. Ce type de spectroscopie s'applique seulement aux atomes possédant des moments magnétiques nucléaires à cause de leur propriété de spin nucléaire. Il existe plusieurs atomes possédant ces caractéristiques mais l'atome d'hydrogène est le plus intéressant et le plus commun en analyse par RMN. Cette technique d'analyse est rarement utilisée en tant qu'analyse quantitative. Elle est pourtant une des meilleures techniques utilisées pour l'analyse qualitative même dans l'étude des liposomes impliquant le PEG (81,98). Cependant, une étude approfondie des spectres effectuée dans notre laboratoire a pu faire de cette technique une méthode d'analyse quantitative très précise.

3.2.3- La séparation du surplus de PEG:

Toutefois, toute analyse suggère l'élimination du surplus de PEG de la suspension liposomique. Les polymères sont des particules de tailles plus grandes que les petites molécules chimiques mais plus petites que les vésicules liposomiques. À

cause de leurs tailles moyennes, ces particules ne peuvent pas être précipitées dans les milieux aqueux mais restent plutôt en solution indéfiniment, suspendues par les mouvements Browniens des molécules du solvant. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour séparer le surplus de PEG de la suspension liposomique.

3.2.3.1- La dialyse:

La méthode conventionnelle pour la séparation de ces particules est l'expérience impliquant la dialyse. En dialyse, les petites molécules peuvent être séparées des macromolécules, en plaçant l'échantillon dans un sac d'un matériel semi-perméable introduit dans l'eau ou dans une solution de réactif appropriée. Normalement, les petites molécules diffusent vers l'extérieur du sac, jusqu'à atteindre un équilibre, c'est à dire jusqu'à avoir une concentration égale des deux côtés de la membrane. La taille moyenne des liposomes est énorme par rapport aux molécules de PEG. Une très petite vésicule liposomique (SUV) a un poids moléculaire de plusieurs millions de daltons, tandis que les chaînes polymériques, normalement utilisées pour masquer la surface liposomique, ont des poids moléculaires n'excédant pas 10000

daltons. De plus, les liposomes sont assez rigides et leur décomposition est difficile dans les conditions expérimentales normales. Certains chercheurs ont effectivement essayé de séparer le surplus de PE-PEG de la suspension de liposomes modifiés par la méthode de dialyse (93). L'efficacité de cette méthode, par contre, n'a été jamais prouvée.

3.2.3.2- La sédimentation:

Une deuxième méthode consiste à essayer de sédimenter la solution liposomique et extraire le liquide surnageant contenant les polymères. Dans le champ gravitationnel, les particules plus lourdes se posent sur le pied de la colonne de la solution par un processus appelé sédimentation. Le taux de sédimentation dépend des densités de tailles et des formes des particules. Quand l'échantillon est à l'équilibre, les particules sont dispersées sur un rang de hauteur en accord avec la distribution de Boltzmann puisque le champ gravitationnel est en compétition avec l'effet de l'agitation du mouvement thermique. La sédimentation est normalement très lente, mais elle est accélérée en remplaçant le champ gravitationnel par un champ centrifugal. Ce dernier peut être accompli dans une ultracentrifugeuse, qui est essentiellement

un cylindre pouvant tourner à une grande vitesse par rapport à son axe avec un échantillon dans une cellule près de la périphérie. En sédimentant ainsi les particules liposomiques, les polymères peuvent possiblement être extraits en retirant le liquide surnageant.

3.2.3.3- La chromatographie de perméation de gel:

Enfin, une des méthodes les plus utilisées en biochimie est celle basée sur la chromatographie. La chromatographie est définie comme la séparation de deux ou plusieurs produits dans un mélange par la distribution entre deux phases, l'une stationnaire et l'autre mobile. Plusieurs types de chromatographie existent et sont utilisés selon la nature des produits de l'expérience. La chromatographie la plus commune est celle qui implique une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide. En sciences pharmaceutiques, la chromatographie de perméation de gel ou la chromatographie d'exclusion est d'une grande importance. La phase stationnaire de ce type de chromatographie consiste en du matériel polymérique réticulé. Les molécules sont séparées selon leurs tailles par leur capacité à pénétrer une structure plutôt criblée. Dans ce type de chromatographie, très souvent, l'eau ou des

solutions tampons sont utilisées comme phase mobile. Ainsi, les molécules passent à travers la phase stationnaire poreuse, aidées par l'écoulement de l'éluant, en descendant le long de la colonne. Les petites molécules pénètrent la structure poreuse plus facilement que les plus grandes. Ces dernières avancent donc à travers la colonne plus rapidement que celles de tailles plus petites et sont donc éluées en premier. Séphadex ou Sépharose sont des matériaux très populaires en chromatographie de perméation de gel. Du point de vue chimique, le Sépharose est un hydrate de carbone polymérique réticulé. Le degré de réticulation détermine la taille des pores dans la matrice polymérique. De plus, les groupes hydroxyles sur ce polymère peuvent adsorber les molécules d'eau, ce qui cause le gonflement du matériel créant des trous dans la matrice.

Cette technique est surtout utilisée pour la séparation des protéines, des acides nucléiques, des enzymes et des glucides. Dans l'étude des liposomes, la chromatographie est essentiellement utilisée pour la séparation du surplus des molécules de médicament non-encapsulées de la suspension liposomique ou pour séparer l'excès du marqueur radioactif de la masse liposomique (92,93). Dans le champ de ce travail,

cette chromatographie est de grande importance pour isoler les liposomes après leur modification par PEG.

4- MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1- Les lipides:

Dans la plupart de nos expériences, les liposomes sont fabriqués à partir d'un phospholipide, le dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE) ayant un poids moléculaire de 744.04 et d'un lipide cationique, le dioléoyltriméthylammonium propane (DOTAP) ayant un poids moléculaire de 698.55 qui ont été fournis par Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Al. Ces lipides ont une pureté de 99%. Des solutions mères de 10 mg/mL de chacun des lipides ont été préparées dans du chloroforme (Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wisconsin) et ont été conservées à -10°C jusqu'à leur utilisation. Pour la fabrication des liposomes, un rapport molaire de 1:1 était utilisé (sauf spécifié autrement) et la concentration totale liposomique était de 10 μ mol/mL dans du tampon phosphate de pH physiologique.

4.2- Les dérivés pégylés:

Le distéaroylphosphatidyléthanolamine poly(éthylène glycol) 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀) et le DSPE-PEG₅₀₀₀ ainsi que les PEG activés soient le M-SC-PEG et le BTC-PEG (PM: 2000 et 5000 pour les deux dérivés) ont été obtenus de Shearwater Polymers (Huntsville, AL). Ces dérivés ont une pureté supérieure à 97% et ont des points de fusion variant entre 50°C et 60°C. Ils ont une apparence poudreuse de couleur blanche. Ils étaient conservés dans des bouteilles de verre fumé, pour éviter le contact avec la lumière, à une température de -10°C. Les PEG activés s'hydrolysent facilement dans un milieu aqueux. Leur temps de demi-vie dépend de la température ainsi que du pH du solvant réactionnel. À 25°C et à un pH 7.5, les temps de demi-vie de M-SC-PEG et BTC-PEG sont respectivement 30.6 et 22.5 minutes. Les PEG-stéarates étaient généreusement offerts par Calgene Chemical Co., Skokie, IL. Ces dérivés ne se dégradent pas facilement et sont conservés à la température ambiante. Leur température de fusion dépend de leurs caractéristiques chimiques, c'est à dire du nombre des groupements stéarates attachés à la chaîne polymérique hydrophile et de la longueur de cette dernière (Tableau 1).

<i>Nom</i>	<i>Nom commercial*</i>	<i>T_f (°C)</i>	<i>Description</i>
PEG ₆₀₀ -monostéarate	Lipo-PEG 6-S	37	solide poudreux de couleur crème
PEG ₁₀₀₀ -monostéarate	Cerasynt 840	41	Solide poudreux d'une texture cireuse
PEG ₁₇₆₀ -monostéarate	Myrj 52	46	Flocons solides d'une texture cireuse
PEG ₆₀₀ -distéarate	Protamate 600 DS	39	solide poudreux de couleur crème
PEG ₁₄₀₈ -distéarate	Kessco PEG 1540	45	flocons solides blancs
PEG ₆₀₀₀ -distéarate	Kessco X-221	53	solide cireux blanc

*D'autres noms commerciaux peuvent aussi exister.

Tableau 1: Caractéristiques physiques des PEG-stéarates.

4.3- Le tampon:

Le tampon phosphate salin (PBS) est utilisé dans la plupart de nos expériences. Une solution mère de 10x NaH_2PO_4 titré avec $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ jusqu'à pH 7.4 est préalablement préparée et conservée dans une bouteille fermée à 4°C. Avant chaque utilisation, le tampon est dilué à 10 mM dans de l'eau déionisée contenant 0.85% p/v NaCl.

4.4- Préparation des liposomes:

Le DOPE et le DOTAP étaient mélangés dans du chloroforme dans un ballon jaugé de 250 mL. Le ballon était ensuite fixé à l'évaporateur en le plaçant dans un bain préalablement chauffé à 65°C. Une fois la vitesse de rotation du ballon et la pression réglées, le chloroforme s'évapore rapidement et un film lipidique se forme sur les parois. Le ballon est ensuite retiré et laissé à l'air pour quelques minutes afin d'assurer l'évaporation complète du résidu du liquide organique. Suite à l'ajout du PBS, des vésicules plurilamellaires liposomiques sont formées par le gonflement volumique et la rupture de la bicouche lipidique causés par la pénétration des molécules d'eau à travers les lipides. Le diamètre des liposomes obtenus

était parfois réduit par un traitement aux ultrasons, à 25°C pour 30 à 45 minutes, qui cause la fragmentation des bicouches lipidiques puis la réorganisation en vésicules unilamellaires.

4.5- Les mesures de diamètre et du potentiel zéta

(ζ) des liposomes:

Le diamètre des liposomes était déterminé par la spectroscopie de corrélation de photon en utilisant un analyseur de microparticules Coulter N4 Plus, dans un mode processeur de distribution de taille (SDP) à un angle de 90°. Pour ce faire, 100 μ L de l'échantillon était dilué dans une cuvette contenant 2 mL de PBS, le même solvant que la suspension liposomique. La même dilution était utilisée pour la détermination de la charge à l'interface entre la surface des liposomes et le solvant, mesuré par un électrophorèse Doppler dans un Coulter DELSA 440SX. Ce dernier analyse les particules en faisant des mesures indépendantes de la lumière captée à quatre angles différents ayant chacun une résolution de 250 canaux. La comparaison des spectres simultanés de la lumière laser Doppler de ces quatre angles permet la détection

des particules. L'ordinateur lié à cet instrument calcule directement les données et révèle les résultats à l'écran.

Le Coulter N4 Plus ainsi que le DELSA ne peuvent mesurer que les particules ayant un diamètre compris entre 10 nm et 30 μm . Par conséquent, les micelles dont le diamètre est inférieur à 10 nm ne peuvent être détectées.

4.6- PEG incorporés dans les liposomes:

L'incorporation conventionnelle de PEG s'effectue normalement durant la préparation des liposomes. Chacun des produits de DSPE-PEG et PEG-stéarates était séparément mélangé avec DOPE et DOTAP dans le chloroforme avant l'étape d'évaporation et d'hydratation. Ainsi, les liposomes incorporés de PEG étaient préparés suivant la méthode conventionnelle de la préparation des liposomes classiques ci-avant décrite.

4.7- Post-modification liposomique par réaction

chimique:

Une quantité de 50 μmol de chacun des dérivés de PEG (M-SC-PEG et BTC-PEG) était transféré dans une fiole contenant 1 mL de PBS et agité à l'aide d'un vortex pour un temps ne

dépassant pas 40 secondes. Une quantité convenable, selon le % en mol désiré par rapport aux liposomes, était immédiatement ajoutée à une suspension liposomique antérieurement préparée. Selon le temps de demi-vie des produits, la solution finale était agitée jusqu'à réaction complète. Le surplus de PEG n'ayant pas réagi ainsi que le produit obtenu suite à l'hydrolyse étaient séparés de la solution liposomique par chromatographie de perméation de gel.

4.8- Réactivité du M-SC-PEG en fonction du pH:

Pour vérifier l'efficacité de la réaction chimique ayant lieu entre les PEG activés et les liposomes, une étude de cette réaction en fonction du pH a été effectuée. Des solutions contenant un excès de M-SC-PEG₂₀₀₀ (50 mol%) de différentes valeurs de pH variant entre 3 et 10, ont été séparément préparées. Chacune des solutions était immédiatement ajoutée, par la suite, à une suspension de DOPE/DOTAP (10 $\mu\text{mol/mL}$) du même pH. La solution finale était agitée et incubée pour 60 minutes à la température ambiante suivie d'une mesure du potentiel ζ .

4.9- Post-modification liposomique par insertion

membranaire:

Le DSPE-PEG (PM: 2000 et 5000) ou PEG₁₇₆₀-monostéarate étaient séparément dissous dans du PBS, et cette solution micellaire préparée était directement ajoutée à la suspension liposomique de DOPE/DOTAP (10 $\mu\text{mol/mL}$). La solution résultante était mélangée au vortex pendant 1 minute. L'excès du polymère était séparé de la solution liposomique par chromatographie de perméation de gel. L'insertion du PEG dans les liposomes pré-formés était effectuée à 4°C, 23°C et 60°C.

4.10- Analyse turbidimétrique du DSPE-PEG et

PEG₁₇₆₀-monostéarate:

La valeur de la CMC (concentration micellaire critique) de différents dérivés de PEG a été déterminée par une série de dilutions d'une solution micellaire initiale (15 mM). La turbidité micellaire était mesurée à la longueur d'onde appropriée par un spectrophotomètre Hitachi U-2000.

4.11- Post-modification liposomique par interaction électrostatique:

Vu la charge très positive à la surface des liposomes et partant de la théorie de l'adsorption électrostatique des molécules de charges contraires, un essai de réaction électrostatique a été effectué en mélangeant un excès (50 μmol) de carboxyméthyl méthoxypoly(éthylène glycol) M-CM-PEG₂₀₀₀ (en provenance de Shearwater polymers Inc.) avec 1 mL d'une suspension liposomique de DOPE/DOTAP. Le dérivé carboxylé de PEG était ajouté directement ou dissous dans une solution de tampon PBS (pH 6 à 9) avant le mélange avec les liposomes. Les solutions finales étaient agitées pour 30 minutes suivi d'une mesure du potentiel ζ .

4.12- Les études du potentiel électrostatique de la membrane:

4.12.1- En variant l'électrolyte:

Une étude brève du potentiel électrostatique de la membrane liposomique a été effectuée en préparant des liposomes formés de DOPE et DOTAP dans un rapport molaire de 1:1 dans des solutions de tampon phosphate contenant 0.85% p/v

de différents électrolytes soient NaCl, Na₂SO₄, NH₄Cl et KCl. L'influence de ces électrolytes sur la charge des liposomes a été vérifiée par des mesures du potentiel ζ sur le Coulter Delsa.

4.12.2- En variant la composition lipidique

Pour savoir si le groupement zwitterionique dans les phospholipides neutres contribue effectivement à la charge globale des vésicules liposomiques, des liposomes formulés à partir de différents composants lipidiques soient: DOPE/DOTAP (25:75) mol%, DMPC/DOTAP (25:75) mol%, chol/DOTAP (25:75) mol% et chol/DMPC (25:75) et (50:50) mol% ont été préparés dans du tampon PBS de pH 7.4, par la méthode conventionnelle de préparation des liposomes.

4.13- Analyse spectrophotométrique de PEG-

liposome:

L'analyse de la quantité de PEG dans les liposomes a été effectuée par la méthode d'analyse des protéines impliquant la coloration des amines secondaires par le Coomassie (97).

Une analyse similaire à cette dernière, impliquant la réaction avec la Ninhydrine, a été également réalisée. Une quantité de

100 μL de l'échantillon à analyser était diluée dans un volume total de 665 μL de tampon et puis mélangée avec 333 μL de la Ninhydrine. La solution résultante était ensuite chauffée à 100°C pour 15 minutes pour assurer la décomposition du réactif et du groupement amino-acide. Une fois la réaction terminée, l'absorbance de la couleur violette intense obtenue est mesurée par un spectrophotomètre (Dynatech MR5000) à une longueur d'onde de 570 nm. La quantité de PE non réagi avec PEG dans l'échantillon peut être connue en se référant à la courbe standard. Pour construire cette dernière, des liposomes formulés de DOPE/DOTAP/DSPE-PEG (2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) ayant 50 mol% de DOTAP et différents mol% de DOPE et DSPE-PEG étaient préparés. Quand on augmentait la quantité de DSPE-PEG dans le mélange (1-10 mol%), on diminuait relativement la quantité du DOPE d'une façon à avoir un total de 50 mol% de ces deux composants. Ainsi, l'absorbance obtenue suite à la mesure spectrophotométrique peut être tracée en fonction de la quantité de DOPE connue dans le mélange.

4.14- Analyse spectroscopique de PEG-liposome:

Le nombre de PEG attachés aux liposomes était mesuré par spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire). Les vésicules liposomiques préparées étaient extraites dans du chloroforme et séchées sur $MgSO_4$. Une fois le chloroforme enlevé par rotaévaporation à une température de $65^\circ C$, la couche mince des lipides était dissoute dans un petit volume ($800 \mu L$) de $CDCl_3$. Les lectures des transformées de Fourier H^1 des spectres RMN étaient effectuées sur un spectromètre Bruker AMX400 de 400 MHz en utilisant une sonde H^1 de 5 mm à $27^\circ C$. Les spectres H^1 étaient obtenus en utilisant une pulsation de 180° à 28 microsecondes avec un délai de 1 seconde, recueillies jusqu'à 32 cycles et balayées sur une fenêtre de 4 KHz. Les déplacements chimiques H^1 étaient normalisés contre la résonance du $CDCl_3$, qui était déterminée dans les expériences de contrôle à $27^\circ C$. La quantité de mPEG dans les liposome-PEG était obtenue en se référant à la courbe standard appropriée. Chaque dérivé de PEG requiert une courbe standard qui lui est propre. Des courbes standards de DOPE/DOTAP/DSPE-PEG₂₀₀₀, DOPE/DOTAP/DSPE-PEG₅₀₀₀ ainsi que DOPE/DOTAP/PEG₁₇₆₀-monostéarate étaient construites suite à l'analyse des spectres obtenus de plusieurs

solutions ayant 5 μmol de DOPE, 5 μmol de DOTAP et une quantité appropriée de PEG (allant du 0.01 à 1 μmol) dissous dans du CDCl_3 .

4.15- Séparation du surplus de PEG de la suspension des liposomes modifiés:

4.15.1- La dialyse:

Une longueur de 15 cm d'un rouleau d'une membrane en cellulose (Spectra/Por molecular porous membrane, tube d'analyse standard, PM: 18000-22000, Spectrum Medical Industries Inc., Los Angeles, Californie) était coupée et placée dans un petit bécher contenant de l'eau chaude (60°C) pour 10 à 15 minutes. Une fois retirée, une pince était attachée à l'une de ses extrémités. À l'aide d'une micropipette, 1 mL de l'échantillon (des liposomes de DOPE/DOTAP mélangés avec 5 μmol de PEG diol) était placé dans le tube par l'autre extrémité qui était fermée par la suite avec une autre pince. Le tube contenant l'échantillon était ensuite introduit dans un bécher de 1L contenant le même PBS que celui de la suspension liposomique. Le solvant, en agitation continue, était changé à toutes les 4 heures pendant 24 heures.

4.15.2- La centrifugation:

La centrifugeuse utilisée est une Sorval Super T21 ayant un rotor fixe de 20 cm de diamètre. La centrifugeuse est équipée d'un régulateur de température qu'on a ajusté à 23°C. La vitesse de rotation était réglée à 5000 rpm (révolutions par minute). Le tube à centrifugation Centricon 10, procuré de Micron Inc. (Beverly, MA), est composé d'un réservoir de l'échantillon (tube supérieur) et d'une cuvette du filtrat (tube inférieur) séparés par une membrane rigide en cellulose semi-perméable pouvant filtrer toute particule de poids moléculaire de 10000 et moins. Avant l'utilisation, le tube était stérilisé avec 2 mL d'éthanol puis lavé avec 2 mL de PBS. Chacun de ces solvants a passé à travers la membrane suite à une centrifugation pour 5 minutes. La filtration se fait en additionnant 1 mL de l'échantillon antérieurement dilué avec 2 mL de PBS, dans le réservoir de l'échantillon. Une fois le tube placé dans la machine, la force centrifuge conduit le solvant avec les solutés d'une masse moléculaire peu élevée pouvant passer à travers la membrane, dans la cuvette à filtrat. Ainsi, les liposomes ayant une taille supérieure à celle des pores de

la membrane sont retenus par celle-ci. La centrifugation était effectuée à 3 reprises de 30 minutes chacune. À chaque reprise, l'échantillon était retiré, agité pour libérer la membrane des vésicules liposomiques collées à la surface puis remis pour le tour suivant.

4.15.3- La chromatographie:

Une colonne chromatographique "écono-column" de 1 x 30 cm, procurée de Bio-Rad (Mississauga, Ontario) était remplie de Sépharose 2B (Pharmacia, Uppsala, Suède). La colonne était premièrement équilibrée par l'écoulement du PBS pour 24 heures dans le but d'éliminer les résidus d'éthanol, l'agent de conservation du Sépharose. La colonne était équilibrée par l'introduction de 1 mL d'une suspension de DOPE/DOTAP préalablement réagie avec un excès de BTC-PEG₂₀₀₀ (50 mol%). Les fractions étaient ensuite récupérées de la colonne et analysées par spectrophotométrie (Hitachi U-2000) à $\lambda = 260$ nm, soit la longueur d'onde qui correspond à l'absorbance du groupement de BTC se trouvant attaché à PEG. Pour être capable d'identifier les fractions correspondant aux chaînes de PEG libres, une étude de l'indice de réfraction était effectuée. Ainsi, 1 mL d'une solution de 140 $\mu\text{mol/mL}$ de PEG₃₄₀₀ diol était

préparé et introduit dans la colonne. L'indice de réfraction des PEG se trouvant dans les fractions récupérées était mesuré par un réfractomètre Abbey. De plus, la vitesse d'élution des petites molécules chimiques, comme le produit obtenu suite à l'hydrolyse de BTC-PEG, était identifiée par l'élution de la fluoresceine. 7.5 μmol de fluoresceine (A&C Chemicals, Montréal, Québec) était alors dissous dans 1 mL d'une solution aqueuse puis introduit dans la colonne. L'absorbance des fractions obtenues donne une indication du volume et du temps de l'élution.

5- RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans cette étude, la modification de la surface des liposomes cationiques par différents dérivés de PEG a été réalisée.

5.1- L'incorporation conventionnelle des PEG:

5.1.1- DSPE-PEG:

Suite à l'incorporation des dérivés pégylés DSPE-PEG₅₀₀₀ et DSPE-PEG₂₀₀₀, on remarque que la neutralisation de la charge à la surface des liposomes est fonction de la longueur de la chaîne polymérique et de la quantité incorporée (Figures 6 et 7). Ceci était bien prévu puisque la chaîne polymérique du PEG est très hydrophile. Cette préférence du PEG pour l'eau fait que la chaîne tend à s'étendre dans le milieu aqueux occupant ainsi une certaine conformation qui lui permet de bouger assez librement à la surface des liposomes. Les chaînes polymériques élargissent ainsi la couche de solvatation en éloignant le plan de coupe de la membrane liposomique donnant une charge apparente neutre.

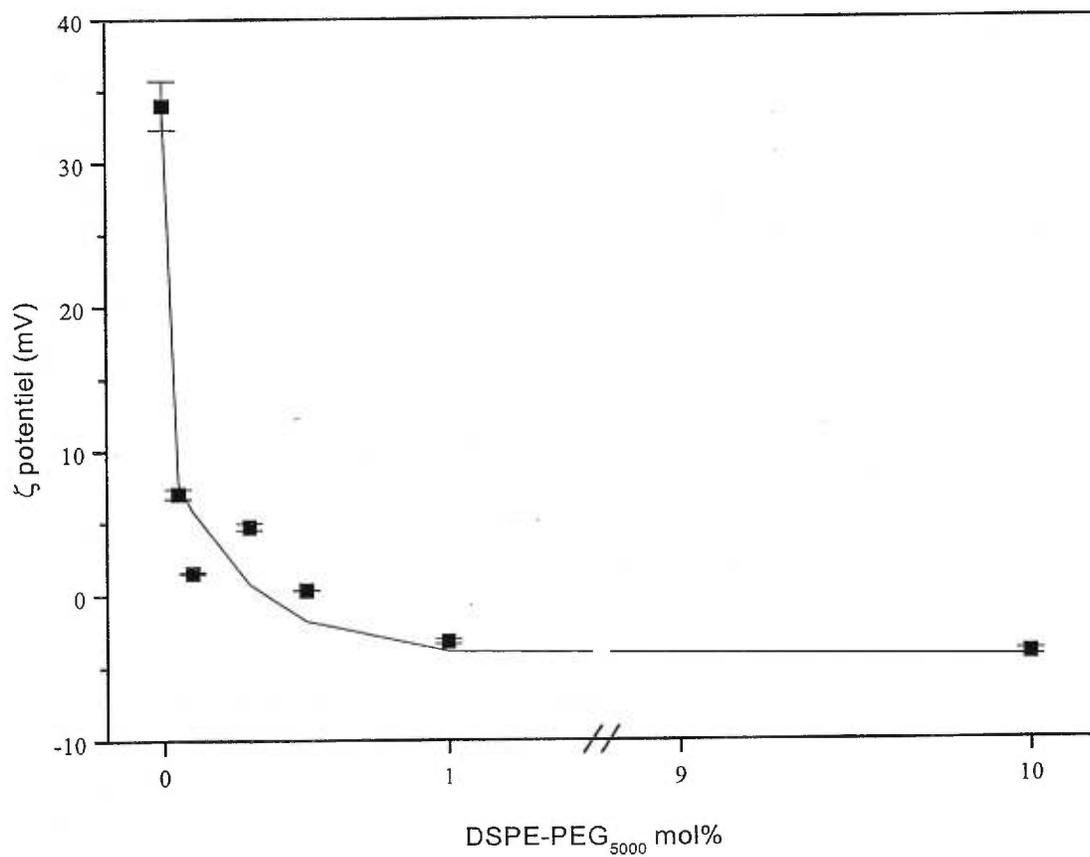


Figure 6: Réduction du potentiel ζ des liposomes cationiques par l'incorporation de DSPE-PEG₅₀₀₀.

Les liposomes utilisés sont des liposomes de taille moyenne de 120 nm. Le potentiel ζ était mesuré immédiatement après la formation des liposomes. Pour chaque échantillon, deux mesures du potentiel ζ étaient prises. Ces résultats sont la moyenne de trois expériences, donc trois formulations liposomiques pour chaque mol % de PEG (erreur moyenn de 10%).

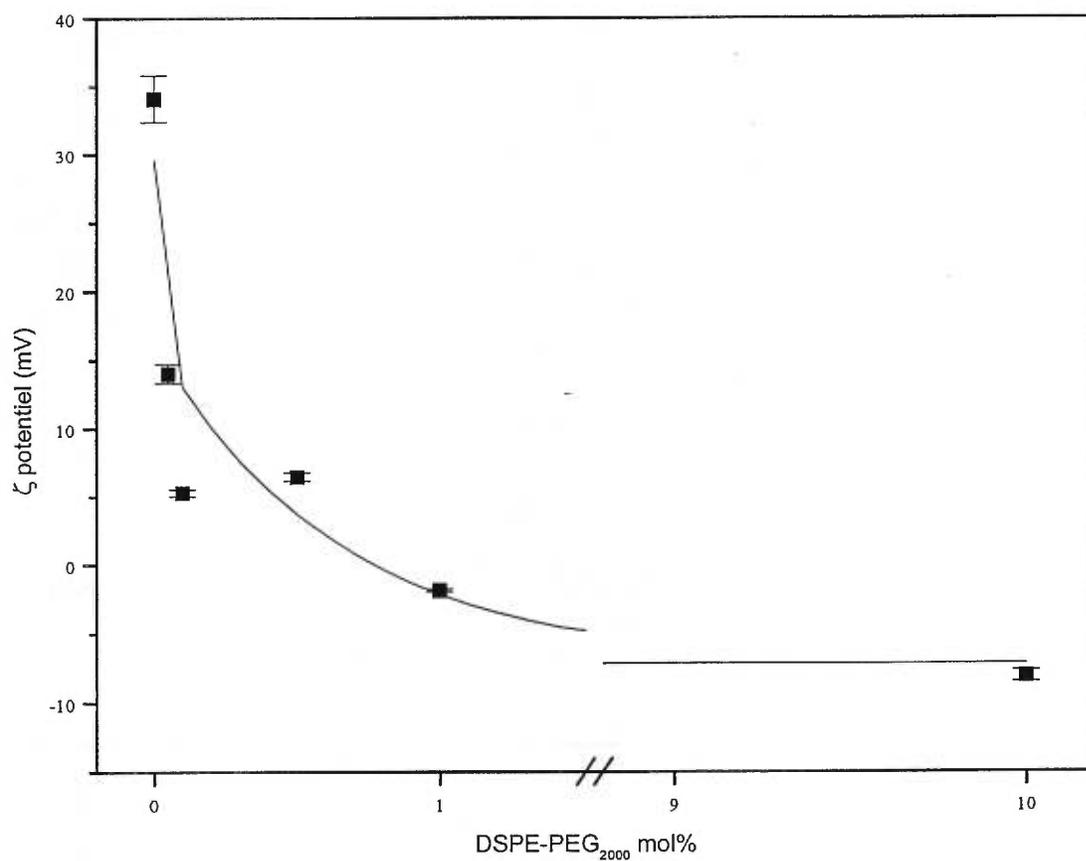


Figure 7: Réduction du potentiel ζ des liposomes cationiques par l'incorporation de DSPE-PEG₂₀₀₀.

Les liposomes utilisés sont des liposomes de taille moyenne de 120 nm. Le potentiel ζ était mesuré immédiatement après la formation des liposomes. Pour chaque échantillon, deux mesures du potentiel ζ étaient prises. Ces résultats sont la moyenne de trois expériences, donc trois formulations liposomiques pour chaque mol % de PEG (erreur moyenne de 10%).

5.1.2- PEG-stéarates:

L'incorporation de différents mol% de PEG-stéarates dans la formulation liposomique a donné une variation du diamètre initial des liposomes (Tableau 2). Les PEG-distéarates sont des copolymères linéaires triblocs où la chaîne de PEG hydrophile est comprise entre deux groupements alkyles hydrophobes situés aux extrémités du polymère. On remarque une augmentation significative du diamètre des liposomes quand les PEG₆₀₀-distéarates et PEG₈₀₀₀-distéarates sont incorporés dans la formulation liposomique. L'une des chaînes alkyles se trouvant aux extrémités de ces dérivés est éventuellement incorporée dans la membrane liposomique alors que l'autre s'associe avec un autre liposome formant, par conséquent, des agrégats. Ce phénomène n'est pas observé quand PEG₁₄₀₈-distéarate est incorporé dans les liposomes. Dans ce dernier cas, les deux chaînes hydrophobes alkyles semblent être fixées dans la même bicouche liposomique, la partie hydrophile de la molécule étant courbée dans le milieu aqueux en formant une boucle à la surface. La faible augmentation de diamètre des liposomes DOPE/DOTAP/PEG₁₄₀₈-distéarate supporte bien notre hypothèse. La mobilité et la flexibilité du groupement (CH₂-

CH₂-O) de PEG, tout comme sa capacité de former des ponts d'hydrogène avec les molécules d'eau sont des facteurs qui influencent grandement le mouvement global moléculaire. Quand le nombre des unités monomériques de PEG est relativement élevé, comme c'est le cas du PEG₆₀₀₀-distéarates, le PEG peut alors s'étendre pour prendre la conformation colloïdale couvrant ainsi la surface liposomique. Les groupements stéarates aux deux extrémités s'échappent du milieu aqueux en se mettant en contact avec les membranes liposomiques voisines formant ainsi des agglomérats. À cause de leurs courtes chaînes hydrophiles, les PEG₆₀₀-distéarates ne peuvent se courber à la surface des liposomes. Dans ce dernier cas, les stéarates s'associent avec plusieurs liposomes formant ainsi des agrégats comme c'est le cas du PEG₆₀₀₀.

Les PEG-monostéarates, d'autre part, qui n'ont qu'une seule partie hydrophobe capable de s'incorporer dans la membrane liposomique, ont pu augmenter le diamètre des liposomes de quelques nm comme nous avons assumé.

Il est important de noter que les profils de réduction de la charge liposomique par l'incorporation des PEG₁₄₀₈-distéarates et PEG₁₇₆₀-monostéarates sont très semblables comme illustré dans la Figure 8. Ces résultats montrent que les PEG bouclés à la surface liposomique sont capables de masquer

complètement la charge de surface des liposomes et que leur potentiel de recouvrement stérique est très comparable à celui des chaînes polymériques du PEG₁₇₆₀-monostéarate étendues dans le milieu aqueux.

À titre de comparaison, on remarque qu'on a besoin de dix fois moins de DSPE-PEG₂₀₀₀ que PEG₁₇₆₀-monostéarate pour neutraliser complètement la charge de surface des liposomes. Ceci est nécessairement dû à la similarité du DSPE aux lipides composants la membrane liposomique. Bien que le groupement stéarate est d'un caractère hydrophobe, il s'incorpore moins aisément dans les liposomes que les dérivés pégylés de DSPE.

PEG-stéarate	Formulation liposomique ¹		
	0.1 mol%	1 mol%	10 mol%
PEG ₆₀₀ -monostéarate	200 ± 32	208 ± 39	205 ± 35
PEG ₆₀₀ -distéarate	4000 ± 80	3735 ± 35	2933 ± 37
PEG ₁₀₀₀ -monostéarate	210 ± 42	220 ± 39	215 ± 50
PEG ₁₄₀₈ -distéarate	212 ± 46	215 ± 41	220 ± 40
PEG ₁₇₆₀ -monostéarate	205 ± 32	238 ± 40	230 ± 42
PEG ₆₀₀₀ -distéarate	3846 ± 44	3585 ± 39	3689 ± 36

¹ Le diamètre initial des liposomes DOPE/DOTAP était de 200 ± 50 nm

Tableau 2: Diamètre des liposomes cationiques formulés avec différentes quantités (mol%) de PEG-stéarates.

Ces résultats résument la moyenne de trois mesures différentes du potentiel ζ de deux échantillons pour chaque formulation liposomique.

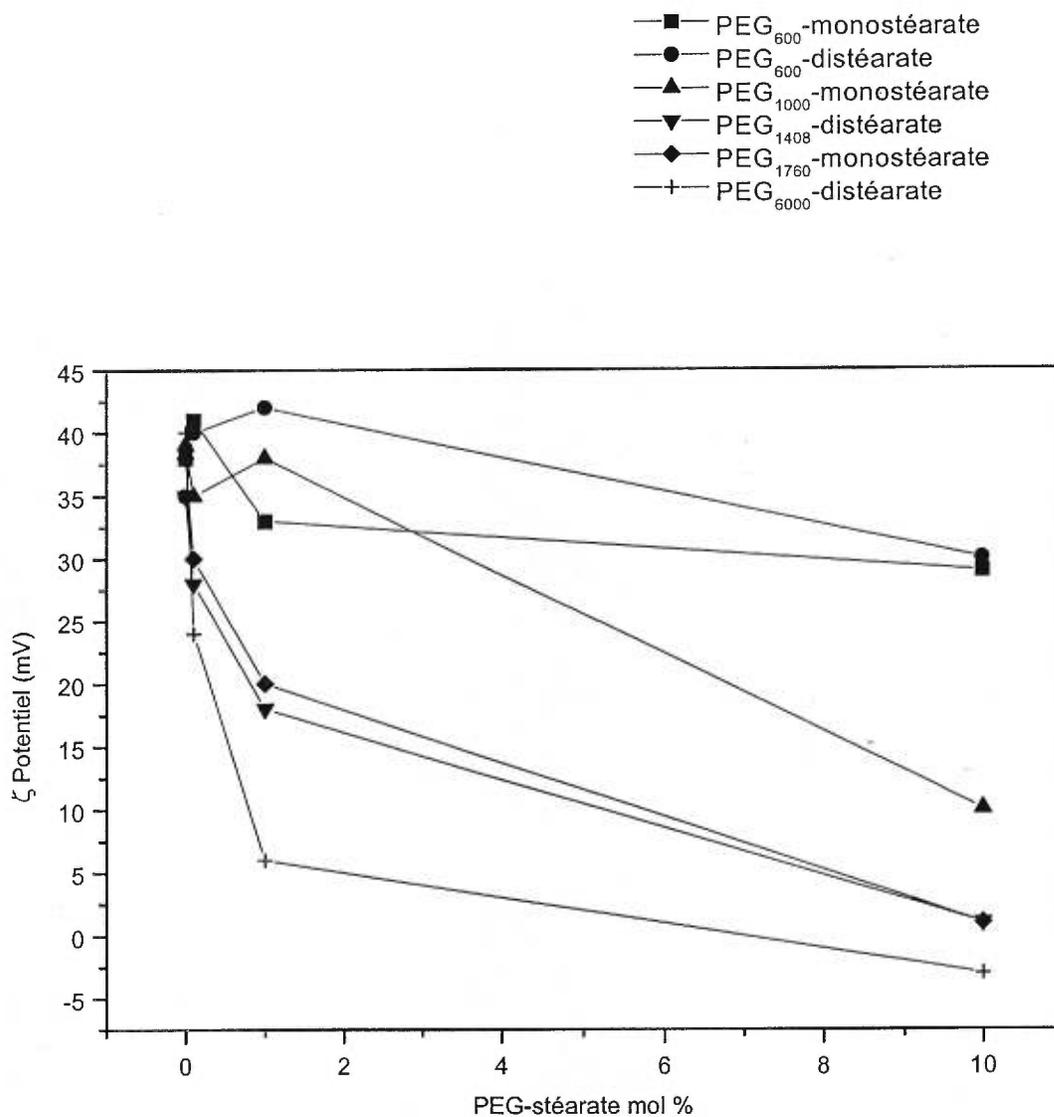


Figure 8: Réduction du potentiel ζ des liposomes cationiques par l'incorporation de différents dérivés de PEG-stéarates.

Les mesures du potentiel ζ étaient effectuées immédiatement après formation des liposomes. La taille moyenne des liposomes est de 200 nm après traitement à l'ultrason. L'erreur moyenne, ne dépassant pas 10 %, ne figure pas dans le graphique pour des raisons de clarté. Ces mesures font la moyenne de trois mesures différentes du potentiel ζ de 2 échantillons différents pour chaque dérivé de PEG.

liposomes par une simple procédure d'une seule étape. Suite à l'incubation à la température ambiante des PEG activés (BTC-PEG, M-SC-PEG et PEG-2-NHS) avec les liposomes préformés, le groupe fonctionnel de PEG se lie au phosphatidyléthanolamine via un lien stable appelé uréthane (carbamate) (Figure 9). La réaction ne requiert qu'une courte période de temps, ne dépassant pas 30 minutes, et s'effectue dans des conditions douces au pH physiologique. Différents dérivés de PEG étaient reconnus pour se conjuguer aux protéines

via des liens uréthanes. La stabilité de ces liens a été bien étudiée et assez documentée dans la littérature (98,99). Ces observations montrent que les uréthanes aliphatiques sont très résistants aux acides, aux bases et à l'hydrolyse enzymatique. Ceci étant, il est raisonnable de présumer que le lien uréthane qui associe PEG à la phosphatidyléthanolamine ne se dégradera pas dans les conditions physiologiques. De plus, il est aussi prouvé que le taux d'aminolyse des PEG activés qui sont sujets de l'expérience, est notamment plus élevé que leur taux d'hydrolyse (100). La surface liposomique est alors saturée par les chaînes de PEG avant qu'un taux d'hydrolyse considérable ait lieu. Les produits d'hydrolyse sont facilement

séparés des liposomes modifiés par la chromatographie d'exclusion décrite plus tard.

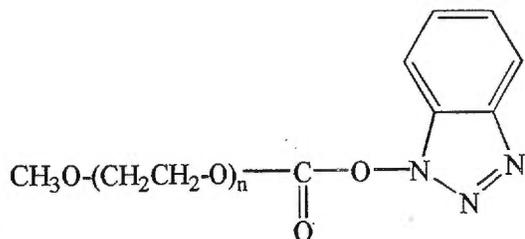
Quand les PEG activés ont réagi avec la suspension des liposomes, une augmentation du diamètre des liposomes est observée (Tableau 3). Cette augmentation du diamètre était prévue et est expliquée par la présence de la couche polymérique à la surface des liposomes. En théorie, cette couche de molécules polymériques est capable d'occuper une certaine distance allant de 5 à 10 nm (72). La relation qui existe entre l'augmentation du diamètre et le pourcentage en moles du PEG ajouté aux liposomes peut être expliquée par la densité de l'enveloppe polymérique à la surface des liposomes.

On remarque dans la Figure 10 que la charge de surface positive est complètement masquée quand 15 mol% de M-SC-PEG₂₀₀₀ et 20 mol% de BTC-PEG₂₀₀₀ sont ajoutés aux liposomes. Étant donné que les chaînes polymériques plus longues revêtent la surface liposomique par une couche plus épaisse, pas plus que 8 mol% et 10 mol% de M-SC-PEG₅₀₀₀ et BTC-PEG₅₀₀₀ respectivement sont nécessaires pour masquer la charge positive à la surface des liposomes.

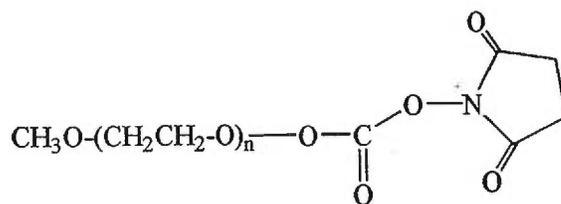
Il est fort improbable qu'il n'y a pas eu une réaction chimique mais plutôt une adsorption des mPEG activés à la surface des liposomes. Ceci est démontré en incubant les liposomes DOPE/DOTAP avec un excès de BTC-PEG₂₀₀₀ hydrolysé (le dérivé de PEG était incubé dans du tampon pour 3 jours à 23°C). La mesure du diamètre et du potentiel ζ des liposomes n'a révélé aucun changement après l'incubation. D'autre part, la réaction du PEG activé avec les liposomes n'a eu lieu que dans des solutions de pH variant entre 7 et 9.

À un pH très acide, aucune réduction du potentiel ζ n'est observée comme illustré dans le Tableau 4. Les résultats obtenus sont en accord parfait avec la réactivité de ce produit à des pH entre 8 et 9 décrite dans la littérature (100).

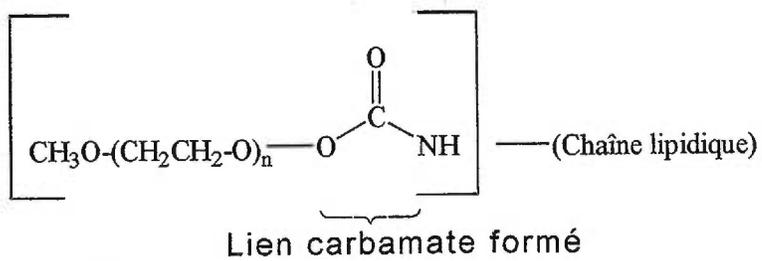
M-BTC-PEG



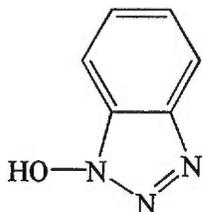
M-SC-PEG



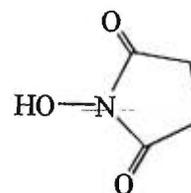
+

Liposome-NH₂

+



N-hydroxybenzotriazole



N-hydroxysuccinimide

Figure 9: Réaction chimique ayant lieu entre DOPE et les dérivés de PEG activé, soit M-SC-PEG et M-BTC-PEG.

Mol% ajouté aux liposomes DOPE/DOTAP*	M-SC-PEG2000 (nm)	M-SC-PEG5000 (nm)	BTC-PEG2000 (nm)	BTC-PEG5000 (nm)
1 mol%	155 ± 42	169 ± 36	153 ± 27	167±29
3 mol%	165 ± 39	156 ± 46	147 ± 45	171±35
5 mol%	169 ± 37	171 ± 28	161 ± 42	170±42
10 mol%	168 ± 45	175 ± 45	162 ± 46	180±45
50 mol%	172 ± 42	190 ± 35	178 ± 53	186±39

* Le diamètre initial des liposomes DOPE/DOTAP était de 150 ± 40 nm. Ces résultats résument la moyenne de trois essais pour chaque mol% de PEG.

Tableau 3: Diamètre des liposomes cationiques après leur réaction avec différentes quantités (mol%) de M-SC-PEG et BTC-PEG.

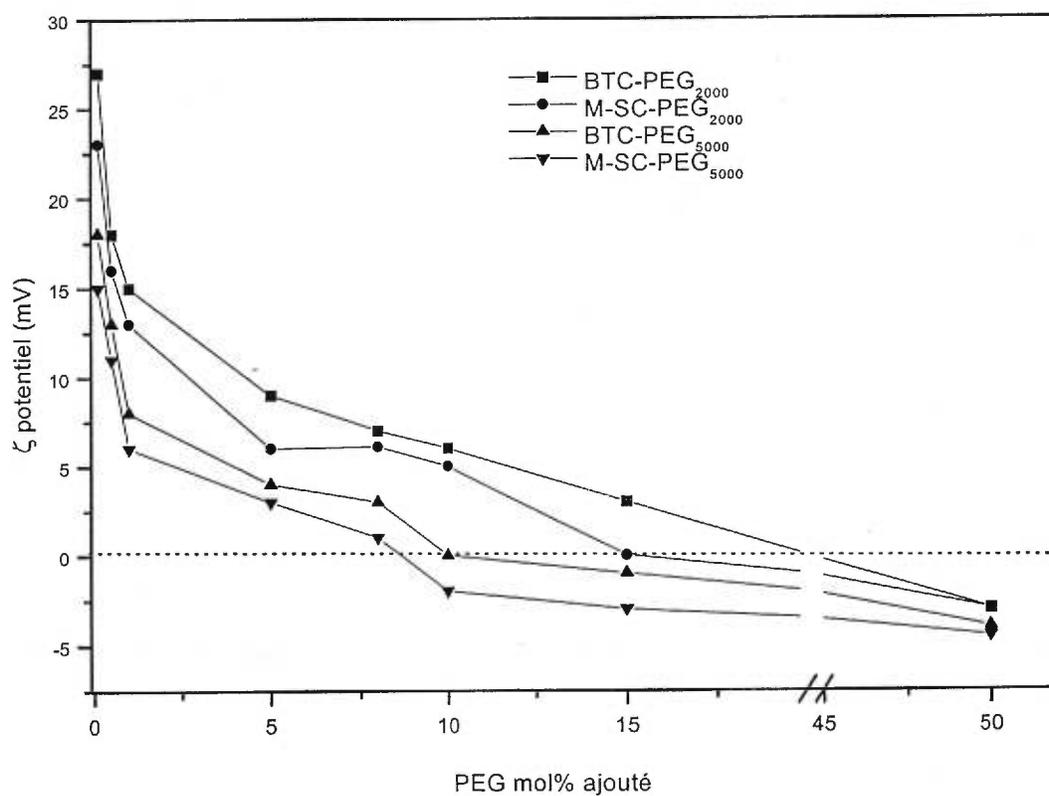


Figure 10: La réduction du potentiel ζ en fonction du mol% de PEG activé ajouté aux liposomes cationiques.

Le diamètre des liposomes est de 150 nm. L'expérience était répétée trois fois et l'écart type ne dépassant pas 10 % ne figure pas sur le graphique pour des raisons de clarté.

pH de la solution	potentiel ζ liposomes DOPE/DOTAP (mV)*	potentiel ζ DOPE/DOTAP/DOPE- PEG ₂₀₀₀ (mV)
3.2	43 ± 6	40 ± 8
5.2	34 ± 8	7 ± 5
6.2	34 ± 9	2 ± 6
7.2	32 ± 6	-2 ± 7
8.2	28 ± 8	-4 ± 10
9.2	25 ± 9	-5 ± 4
10.2	20 ± 7	3 ± 9

* Le potentiel ζ réduit est dû à la déprotonation du groupement amine de DOPE à des pH alcalins. Ces résultats résument la moyenne de trois essais pour chaque échantillon par pH.

Tableau 4: Réactivité du M-SC-PEG₂₀₀₀ avec les liposomes cationiques en fonction du pH.

5.2.2- Post-modification par insertion membranaire:

Uster P.S. et al. ont déjà démontré que les micelles formées de DSPE-PEG₁₉₀₀ peuvent être insérées dans des liposomes neutres et que l'insertion maximale (3 mol%) n'est possible qu'à des températures élevées (65°C) et des temps d'incubation prolongés (2 heures) (87). DSPE-PEG et PEG-monostéarate ont des propriétés physiques et chimiques différentes et pour cela il était décidé de comparer l'effet de l'insertion de ces dérivés de PEG sur le diamètre et le potentiel ζ des liposomes cationiques. On remarque dans le Tableau 5 que l'incubation des DSPE-PEG avec les liposomes a donné une augmentation significative du diamètre des liposomes qui était en corrélation avec la concentration des dérivés de PEG.

L'addition de 1 à 5 mol% de PEG₁₇₆₀-monostéarate semble être suffisante pour masquer la charge à la surface des liposomes. Ceci indique que l'insertion dans la membrane liposomique est très efficace. En comparant le profil de la réduction de la charge de surface des liposomes cationiques à la Figure 11,

DSPE-PEG mol% ajouté	DSPE-PEG ₂₀₀₀ (nm)	DSPE-PEG ₅₀₀₀ (nm)
0	139 ± 58	133 ± 45
0.1	140 ± 51	142 ± 36
1	145 ± 76	142 ± 43
5	152 ± 59	153 ± 62
10	150 ± 68	165 ± 49
50	157 ± 47	165 ± 65

Ces résultats résument la moyenne de trois essais pour chaque mol% de PEG.

Tableau 5: L'augmentation du diamètre des liposomes cationiques après insertion de DSPE-PEG₂₀₀₀ et DSPE-PEG₅₀₀₀.

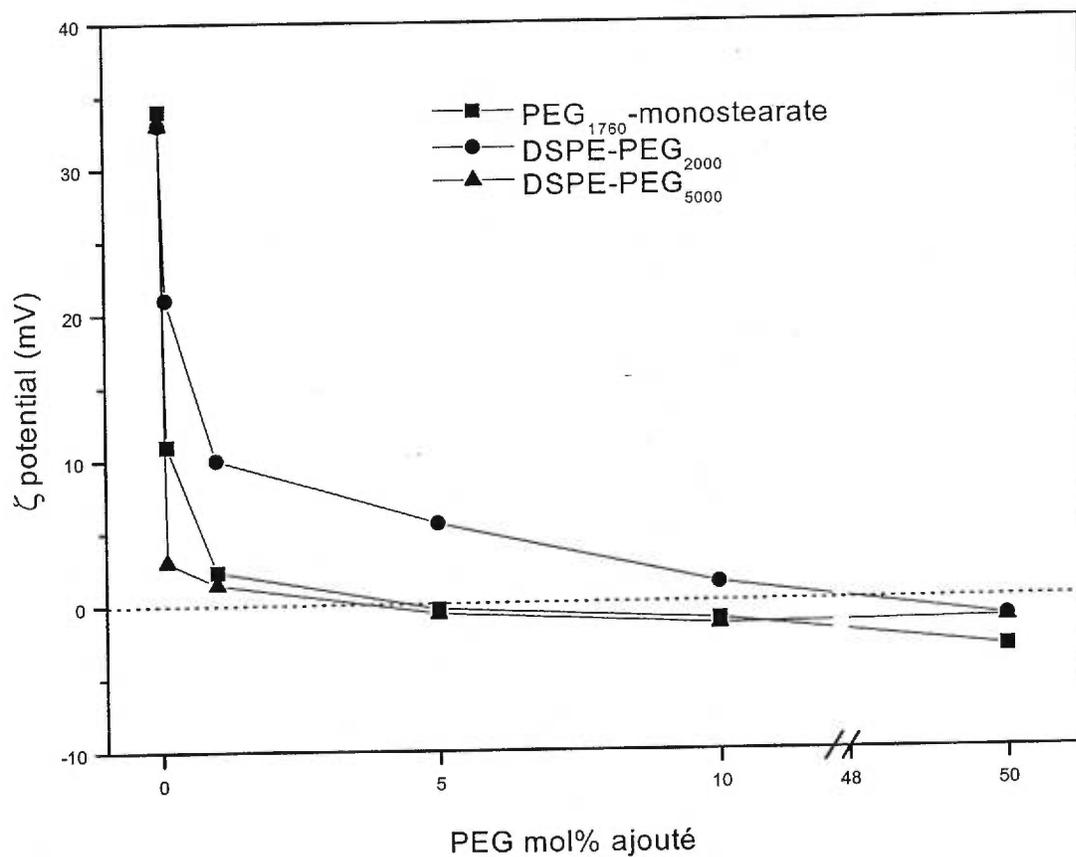


Figure 11: Réduction du potentiel ζ des liposomes cationiques suite à l'incubation de différents mol% de DSPE-PEG et PEG₁₇₆₀-monostéarate à la température ambiante.

Les liposomes avaient un diamètre initial de 140 nm après un traitement aux ultrasons. L'erreur à la moyenne des trois essais ne dépasse pas 10 % et ne figure pas dans le graphique pour des raisons de clarté.

on remarque que le potentiel de PEG₁₇₆₀-monostéarate pour neutraliser la charge superficielle est très comparable à celui de DSPE-PEG₅₀₀₀ ayant une chaîne polymérique beaucoup plus longue, ce qui prouve la meilleure efficacité du dérivé stéarate par rapport à DSPE-PEG.

L'incubation à 4°C ou 60°C ne semble pas influencer la capacité des DSPE-PEG et PEG₁₇₆₀-monostéarate d'interagir avec les liposomes cationiques tel que déterminé par les mesures du diamètre et de la charge de surface des liposomes (Tableaux 6 et 7). La température de transition de la phase liquide à la phase gel-cristalline des liposomes DOPE/DOTAP est de -17°C, il est alors évident qu'il n'y a pas d'avantage à augmenter les températures d'incubation pour l'insertion des dérivés de PEG dans ces liposomes.

La Figure 12 nous révèle la valeur de la CMC de chacun des dérivés de PEG. Il est déjà démontré que la valeur de la CMC est presque indépendante de la longueur de la chaîne polymérique (10), ce qui justifie la similarité de la valeur de la CMC du DSPE-PEG₂₀₀₀ avec celle du DSPE-PEG₅₀₀₀. Toutefois, la concentration critique de DSPE-PEG, soit 10µM, est 10 fois plus faible que celle du PEG₁₇₆₀-monostéarate. Ceci est une

indication de la meilleure solubilité dans l'eau des PEG-stéarates par rapport aux dérivés lipidiques pégylés. Les mouvements plus aisés de ces premiers dans la solution aqueuse peuvent effectivement faciliter l'insertion dans les liposomes pré-formés.

Les résultats illustrés au Tableau 8 montrent que l'insertion du PEG₁₇₆₀-monostéarate est très significative entre 1 et 10 mol%. L'incubation de 50 mol% de ce dérivé avec les liposomes n'a pas augmenté significativement le taux d'insertion. Ces résultats indiquent que le taux d'insertion maximale n'excède pas 10 mol%.

Température d'incubation (°C)	DSPE-PEG2000		DSPE-PEG5000	
	Diamètre (nm)*	potentiel ζ (mV)	Diamètre (nm)	potentiel ζ (mV)
4	158 ± 61	1.26 ± 6.56	157 ± 61	-1.86 ± 3.36
23	165 ± 63	0.13 ± 4.77	168 ± 63	-1.35 ± 5.09
60	169 ± 48	0.06 ± 6.71	171 ± 48	-2.07 ± 4.61

* Les liposomes ont un diamètre initial de 146 ± 62 et un potentiel ζ de 32 ± 6 mV. Ces résultats résument la moyenne de trois essais pour chaque échantillon par température.

Tableau 6: Variation du diamètre et du potentiel ζ des liposomes après l'incubation avec 50 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ et DSPE-PEG₅₀₀₀ à différentes températures.

Température d'incubation (°C)	Diamètre des liposomes* (nm)	potentiel ζ des liposomes (mV)
4	169 \pm 57	-2.45 \pm 6.54
23	172 \pm 37	-2.33 \pm 5.90
60	175 \pm 56	-2.71 \pm 5.59

* Les liposomes de DOPE/DOTAP avait un diamètre initial de 140 \pm 49 nm et un potentiel ζ de 34 \pm 7 mV. Ces résultats résument la moyenne de trois essais pour chaque échantillon par température.

Tableau 7: Variation du diamètre et du potentiel ζ des liposomes après l'incubation avec 50 mol% de PEG₁₇₆₀-monostéarate à différentes températures.

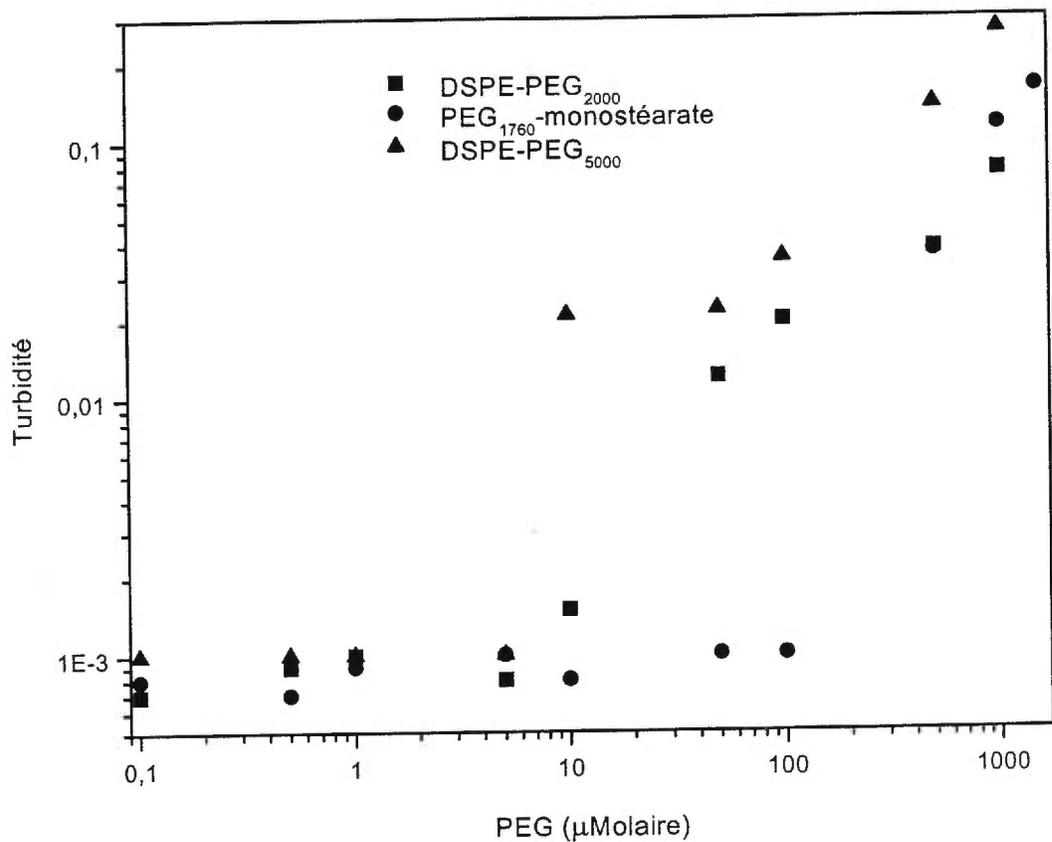


Figure 12: Analyse turbidimétrique de DSPE-PEG₂₀₀₀, DSPE-PEG₅₀₀₀ et PEG₁₇₆₀-monostéarate révélant les CMC de ces dérivés.

Les liposomes étaient suspendus dans un milieu de tampon phosphate de pH de 7.4. Les mesures turbidimétriques des DSPE-PEG étaient effectuées à une longueur d'onde de 240 nm et celles du PEG₁₇₆₀-monostéarate à 200 nm. Les résultats illustrés sont la moyenne de trois essais représentant un intervalle de confiance de 95 %.

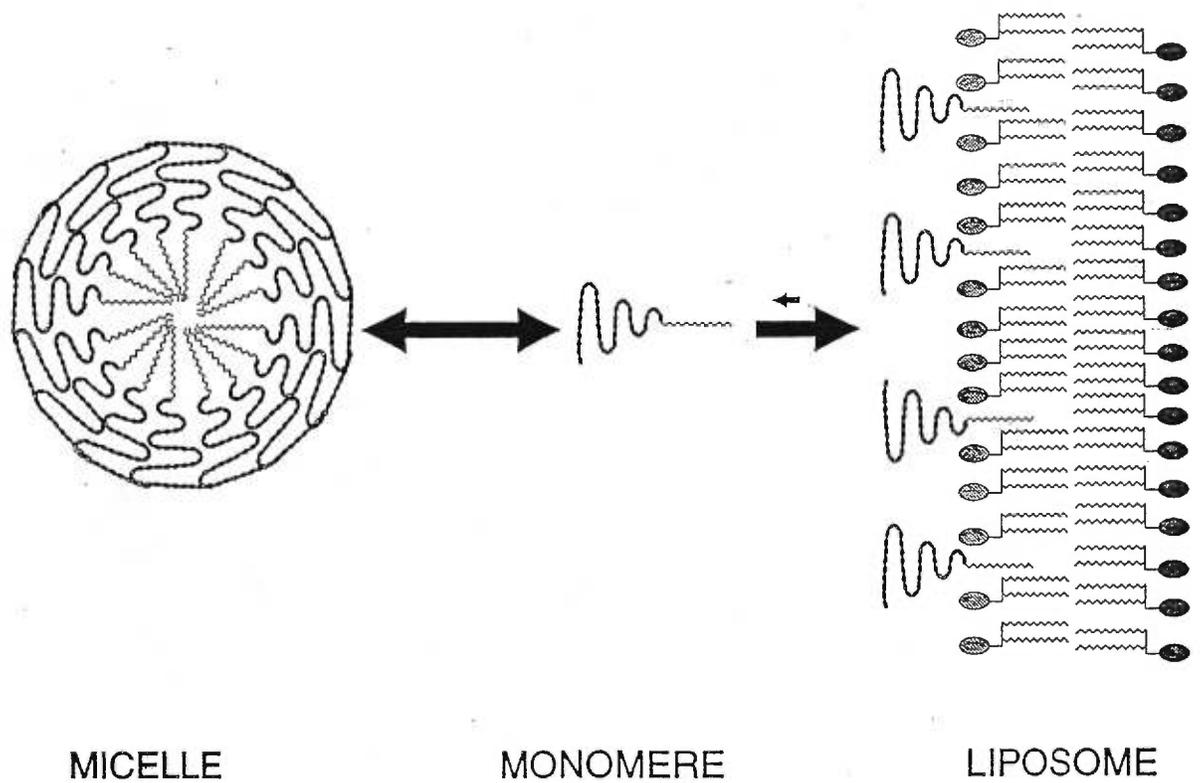


Figure 13: Schéma décrivant l'insertion de PEG₁₇₆₀-monostéarate dans la membrane liposomique.

PEG ₁₇₆₀ -monostéarate mol% ajouté	Diamètre des liposomes (mV)	potentiel ζ des liposomes (mV)
0	140 ± 49	34 ± 5
0.1	145 ± 36	11 ± 7
1	167 ± 31	2.31 ± 2.55
5	162 ± 55	-0.29 ± 7.66
10	176 ± 51	-1.08 ± 4.56
50	173 ± 41	-3.1 ± 5.2

Ces résultats résument la moyenne de trois essais pour chaque mol% de PEG.

Tableau 8: Variation de la taille et de la charge des liposomes cationiques pré-formés après l'ajout de différentes quantités (mol%) de PEG₁₇₆₀-monostéarate.

5.2.3- Post-modification par interaction électrostatique:

L'interaction électrostatique entre le M-CM-PEG et les liposomes n'a pas eu lieu comme prévu. Ceci peut être expliqué par plusieurs facteurs, notamment la complexité du potentiel électrostatique de la membrane des liposomes en solution aqueuse.

Il est à noter que la charge positive à la surface membranaire crée un champ électrique qui cause un rassemblement des charges en solution, surtout ceux qui ont un signe contraire à celui de la charge membranaire. La membrane devient donc encerclée par des ions où la structure du solvant, la concentration ionique ainsi que la distribution de charges associées à la membrane sont tout-à-fait perturbées à l'interface membrane-solution (102). Le potentiel de surface électrostatique qui en résulte régularise les processus qui ont lieu à proximité ou à la surface membranaire. Ainsi, l'adsorption ou la liaison des espèces faiblement chargées à la surface de la membrane est complètement gênée par tous ces facteurs.

De plus, le Tableau 9A montre que la présence des charges zwitterioniques sur les lipides neutres comme DOPE et DMPC (Dimyristoylphosphatidylcholine) affectent également le potentiel ζ à la surface liposomique. On remarque qu'en remplaçant le lipide zwitterionique par le cholestérol, qui est un lipide neutre, dans la formulation liposomique ayant DOTAP comme lipide cationique, la charge des liposomes est moins positive. Le fait que les liposomes chol/DMPC (25:75) mol% ont une charge plus positive que ces mêmes liposomes ayant 50 mol% de DMPC appuie bien cette hypothèse.

D'autre part, l'hydratation de la membrane est un phénomène très important qui a lieu à la surface des liposomes. En fait, la charge positive présentée par DOTAP ainsi que les charges du PE zwitterionique créent un champ dipolaire très élevé encourageant ainsi la liaison avec les molécules d'eau. Ceci contribue, en grande partie, à l'hydrophilie globale de la membrane, donc à une meilleure hydratation de la surface créant ainsi une barrière membranaire.

Il est à noter toutefois que le type d'électrolyte influence peu la surface membranaire comme il est bien indiqué par les études du potentiel ζ illustrées dans le Tableau 9B. Par contre, on remarque que les sels bivalents présents dans la solution

aqueuse ont tendance à s'associer plus facilement à la membrane diminuant ainsi le potentiel de surface. On constate finalement que la stoechiométrie de la liaison des ions solvatés à la membrane est proportionnelle à la valence de l'ion, comme c'est le cas avec Na_2SO_4 . Ces résultats sont en accord avec la littérature et étaient bien attendus (103,104). On en déduit qu'à proximité de la membrane liposomique, la concentration ionique effectivement plus élevée par rapport au volume du liquide, la présence des molécules d'eau liées à la surface ainsi que la présence des champs de répulsion stérique et électrostatique peuvent causer un écran membranaire inhibant l'interaction statique entre le DOTAP des liposomes et les molécules faiblement chargées de PEG.

Tableau A

Composition lipidique	DOPE/DOTAP (25:75) mol%	DMPC/DOTAP (25:75) mol%	chol/DOTAP (25:75) mol%	chol/DMPC (25:75) mol%	chol/DMPC (50:50) mol%
potentiel ζ (mV)	43.7 \pm 8.5	45.5 \pm 5.1	39.5 \pm 10.9	1.54 \pm 9.41	4.1 \pm 7.7

Tableau B

Type d'électrolyte	NaCl	Na ₂ SO ₄	NH ₄ Cl	KCl
potentiel ζ (mV)	35.1 \pm 4.8	29.8 \pm 8.5	36.5 \pm 10.5	35.3 \pm 6.9

Les résultats ci-dessus résument la moyenne de trois essais pour chaque échantillon.

Tableau 9:

(A) Le potentiel ζ de différentes formulations liposomiques.

(B) L'effet de différents électrolytes sur le potentiel ζ des liposomes DOPE/DOTAP.

5.3- Méthodes analytiques:

5.3.1- Analyses spectrophotométriques:

L'analyse de la quantité de PEG se trouvant attachés aux liposomes n'était pas possible par l'intermédiaire du Coomassie et de la Ninhydrine. Bien que le Coomassie réagisse très bien avec les amines secondaires notamment avec PE-PEG, on a remarqué toutefois, qu'il réagit d'une façon aussi importante suite à l'incubation avec les liposomes DOPE/DOTAP (Figure 14). Ceci est expliqué par la présence d'un groupement amine quaternaire sur le DOTAP, qui a pu également réagir avec le Coomassie très facilement. Quand les micelles de DOTAP seules étaient incubées avec le Coomassie, l'absorbance obtenue était plus petite que celle des liposomes DOPE/DOTAP. Ceci peut être expliqué par la tête hydrophile du DOPE qui est plus longue que celle du DOTAP et qui masque en quelque sorte l'amine quaternaire de ce dernier. D'autre part, l'absorbance mesurée après réaction du Coomassie avec les liposomes DOPE/DOTAP seuls et celle obtenue avec les micelles PE-PEG seules ne sont pas additives à l'absorbance obtenue avec DOPE/DOTAP/PE-PEG. Dans ce dernier cas, l'encombrement stérique causé par le

mouvement des chaînes polymériques à la surface des liposomes peut être responsable de la diminution de la coloration qui résulte suite à la réaction. Ce facteur ainsi que la réaction inattendue avec DOTAP fait qu'il est impossible d'utiliser le Coomassie comme méthode analytique pour la quantification de la concentration de PE-PEG dans les liposomes cationiques.

De même, la méthode colorimétrique impliquant la réaction des liposomes avec la Ninhydrine a été jugée inutile. La Ninhydrine réagit bien avec le groupement amine de DOPE. Par contre, l'absorbance qui résulte de cette réaction peut être mesurée jusqu'à une concentration maximale de 2 $\mu\text{mol/mL}$ de PE (Figure 15). Ainsi, la coloration qui résulte de cette réaction avec les liposomes DOPE/DOTAP/PE-PEG, de concentration habituelle de 10 $\mu\text{mol/mL}$, est normalement très intense et ne peut être mesurée par la spectrophotométrie sauf après dilution. De plus, cette méthode n'est pas précise pour l'analyse de la quantité de PEG attachés aux liposomes puisqu'elle n'est pas directe. Une fois les liposomes formés et modifiés par l'inclusion des chaînes de PEG, l'absorbance mesurée ne révèle la quantité de PEG liés aux liposomes qu'après soustraction de la valeur de PE de la référence

obtenue de la courbe standard. La quantité de PEG n'excède normalement pas 10 mol%, il s'agit donc de soustraire une valeur d'une différence maximale de 10%, une différence très minime pour être distinguée.

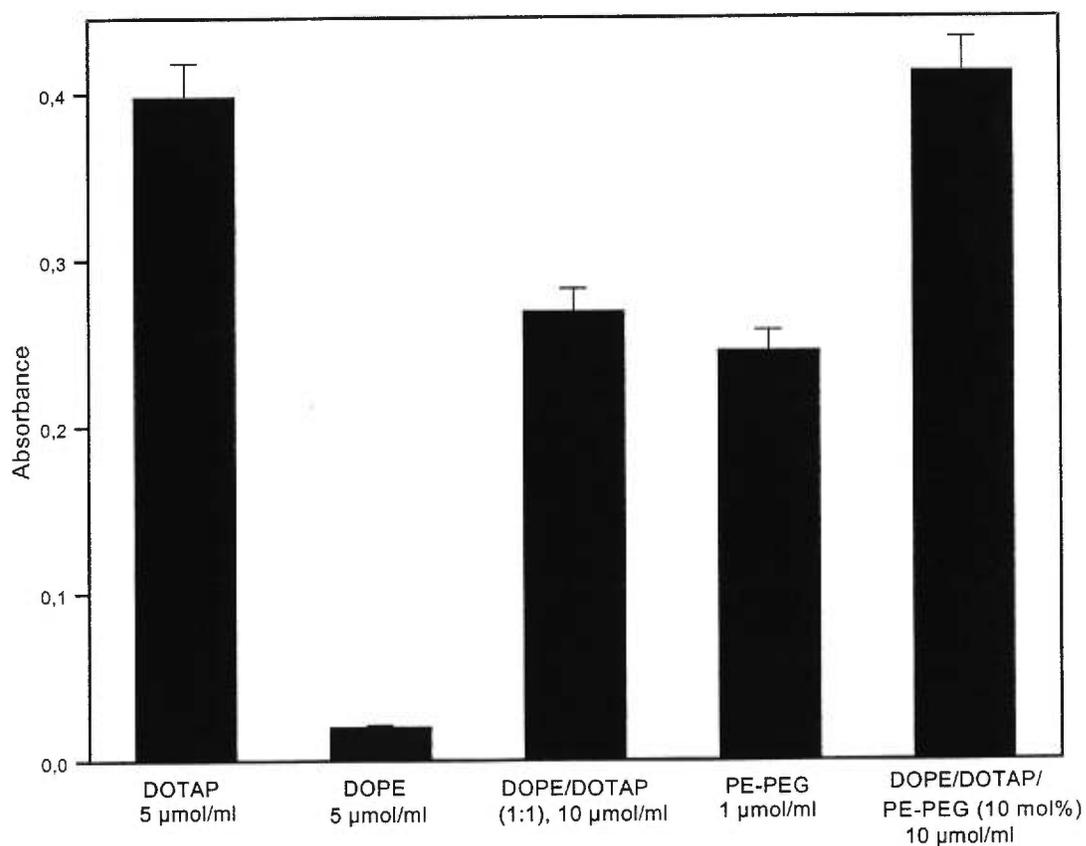


Figure 14: Réactivité du Coomassie avec différentes formulations liposomiques ou micellaires.

Les absorbances étaient mesurées sur un Dynatech MR5000 à 595 nm, 10 à 15 minutes après la réaction des liposomes avec le Coomassie. Les résultats illustrés sont la moyenne de 3 essais représentant un intervalle de confiance de 90%.

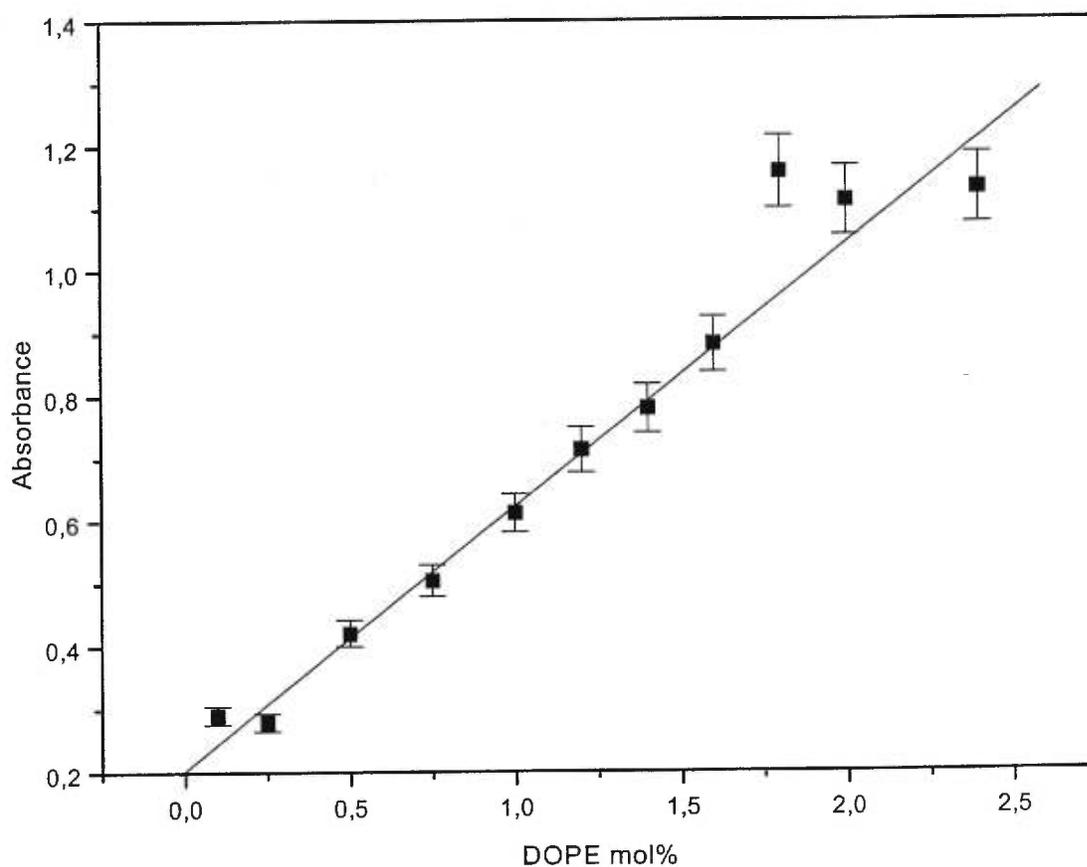


Figure 15: Réactivité du DOPE avec la Ninhydrine.

Après avoir fait réagir la suspension liposomique avec la Ninhydrine, la solution finale était laissée à refroidir jusqu'à atteindre la température ambiante, une période ne dépassant pas 15 minutes, avant la lecture de l'absorbance. Les mesures spectrophotométriques étaient ensuite effectuées à une longueur d'onde de 575 nm sur Dynatech MR5000. Les résultats illustrés sont la moyenne de 3 essais représentant un intervalle de confiance de 90 %.

5.3.2- Séparation des PEG libres de la solution liposome-

PEG:

Certaines méthodes d'analyse requièrent une séparation complète du surplus des chaînes polymériques se trouvant dans la solution liposomique. Pour ce faire, on a essayé les méthodes conventionnelles connues soient la dialyse, la centrifugation et la chromatographie.

5.3.2.1- La dialyse:

Il était impossible de séparer complètement les chaînes polymériques de PEG de la suspension liposomique par dialyse. L'analyse quantitative par la spectroscopie de ^1H RMN décrite plus tard, a révélé une certaine quantité de PEG non diffusée à travers la membrane semi-perméable. Les résidus de PEG non diffusés peuvent facilement fausser les résultats. De plus, cette méthode n'est pas pratique vu le temps très long qu'elle requiert.

5.3.2.2- La centrifugation:

D'une façon parallèle, en centrifugeant l'échantillon liposomique, il n'était pas possible de filtrer les chaînes

polymériques principalement parce que les liposomes bloquaient la membrane du tube à centrifugation. Il était nécessaire d'arrêter le processus de centrifugation toutes les 30 minutes pour pouvoir libérer la membrane des vésicules liposomiques. De plus, un temps total de 90 minutes n'était pas suffisant pour éliminer les polymères n'ayant pas réagi de l'échantillon liposomique et un temps plus long cause la déformation du tube utilisé d'où les inconvénients de cette méthode.

5.3.2.3- La chromatographie:

Enfin, la chromatographie de perméation de gel se révèle la méthode la plus efficace pour une séparation complète des PEG. Suite à l'introduction d'un échantillon de DOPE/DOTAP ayant préalablement réagi avec BTC-PEG, un profil de séparation était obtenu en analysant les fractions collectées de la colonne (Figure 16). Les liposomes visibles à l'oeil nu étaient révélés par la diffraction de la lumière UV spectrophotométrique. Comme on peut le voir dans la Figure 16, l'absorbance de cette diffraction lumineuse est faible par rapport à celle des produits ayant BTC. Puisque les liposomes ont une taille très élevée, il était bien attendu de les récupérer

en premier après passage dans la colonne. Ainsi, les liposomes et les liposome-PEG sont séparés du reste de la solution dans un temps ne dépassant pas 10 minutes. Dans le but de comprendre le profil de la séparation par la chromatographie illustré à la Figure 16, une quantité d'une solution de PEG pur était introduite dans la colonne et l'indice de réfraction (RI) des fractions collectées était mesuré (Figure 17). On remarque ainsi, que les chaînes polymériques sont plus retardées que les liposomes dans la colonne à cause de leurs plus faibles tailles et ne peuvent être récupérées qu'après l'élution de 20 mL de l'éluent. En comparant les résultats obtenus au profil de séparation des liposomes de la Figure 16, on peut conclure que l'absorption élevée à 20 mL récupéré correspond bien à la quantité de PEG et de BTC-PEG et qui n'ont pas réagi avec les liposomes. Par ailleurs, BTC-PEG est un dérivé qui peut être facilement hydrolysé. Le produit de l'hydrolyse (BTC) est une molécule chimique de très petite taille qui peut aisément pénétrer dans les pores du gel de la phase stationnaire et est donc éluée en dernier.

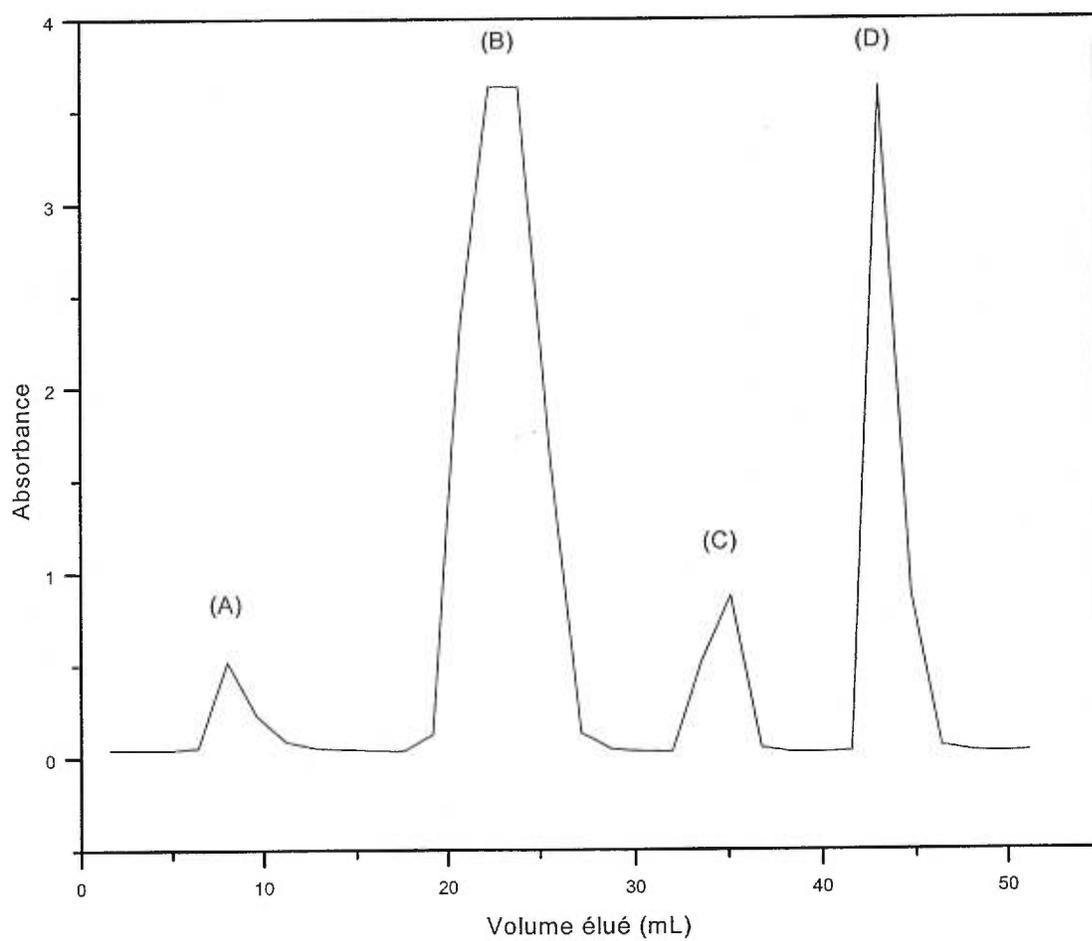


Figure 16: Profil d'éluion des liposomes DOPE/DOTAP après leur réaction avec 50 mol% de BTC-PEG₂₀₀₀.
A: Liposomes
B: Liposome-PEG
C: PEG et BTC-PEG
D: BTC

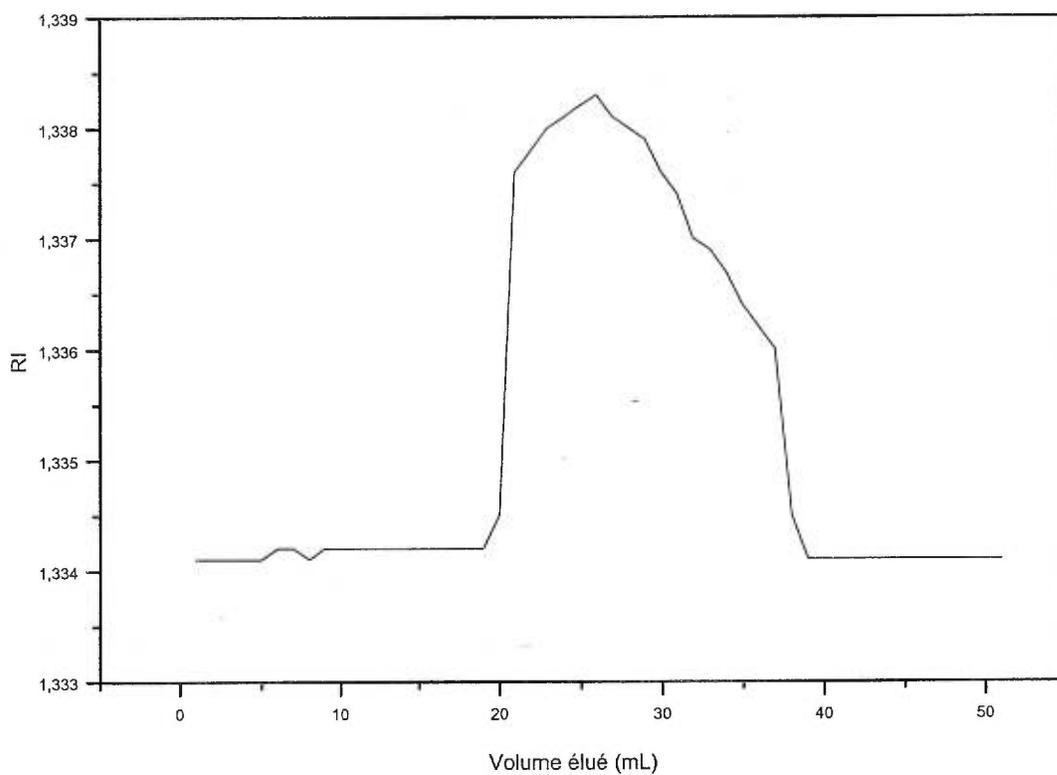


Figure 17: Profil d'élution de PEG₃₄₀₀ diol déterminé par la mesure de l'indice de réfraction. Le solvant d'élution est le tampon phosphate à pH physiologique.

5.3.3- Analyse spectroscopique RMN:

Suite à la séparation des liposomes modifiés par la chromatographie, la quantité de PEG attachés aux liposomes est analysée par l'étude des spectres de ^1H RMN de l'échantillon.

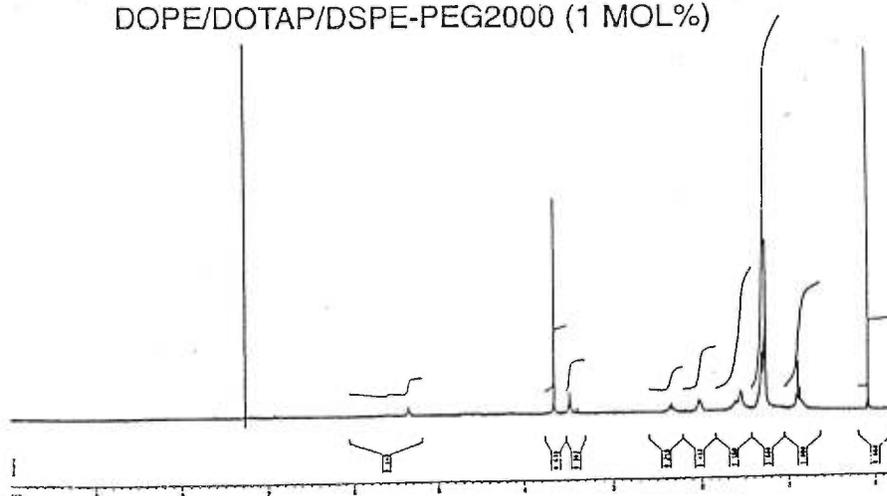
Le monomère qui se répète dans la chaîne polymérique de PEG est le $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})$ donnant un simple signal à $\delta=3.70$ ppm sur le spectre de RMN. La chaîne hydrophobique des liposomes donne également un signal significatif à $\delta=1.32$ ppm. En comparant les spectres des solutions liposomiques contenant différentes concentrations de PE-PEG₂₀₀₀ (Figure 18), on remarque une diminution de l'intégrité du signal de PEG quand la concentration de ce dernier est plus petite. Ainsi, en calculant le rapport des deux pics ($\delta = 3.70$ ppm / $\delta = 1.32$ ppm) on a obtenu une relation linéaire en traçant le graphique de la concentration de PEG dans les liposomes en fonction du rapport des pics (Figure 19). De la même façon, une courbe de standard était construite en utilisant la même technique pour l'analyse de la quantité de PE-PEG₅₀₀₀ et PEG₁₇₆₀-monostéarate greffés aux liposomes. Cette technique est beaucoup plus précise que la méthode d'analyse

conventionnelle impliquant la colorimétrie décrite auparavant. L'analyse par RMN peut être utilisée pour toute composition lipidique formant des liposomes ainsi que pour tout dérivé de PEG qu'il soit incorporé, attaché par une liaison covalente ou inséré dans les liposomes.

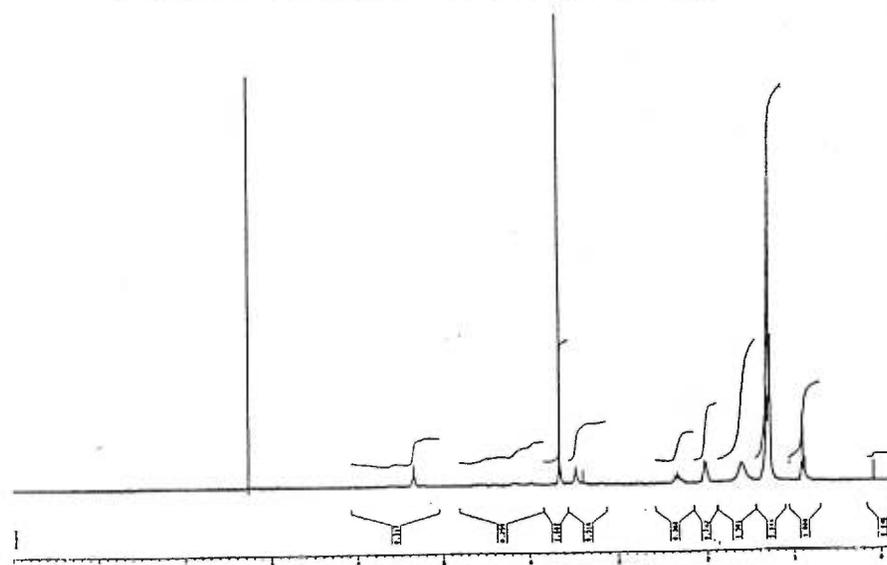
Figure 18: Spectres de ^1H RMN des liposomes DOPE/DOTAP ayant différents mol% de DSPE-PE₂₀₀₀, DSPE-PEG₅₀₀₀ et PEG₁₇₆₀-monostéarate.

Les spectres étaient effectués sur une fréquence de 400 MHz sur une pulsation de 180° à 28 μs , recueillis jusqu'à 32 cycles et balayés sur une fenêtre de 4 KHz. Les déplacements chimiques étaient normalisés contre la résonance du CDCl_3 .

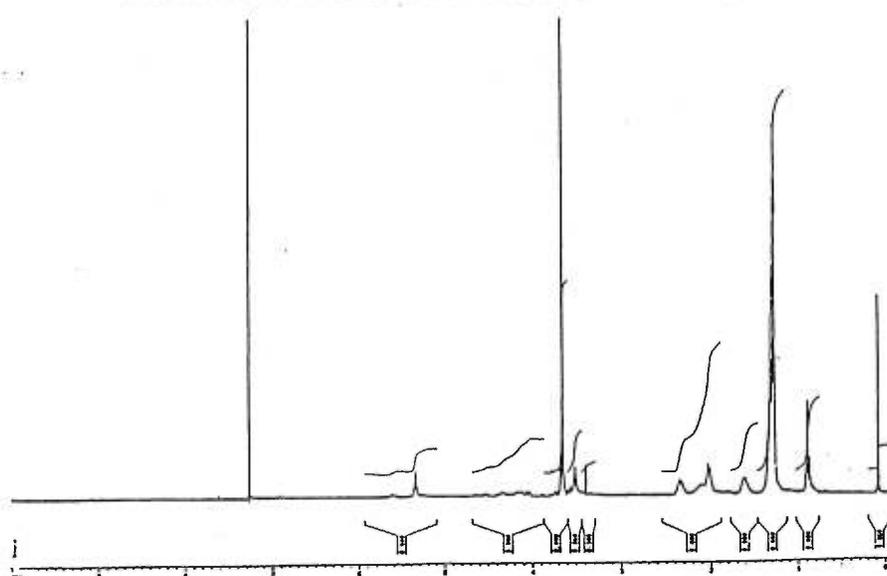
DOPE/DOTAP/DSPE-PEG2000 (1 MOL%)



DOPE/DOTAP/DSPE-PEG2000 (5 MOL%)



DOPE/DOTAP/DSPE-PEG2000 (10 MOL%).



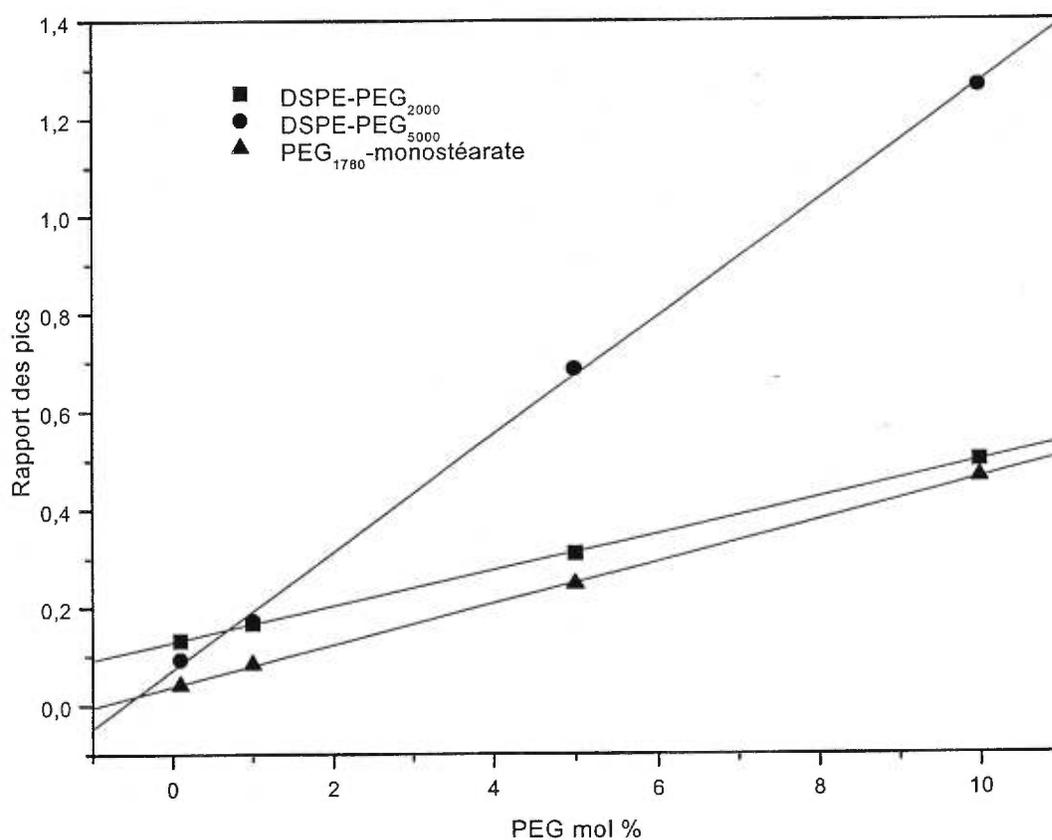


Figure 19: Courbes standards décrivant la relation entre la concentration de DSPE-PEG₂₀₀₀, DSPE-PEG₅₀₀₀ et PEG₁₇₈₀-monostéarate dans les liposomes DOPE/DOTAP et les rapport des pics telle que analysée par les spectres de H¹RMN.

Chaque analyse était répétée trois fois. L'erreur ne dépassant pas 10 % ne figure pas sur le graphique pour des raisons de clarté.

Pour déterminer le nombre de BTC-PEG et M-SC-PEG greffés à la surface liposomique, les liposomes étaient analysés par la méthode d'analyse ^1H RMN. Jusqu'à 4.1 mol% de M-SC-PEG₂₀₀₀ a réagi avec les liposomes cationiques quand un excès (50 mol%) du dérivé de PEG était incubé avec la suspension liposomique. Dans les mêmes conditions, pas plus que 3.2 mol% étaient greffés sur les liposomes suite à l'incubation avec BTC-PEG₂₀₀₀. Ce dernier a une activité moins élevée et un temps de demi-vie plus court que M-SC-PEG (Tableau 10). Il était impossible de greffer plus que 0.7 mol% de M-SC-PEG₅₀₀₀ à la surface des liposomes à cause de la barrière stérique causée par les chaînes polymériques plus longues. En parallèle, la quantité maximale de BTC-PEG₅₀₀₀ qui peut être greffée n'a pas excédé 0.5 mol%. Pour pouvoir atteindre un niveau relativement élevé de stabilité dans la circulation, 2 à 4 mol% de PEG₂₀₀₀ et près de 1 mol% de PEG₅₀₀₀ attachés aux liposomes sont requis (105,106). La présente étude montre que la réaction des liposomes pré-formés avec le BTC-PEG et le M-SC-PEG mène à un niveau de greffe assez suffisant pour promouvoir la stabilité des liposomes dans la circulation. De la même façon, le taux d'insertion de PEG₁₇₆₀-monostéarate a été évalué par l'analyse spectroscopique de ^1H RMN

également. On remarque dans le Tableau 11 que le taux d'insertion maximale n'excède pas 10 mol%.

On constate que l'insertion de DSPE-PEG₂₀₀₀ et DSPE-PEG₅₀₀₀ est significativement moins efficace que celle du dérivé PEG-monostéarate (Tableau 11). Ce dernier est un co-polymère dibloc plus soluble dans l'eau et ayant une seule chaîne alkyle qui semble être capable de s'insérer plus facilement dans la bicouche liposomique (Figure 13). Par contre, vu la largeur des deux chaînes hydrophobes du DSPE-PEG, l'insertion de ce dernier est possiblement gênée par l'interaction stérique avec les autres groupements déjà insérés dans la membrane liposomique. Il est enfin intéressant de mentionner que l'efficacité de l'insertion de PEG₁₇₆₀-monostéarate a pu atteindre un taux de 100%, un niveau de greffe jamais précédemment obtenu (81,87,94).

Dérivé de PEG ajouté (mol%)	Mol% greffé			
	M-SC-PEG2000	M-SC-PEG5000	BTC-PEG2000	BTC-PEG5000
1	0.2	N.D.*	0.1	N.D.
5	1.8	N.D.	1.2	N.D.
10	2.6	0.5	2.5	0.3
50	4.1	0.7	3.2	0.5

* N.D., non détecté. On était incapable de détecter le nombre de PEG greffé à la surface des liposomes à cause du faible rapport des intensités des pics des spectres de RMN. Ces résultats résument la moyenne de trois essais représentant un intervalle de confiance de 98%.

Tableau 10: Détermination de la quantité (mol%) de PEG activés attachés aux liposomes par la méthode spectroscopique de ^1H RMN.

PEG mol% ajouté	Mol% inséré (% d'efficacité)		
	PEG ₁₇₆₀ - monostéarate	DSPE-PEG ₂₀₀₀	DSPE- PEG ₅₀₀₀
1	1 (100)	N.D *	0.1 (10)
5	4.3 (86)	1.5 (30)	0.9 (18)
10	9.5 (95)	5.2 (52)	4.0 (40)
50	9.0 (90)	6.1 (61)	4.3 (43)

*N.D., non détecté. Le nombre de DSPE-PEG₂₀₀₀ inséré était plus bas que la limite de détection. (Pourcentage d'efficacité est indiqué entre parenthèses). Ces résultats résument la moyenne de trois essais représentant un intervalle de confiance de 98%.

Tableau 11: Détermination de la quantité (mol%) de PEG₁₇₆₀-monostéarate, DSPE-PEG₂₀₀₀ et DSPE-PEG₅₀₀₀ insérés dans la membrane des liposomes cationiques tels qu'indiqués par la spectroscopie H¹RMN.

6- Conclusion

Durant le projet de la maîtrise il a été possible de réaliser plusieurs méthodes d'attachement de différents dérivés de PEG sur les liposomes DOPE/DOTAP positivement chargés.

Le but de la présente recherche est de pouvoir modifier la surface des liposomes chargés positivement suite à leur formation. La méthode conventionnelle de la pégylation des liposomes avec des lipide-PEG a été essayée et comparée avec les deux nouvelles méthodes développées dans notre laboratoire, soient la réaction chimique et l'insertion.

Les résultats présentés ont montré que la pégylation des liposomes cationiques pré-formés est possible en faisant réagir les liposomes avec des PEG-activés comme M-SC-PEG et BTC-PEG. Ces dérivés se lient facilement aux liposomes suite à une simple incubation d'une courte période de temps ne dépassant pas 30 minutes. Un lien carbamate (uréthane) résulte de cette réaction qui s'effectue à la température ambiante au pH physiologique. Nos expériences ont montré

que la réduction du potentiel ζ dépend grandement de la concentration des PEG-activés utilisée. Ainsi, de 10 à 50 mol % étaient nécessaires pour neutraliser complètement la charge superficielle des liposomes. Cette neutralisation est directement proportionnelle à la longueur de la chaîne polymérique.

L'insertion est l'autre méthode de pégylation de liposomes qui est beaucoup plus économique et plus rapide que la réaction chimique. Les expériences effectuées ont montré que les PEG₁₇₆₀-monostéarates sont les candidats par excellence utilisés pour une insertion significative. L'addition aux liposomes de 1 à 5 mol % de PEG₁₇₆₀-monostéarate, à la température ambiante et au pH physiologique, est suffisante pour masquer la charge positive à la surface des liposomes.

Il n'était pas possible de mesurer la quantité des chaînes de PEG attachées aux liposomes par les méthodes colorimétriques. Le Coomassie qui se conjugue facilement avec les amines secondaires, comme les liens carbamates, a réagi également d'une façon aussi importante avec le lipide positif DOTAP. Par conséquent, il était impossible d'utiliser le Coomassie pour trouver la quantité de PE-PEG attachés aux

liposomes. D'autre part, ce réactif ne peut en aucun cas détecter la présence de PEG-stéarate dans la formulation des liposomes modifiés. Outre le Coomassie, la Ninhydrine qui est une méthode d'analyse indirecte détectant les liens α -aminés, comme ceux qu'on trouve dans les PE dans les liposomes, s'est révélée être inutile pour la détermination de la quantité de PEG dans les PEG-liposomes parce qu'elle n'est pas assez sensible pour pouvoir détecter la modification d'une petite quantité soit 1-10 mol % des PE-PEG dans les liposomes.

Une méthode d'analyse précise et directe impliquant la spectroscopie RMN a alors été développée dans notre laboratoire. Cette méthode requiert pourtant une séparation complète du surplus des chaînes polymériques se trouvant dans la solution liposomique.

La chromatographie de perméation de gel a permis la séparation complète des liposome-PEG dans un temps ne dépassant pas 10 minutes. Le fait que les liposomes et les liposome-PEG ont une taille moyenne énormément plus élevée que les polymères seuls, a permis de les récupérer de la colonne bien avant toute autre molécule se trouvant dans la solution.

Suite à la séparation des liposomes modifiés par la chromatographie, la quantité de PEG attachés aux liposomes a été analysée par l'étude des spectres de ^1H RMN des échantillons obtenus. Le rapport entre le signal donné par les chaînes hydrophobes des lipides à $\delta=1.32$ ppm et celui du monomère ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$) à $\delta= 3.70$ sur le spectre, a permis l'obtention d'une relation linéaire en traçant le graphique de la concentration de PEG dans les liposomes en fonction du rapport des pics. Différentes courbes standards ont été construites pour l'analyse des différents PEG. Cette méthode peut être utilisée pour l'analyse quantitative de toute composition lipidique formant des liposomes et pour tout dérivé de PEG.

Suite à l'analyse par RMN de la réaction chimique des liposomes avec les M-SC-PEG et les BTC-PEG, on a pu conclure que 3-4 mol % de PEG_{2000} et 0.5-0.7 mol % de PEG_{5000} sont nécessaires pour neutraliser complètement la charge positive des liposomes DOPE/DOTAP.

Une efficacité d'insertion proche de 100% était observée, suite à l'analyse par RMN, en incubant le PEG_{1760} -monostéarate avec les liposomes. On remarque que l'incubation des mêmes

liposomes avec DSPE-PEG dans les mêmes conditions a donné une insertion significativement moins élevée.

Finalement, on conclut que la pégylation des liposomes par l'insertion directe de PEG₁₇₆₀-monostéarate est la plus avantageuse vu le temps de réaction très court, la grande efficacité de l'insertion et son coût moins cher par rapport à d'autre dérivés de PEG amphiphiles utilisés pour la pégylation des liposomes.

Références

- [1] Bangham A.D. (1963), *Advances Lipid Res.* 1, 65-104.
- [2] Wolff B., Rohdewald P. (1984), *J. Microencap.* 1(13), 229-240.
- [3] Gregoriadis G. (Ed.) (1988), *Liposomes as Drug Carriers.* John Wiley and Sons, Avon.
- [4] Tseng YL., Hong RL., Tao MH., Chang FH. (1991), *Intern. J. Cancer* 80 (5), 723-730.
- [5] Blumenthal R., Ralston E., Dragsten P., Leserman L.D., Weinstein J.N. (1982), *Membr. Biochem.* 4, 283-303.
- [6] Huang L., Ozata K., Pagano R.E. (1978), *Membr. Biochem.* 1, 1-7.
- [7] Boerman O.C., Oyen WJ. Corstens FH., Storm G. (1998), *Quart. J. Nucl. Med.* 42(4), 271-279.
- [8] Duve C.de., Barsey T.de., Poole B., Trouet A. (1974), Commentaire. Lysosomotropic Agents. *Biochem. Pharmacol.* 23(18), 2495-2531.
- [9] Torchilin V.P. (1991), *Immobilized Enzymes in Medicine.* Springer-Verlag, Berlin.

- [10]Rolland A. (Ed.) (1993), *Pharmaceutical Particulate Carriers*. Marcel Dekker, New York.
- [11]Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., Tsai Y.J., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P.L. (1994), *J. Biochem. Chem.* 269(1), 2550-2561.
- [12]Farhood H., Serbina N., Huang L. (1995), *Biochim. Biophys. Acta* 1235, 289-295
- [13]Kim S. (1994), *Drugs* 46, 618-638.
- [14]Sugarman S.M. , Perez-Soler R. (1992), *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 12, 231-242.
- [15]Niesman M.R. (1992), *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9, 1-38.
- [16]Bakker-Woudenberg I.A., Lokerse A.F., ten Kate M.T., Van Vianen W. , Van Etten E.W. (1993), *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1, S61-S67.
- [17]Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chang H.S., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., , Danielsen H. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7413-7417.
- [18]Felgner P.L., Ringold G.M. (1989), *Nature* 337, 387-388.
- [19]Brigham K.L., Meyrick B., Christman B., Berry L.C. Jr., King G. (1989), *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1, 95-100.

- [20]Muller S.R., Sullivan P.D., Clegg D.O., Feinstein S.C. (1990), *DNA Cell Biol.* 9, 221-229.
- [21]Burger H.J., Schuetz J.D., Schuetz E.G., Guzelian P.S. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 2145-2149.
- [22]Malone R.W., Felgner P.L., Verma I.M. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6077-6081.
- [23]Chiang M.Y., Chan H., Zounes M.A., Freier S.M., Lima W.F., Bennett C.F. (1991), *J. Biol. Chem.* 266, 18162-18171.
- [24]Bennett C.F., Chiang M.Y., Chan H., Shoemaker J.E., Mirabelli C.K. (1992), *Mol. Pharmacol.* 41, 1023-1033.
- [25]Debs R.J., Freedman L.P., Edmunds S., Gaensler K.L., Duzgunes N., Yamamoto K.R. (1990), *J. Biol. Chem.* 265, 10189-10192.
- [26]Walker C. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7915-7919.
- [27]Behr J., Demeneix B., Loeffler J., Perez-Mutul J. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6982-6986.
- [28]Rose J.K., Buonocore L., Whitt M.A. (1991), *Biotechniques* 10, 520-525.

- [29]Leventis R., Silvius J.R. (1990), *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 124-132.
- [30]Farhood H., Bottega R., Epand R.M., Huang L. (1992), *Biochim. Biophys. Acta* 1111, 239-246.
- [31]Gao X., Huang L. (1991), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 280-285.
- [32]Legendre J.-Y., Szoka F.C. (1992), *Pharmaceutical Res.* 9, 1235-1242.
- [33]Zhou X., Klibanov A.L., Huang L. (1991), *Biochim. Biophys. Acta* 1065, 8-14.
- [34]Pinnaduwege P., Schmitt L. , Huang L. (1989), *Biochim. Biophys. Acta* 985, 33-37.
- [35]Nabel E.G., Plautz G., Nabel G.J. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 5157-5161.
- [36]Lim C.S., Chapman G.D., Gammon R.S., Muhlestein J.B., Bauamn R.P., Stack R.S., Swain J.L. (1991), *Circulation* 83, 2007-2011.
- [37]Yao S.N., Wilson J.M., Nabel E.G., Kurachi S., Hachiya H.L., Kurachi K. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 8101-8105.

- [38]Nabel E.G., Plautz G., Nabel G.J. (1990), *Science* 249, 1285-1288.
- [39]Stribling R., Brunette E., Liggitt D., Gaensler K., Debs R. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11277-11281.
- [40]Brigham K.L., Meyrick B., Christman B., Magnuson M., King G., Berry L. (1989), *Am. J. Med. Sci.* 298, 278-281.
- [41]Yoshimura K., Rosenfeld M.A., Nakamura H., Scherer E.M., Pavirani A., Lecocq J.-P., Crystal R.G. (1992), *Nucleic Acids Res.* 20, 3233-3240.
- [42]Jiao S., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L., Wolff J.A. (1992), *Exp. Neurol.* 115, 400-413.
- [43]Ono T., Fujino Y., Tsuchiya T., Tsuda M. (1990), *Neurosci. Lett.* 117, 259-263.
- [44]Demeneix B.A., Fredriksson G., Lezoual'ch F., Daugeras-Bernard N., Behr J.P., Loeffler J.P. (1991), *Int. J. Dev. Biol.* 35, 481-484.
- [45]Holt C.E., Garlick N., Cornel E. (1990), *Neuron* 4, 203-214.
- [46]Zhu N., Liggitt D., Liu Y., Debs R. (1993), *Science* 261, 209-211.
- [47]Philip R., Liggitt D., Philip M., Dazin P., Debs R. (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 16087-16090.

- [48]Nabel E.G., Gordon D., Yang Z.Y., Xu L., San H., Huang L., Nabel G.J. (1992), *Human Gene Therapy* 3(6), 649-656.
- [49]Legendre J.Y. , Szoka F.C., Jr. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 893-897.
- [50]Felgner P.L. (1990), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5, 167-187.
- [51]Weiss B., Nitschko H., Ghattas I., Wright R., Schlesinger S. (1989), *J. Virol.* 63, 5310-5318.
- [52]Phillips N.C. , Heydari C. (1996), *Pharmaceutical Sci.* 2, 73-76.
- [53]Yoshihara E. , Nakae T. (1986), *Biochim. Biophys. Acta* 854, 530-546.
- [54]Hannun Y.A. , Bell R.M. (1989), *Science* 243, 500-507.
- [55]Allen T.M. , Chonn A. (1987), *FEBS Lett.* 223, 42-46.
- [56]Aleksander L.K., Maruyana K., Beckerleg A.M., Torchilin V.P., Huang L. (1991), *Biochim. Biophys. Acta* 1062, 142-148.
- [57]Litzinger D.C., Buiting M.J.A., Rooijen NV. Huang L. (1994), *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 99-107.

- [58] Gabizon A. , Papahadjopoulos D. (1988), *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85, 6949-6953.
- [59] Allen T.M. (1994), *Trends in Pharmacol. Sci.* 179, 215-220.
- [60] Naper D.H. (1983), *Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions*. Academic Press, New York.
- [61] Torchilin V.P., Milstein A.M., Shtilman M.I. (1994), Liposome Protection In Vivo with Synthetic Polymers Other than Poly(ethylene glycol). In: *Proc. 21th Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater. Controlled Release Society*, Washington, DC, pp. 604-605.
- [62] Torchilin V.P., Shtilman M.I., Trubetskoy V.S., Whiteman K., Milstein A.M. (1994), *Biochim. Biophys. Acta* 1195, 181-184.
- [63] Philipps W.T., Klipper R.W., Awasthi V.D., Rudolph A.S., Cliff R., Kwasiborski V., Goins B.A. (1999), *J. Pharmacol. And Exp. Therapeutics* 228(2), 665-670.
- [64] Pang S.N.J. (1993), *J. Am. Coll. Toxicol.* 12, 429-456.
- [65] Powell G.M. (1980), Polyethylene Glycol. In: R.L. Davidson (Ed.), *Handbook of Water Soluble Gums and Resins*. McGraw-Hill, New York, Ch. 18.
- [66] Dreborg S. , Akerblom E.B. (1990), *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6, 315-365.

- [67]Duncan R., Kopecek J., (1984), *Adv. Polym. Sci.* 57, 53-101.
- [68]Yamaoka T., Tabata Y., Ikada Y. (1994), *J. Pharm. Sci.* 83, 601-606.
- [69]Delgado C., Francis G.E., Fisher D. (1992), *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9, 249-304.
- [70]Merrill E.W. (1992), Poly(ethylene oxide) and Blood Contact: A Chronicle of One Laboratory. In: J.M. Harris (Ed.), Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications. Plenum Press, New York, pp. 199-220.
- [71]Woodle M.C. , Lasic D.D. (1992), *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 171-199.
- [72]Needham D., McIntosh T.J., Lasic D.D. (1992), *Biochim. Biophys. Acta* 1108, 40-48.
- [73]Torchilin V.P., Omelyanenko V.G., Parisov M.I., Bogdanov A.A., Trubetskoy V.S., Herron J.N., Gentry C.A. (1994), *Biochim. Biophys. Acta* 1195, 11-20.
- [74]Andrade J.D., Nagaoka S., Cooper S., Okano T., Kim S.W. (1987), *ASAIO J.* 10, 75-84.
- [75]Blume G., Cevc G. (1993), *Biochim. Biophys. Acta* 1146, 157-168.

- [76]Chonn A., Semple S.C., Cullis P.R. (1991), *Biochim. Biophys. Acta* 1070, 215-222.
- [77]Papisov M.I., Poss K., Weissleder R., Brady T.J. (1995), Effect of Steric Protection in Lymphotropic Graft Copolymers. In: Abstracts of 7th Int. Symp. Recent Adv. Drug Deliv. Syst., Salt Lake City, UT, pp.171-172.
- [78]Senior J., Delgado C., Fisher D., Tilcock C., Gregoriadis G. (1991), *Biochim. Biophys. Acta* 1062, 77-82.
- [79]Janzen J., Song X., Brooks D.E. (1996), *Biophys. J.* 70(1), 313-320.
- [80]Holland J.W., Cullis P.R., Madden T.D. (1996), *Biochemistry* 35(8), 2610-2617.
- [81]Torchilin V.P., Trubetsky T.S., Whiteman K.R., Caliceti P., Ferruti P., Veronese F.M. (1995), *J. Pharm. Sci.* 84(9), 1049-1052.
- [82]Abuchwski A., Van ES T., Palczul N.C., Davis F.F. (1977), *J. Biol. Chem.* 252, 3578-3581.
- [83]Beauchamp C.O., Gonias S.L., Menapace D.P., Pizzo S.V. (1983), *Anal. Biochem.* 131, 25-33.

- [84]Abuchowski A., Kazo G., Verhoest C.R., Van ES T., Kafkewitz D., Nucci M.L., Viau A.T., Davis F.F. (1984), *Cancer Biochem. Biophys.* 7, 175-186.
- [85]Veronese F.M., Largajolli R., Boccu E., Benassi C.A., Schiavon O. (1985), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 11, 141-152.
- [86]Zalipsky S., Seltzer R., Menon-Rudolph S. (1992), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 15, 100-114.
- [87]Uster P.S., Allen T.M., Daniel B.E., Mendez C.J., Newman M.S., Zhu G.M. (1996) *FEBS Lett.* 386, 243-246.
- [88]Smith J.G., Walzem R.L., German J.B. (1993), *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 327-340.
- [89]Moghimi S.M., Porter C.J.H., Muir I.S., Illum L., Dvis S.S. (1991), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 861-866.
- [90]Petрак K. (1993) Rolland A. (Ed.), *Pharmaceutical Particulate Carriers*. Marcel Dekker, New York.
- [91]Porter C.J., Davies M.C., Davis S.S. , Illum L. (1994), Domb A. (Ed.), *Site-specific Pharmacotherapy*. John Willey and Sons, New York.
- [92]Ishiwata H., Vertut-Doï A., Hirose T, Miyajima K. (1995), *Chem. Pharm. Bull.* 43, 1005-1011.

- [93]Maruyama K., Yuda T., Okamoto A., Kojima S., Suginaka A., Iwatsuru M. (1992), *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 44-49.
- [94]Allen T.M., Hansen C., Martin F., Redemann C., Yau-Young A. (1991), *Biochim. Biophys. Acta* 1066, 29-36.
- [95]Stocks S.J., Jones A.J.M., Ramey C.W., Brooks D.E. (1986), *Anal. Biochem.* 154, 232-234.
- [96]Lehtonen J.Y.A., Kinnunen P.K.J. (1995), *Biophys. J.* 68, 525-535.
- [97]Kenworthy A.K., Simon S.A., McIntosh T.J. (1995), *Biophys. J.* 68, 1903-1920.
- [98]Bradford M.M. (1976), *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [99]Chapman T.M. (1989), *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 27, 1993-2005.
- [100]Larwood D.J., Szoka F.C. (1984), *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 21, 603-607.
- [101]Zalipsky S., Seltzer R., and Nho K. (1991), dans: *Polymeric Drug and Drug Delivery Systems* (Dunn R.L" and Ottenbrite R.L., Ed.), ASC Symposium Series 469, pp. 91-100, Washington DC.

[102]Satkowski W.B., Huang S.K., Liss R.L. dans *Nonionic Surfactant* par M.J. Schick, Ed. Dekker, New York, 1967, p.p. 142-174.

[103]Cafiso D., McLaughlin A.McLaughlin S., Winiski A. Dans *Methods in Enzymology* (1989), vol. 171, sect. 16. P.p. 342-365.

[104]Cevc G. (1990), *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 311-382.

[105] McLaughlin S. (1989), *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 18, 113-36.

[106]Kazuo M., Tsutomu Y., Aki O., Shuji K., Akinori S., Motoharu I. (1992), *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 44-49.