

2m 11.2667.4

Université de Montréal

“Synthèse, Incorporation, Rétention et Immunogénicité  
liposomales d'un promédicament lipophile du 3'-azido-3'-  
désoxythymidine (AZT)”

par

Rana Ghali

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences  
Pharmaceutiques

Mars 1998

© Rana Ghali, 1998



800-224 V

QU  
705

U58

1999

V.002

Université de Montréal

"Synthèse, incorporation, rétention et immunogénicité  
de liposomes d'un médicament lipophile (AZT)  
désoxythymidine (AZT)"

par

François Gauthier

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître en Sciences  
Pharmaceutiques

Mars 1998

© François Gauthier, 1998



Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé: "Synthèse, Incorporation, Rétention et  
Immunogénicité liposomales d'un promédicament lipophile du 3'-azido-3'-  
désoxythymidine (AZT)"

Présenté par

Rana Ghali

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Besner, Jean-Guy	Ph.D.
Leroux, Jean-Christophe	Ph.D. (président du comité)
Phillips, Nigel C.	Ph.D. (directeur de recherche)

Mémoire accepté le: 15.12.1998

## Sommaire

Les promédicaments amphiphiles du 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT) ont préalablement été synthétisés dans le but d'augmenter l'activité antivirale et d'améliorer la biodisponibilité de la molécule mère dans le sang. Bien que plusieurs de ces promédicaments ont déjà été incorporés dans des formulations de liposomes, leur stabilité dans le plasma ainsi que leur potentiel hapténique restent encore à déterminer. Dans ce mémoire on décrit: a) la synthèse, la caractérisation ainsi que la rétention d'une série d'esters aliphatiques d'AZT (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>) (laurate d'AZT, myristate d'AZT, palmitate d'AZT et stéarate d'AZT) dont la synthèse a déjà été publiée par Kawaguchi et al. (*J. Pharm. Sci.*, 79, 531-33, 1990) (chapitre I), b) la synthèse du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT, son incorporation, sa rétention ainsi que sa libération induite par le plasma à partir des porteurs liposomaux (chapitre II) et c) la capacité du palmitate d'AZT d'agir comme un haptène suite à son encapsulation dans les liposomes (chapitre III).

Les caractéristiques des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG et contenant l'ester de l'AZT étaient différentes pour les quatre sortes de promédicaments suite à une incubation dans du PBS à 4, 22 ou 37°C. Les liposomes avaient un potentiel  $\zeta$  négatif variant entre (-8,91 et -10,23). Une meilleure rétention pour le palmitate d'AZT ainsi que pour le laurate d'AZT a été observée, et ce, aux trois différentes températures. De même, une augmentation du taux de libération, en allant de 4 à 37°C, était observable dans ces deux formulations, due à l'augmentation de la fluidité membranaire qui induit une augmentation de la libération des promédicaments à travers les bicouches phospholipidiques suite à une élévation de la température.

L'incorporation liposomale du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT a été améliorée lors de l'utilisation d'une chaîne de palmitate lipophile. D'une part la rétention du palmitate d'AZT dans les liposomes en présence de PBS est excellente avec 5 à 10% de perte sur une période d'incubation de 24 heures. D'autre part, l'incubation du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT liposomal dans le plasma résulte en une libération significative avec le temps. Des injections répétées de liposomes contenant le palmitate d'AZT résulte en une induction d'anticorps du type IgM et IgG chez les souris. L'absence d'une réponse immunitaire contre l'AZT non estérifié incorporé dans les liposomes montre que la molécule est présentée sur la surface des liposomes plutôt qu'à l'intérieur de ceux-ci.



## TABLE DES MATIÈRES

<b>Introduction</b> .....	1
0.1 Les liposomes .....	2
0.1.1 Formation des liposomes .....	2
0.1.2 L'incorporation des médicaments dans les liposomes .....	4
0.1.3 Problèmes associés au ciblage des liposomes in vivo .....	6
0.1.4 Comparaison entre le comportement des liposomes et celui des particules étrangères in vivo.....	6
0.1.5 La toxicité associée aux liposomes .....	7
0.1.6 Les liposomes comme transporteurs de médicaments .....	8
0.1.7 Applications immunologiques des liposomes .....	12
0.2 Formation des promédicaments .....	14
0.2.1 Hypersensibilisation et phénomènes autoimmuns .....	16
0.3 Le Syndrôme d'Immunodéficience Acquis (SIDA) et les principaux inhibiteurs de la transcriptase inverse .....	18
0.3.1 Histoire du 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT).....	20
0.3.2 Les promédicaments de l'AZT.....	24
0.4 Références.....	28
<b>Chapitre I Synthèse, caractérisation et incorporation des promédicaments lipophiles d'AZT dans les liposomes</b> .....	44
1.1 Partie expérimentale .....	47
1.1.1 Matériaux .....	47
1.1.2 Synthèse des dérivés lipophiles d'AZT.....	47
1.1.3 Préparation des liposomes.....	48
1.1.4 Caractérisation des liposomes .....	48
1.1.5 Incorporation des esters d'AZT dans les liposomes .....	49
1.2 Résultats et discussion .....	50
1.2.1 Synthèse et caractérisation des promédicaments d'AZT .....	50
1.2.1.1 Spectre [ <sup>1</sup> H]-RMN des promédicaments de l'AZT .....	52
1.2.1.2 Spectre infrarouge (NaCl) des promédicaments de l'AZT .....	53
1.2.2 Caractérisation des promédicaments liposomaux d'AZT .....	53
1.2.3 Rétention des promédicaments de l'AZT dans les liposomes .....	54
1.3 Références.....	61

<b>Chapitre II Synthèse, incorporation et rétention liposomales d'un promédicament radioactif d'AZT</b> .....	64
2.1 Partie expérimentale .....	67
2.1.1 Matériaux .....	67
2.1.2 Synthèse du [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT .....	67
2.1.3 Préparation des liposomes .....	67
2.1.4 Caractérisation des liposomes .....	68
2.1.5 Incorporation du [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT dans les liposomes .....	68
2.1.6 Rétention du [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT dans les liposomes .....	68
2.2 Résultats et discussion .....	69
2.2.1 Synthèse et caractérisation du [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT .....	69
2.2.2 Incorporation du [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT dans les liposomes .....	70
2.2.3 Caractérisation des liposomes contenant le [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT.....	70
2.2.4 Rétention du [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT dans les liposomes .....	71
2.3 Références .....	79
<b>Chapitre III Immunogénicité du palmitate d'AZT libre et liposomal</b> .....	82
3.1 Partie expérimentale .....	86
3.1.1 Matériaux .....	86
3.1.2 Préparation des liposomes .....	86
3.1.3 L'AZT liposomal.....	87
3.1.4 L'immunisation .....	88
3.1.5 L'ELISA .....	89
3.2 Résultats et discussion .....	90
3.2.1 Réponse immunitaire contre le palmitate d'AZT liposomal pour le 1 <sup>er</sup> protocole d'immunisation .....	90
3.2.3 Réponse immunitaire contre le palmitate d'AZT libre et liposomal pour la 2 <sup>ème</sup> série d'injections .....	91
3.3 Références.....	96
<b>Conclusion</b> .....	99
Références.....	105

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.I. Analyse élémentaire expérimentale des esters d'AZT .....	50
Tableau I.II. Analyse élémentaire théorique des esters d'AZT .....	51
Tableau I.III. Propriétés physiques des promédicaments de l'AZT .....	51
Tableau I.IV. Variation du potentiel $\zeta$ des liposomes contenant les dérivés lipophiles d'AZT .....	55
Tableau I.V. Variation de la pente avec la longueur de la chaîne aliphatique.....	55
Tableau II.I. Incorporation du [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT dans les liposomes.....	70
Tableau II.II. Caractérisation des liposomes contenant le [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT .....	71
Tableau II.III. Pourcentage de libération par heure du [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT à partir des liposomes dans un milieu d'incubation de PBS.....	73
Tableau II.IV. Pourcentage de libération du [ <sup>3</sup> H]-palmitate d'AZT à partir des liposomes dans un milieu d'incubation de PBS/Plasma .....	73
Tableau III.I. Premier protocole d'immunisation pour les quatre séries de souris .....	87
Tableau III.II. Deuxième protocole d'immunisation pour les six séries de souris .....	88

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 0.1.</b> Illustration d'un liposome.....	2
<b>Figure 0.2.</b> Orientation des phospholipides en présence d'un milieu aqueux.....	3
<b>Figure 0.3.</b> Structures chimiques de l'AZT et de la thymidine.....	22
<b>Figure 0.4.</b> Mécanisme d'action de l'AZT.....	23
<b>Figure 1.1.</b> Synthèse des promédicaments d'AZT.....	47
<b>Figure 1.2.</b> Spectre $[^1\text{H}]$ -RMN d'un des esters lipophiles de l'AZT.....	52
<b>Figure 1.3.</b> Spectre infrarouge d'un des esters lipophiles de l'AZT.....	53
<b>Figure 1.4.</b> Courbes d'étalonnage des promédicaments de l'AZT.....	56
<b>Figure 1.5.</b> Étude de la libération des promédicaments liposomaux de l'AZT à 4°C où le milieu d'incubation est le PBS.....	57
<b>Figure 1.6.</b> Étude de la libération des promédicaments liposomaux de l'AZT à 22°C où le milieu d'incubation est le PBS.....	58
<b>Figure 1.7.</b> Étude de la libération des promédicaments liposomaux de l'AZT à 37°C où le milieu d'incubation est le PBS.....	59
<b>Figure 1.8.</b> Variation de la taille des liposomes contenant les différents promédicaments de l'AZT.....	60
<b>Figure 2.1.</b> Spectre de masse du $[^3\text{H}]$ -palmitate d'AZT.....	69
<b>Figure 2.2.</b> Calibration de la colonne de sépharose 2B avec des échantillons de 0,5 ml de liposomes (DPPC/DMPG); de $[^3\text{H}]$ -palmitate d'AZT et de $[^3\text{H}]$ -AZT.....	74
<b>Figure 2.3.</b> Incorporation du $[^3\text{H}]$ -AZT palmitate dans les liposomes.....	75
<b>Figure 2.4.</b> Libération du $[^3\text{H}]$ -palmitate d'AZT des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG suite à une incubation dans du PBS ou du PBS/Plasma (1:1).....	76
<b>Figure 2.5.</b> Libération du $[^3\text{H}]$ -palmitate d'AZT des liposomes formulés avec du DPPC/DOPS suite à une incubation dans du PBS ou du PBS/Plasma (1:1).....	77
<b>Figure 2.6.</b> Libération du $[^3\text{H}]$ -palmitate d'AZT des liposomes formulés avec du DPPC/Cholestérol suite à une incubation dans du PBS ou du PBS/Plasma (1:1).....	78
<b>Figure 3.1.</b> Détermination de la quantité d'anticorps IgG présente dans le serum de souris de la première d'injections.....	92
<b>Figure 3.2.</b> Détermination de la quantité d'anticorps IgM présente dans le serum de souris de la première d'injections.....	93
<b>Figure 3.3.</b> Variation de la concentration en anticorps IgG VS la variation de la concentration en palmitate d'AZT libre et liposomal (10 $\mu$ mols DPPC/DMPG).....	94
<b>Figure 3.4.</b> Variation de la concentration en anticorps IgM VS la variation de la concentration en palmitate d'AZT libre et liposomal (10 $\mu$ mols DPPC/DMPG).....	95

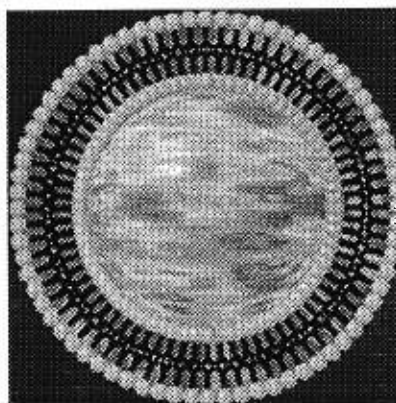
## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
AZT	3'-azido-3'-désoxythymidine
AZT-MP	3'-azido-3'-désoxythymidine-monophosphate
AZT-TP	3'-azido-3'-désoxythymidine-triphosphate
CHOL	cholestérol
ddA	didésoxyadénosine
ddC	didésoxycytidine
ddl	didésoxyinosine
DELSA	doppler electrophoretic light scattering assay
DNP	dinitrophénol
DNP-PE	dinitrophénolphosphatidyléthanolamine
DMPG	dimyristylphosphatidylglycérol
DOPS	dioléylphosphatidylsérine
DPPC	dipalmitylphosphatidylcholine
IFN	interféron
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Ig	Immunoglobuline
i.p.	voie intrapéritonéale
i.v.	voie intraveineuse
LDL	low density lipoproteins
LUV	grands liposomes unilamellaires (large unilamellar vesicles)
MLV	liposomes multilamellaires (multilamellar vesicles)
MDP	muramyl-dipeptide
MDP-GDP	muramyl-dipeptide-glycéryl-dipalmitate
MTP-PE	muramyl-tripeptide-phosphatidyléthanolamine
NLS	nanoparticules de lipides solides (solid lipid nanospheres)
N/S	non significatif
PBS	phosphate buffer saline
s.c.	voie sous cutanée
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SPM	système des phagocytes mononuclées
SRE	système réticulo-endothélial
SUV	petits liposomes unilamellaires (small unilamellar vesicles)
T-butanol	butanol tertiaire
VIH	virus d'immunodéficience humaine

# INTRODUCTION

## 0.1 Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules microscopiques ayant une taille variant entre 10 nm et 20  $\mu\text{m}$ . Ils sont composés d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques emprisonnant des compartiments aqueux (Figure 0.1). La confrontation des lipides polaires ( $\therefore$  phospholipides) non hydrosolubles avec le milieu aqueux donne lieu à un assemblage hautement organisé qui, à cause d'une entropie non favorable, est arrangé dans un système de membranes concentriques fermées. Chacune de ces membranes représente un feuillet bimoléculaire intact de molécules lipidiques, séparé par les membranes avoisinantes par un milieu aqueux.



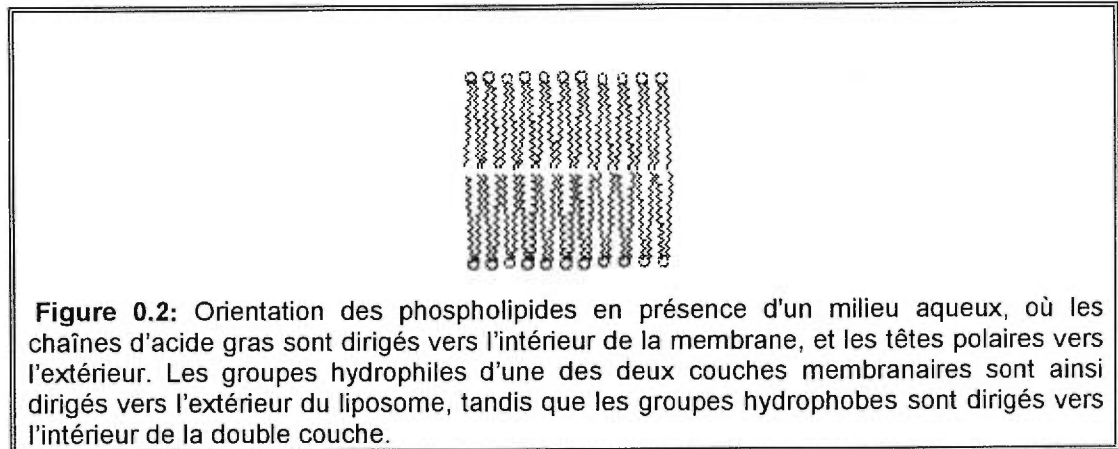
**Figure 0.1:** Illustration d'un liposome montrant une bicouche phospholipidique unilamellaire ainsi qu'un centre aqueux (©1996 Collaborative laboratories Inc.).

### 0.1.1 Formation des liposomes

En 1963, Bangham était le premier à décrire les liposomes [1]. Afin de comprendre la raison de formation de ces vésicules, lorsque les phospholipides sont hydratés, des caractéristiques phospholipidiques se trouvent à être nécessaires. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles; ils possèdent une tête hydrophile et une queue hydrophobe. La queue hydrophobe est composée de deux chaînes d'acide gras contenant chacune 10-24 atomes de carbone ainsi que 0-6 double liaisons. La tête

polaire de la molécule est composée d'un acide phosphorique lié à une molécule hydrophile.

Lorsque les phospholipides sont exposés à l'eau, les queues d'acide gras s'alignent entre elles excluant ainsi l'eau du domaine hydrophobe (Figure 0.2). Quant aux groupements polaires, ils s'orientent vers le milieu aqueux menant ainsi à la formation d'une bicouche. La grande différence d'énergie libre entre l'environnement aqueux et hydrophobe favorise la formation d'une double-couche afin d'atteindre le plus bas niveau d'énergie [2].



Dépendamment du nombre de double-couches formées et de la taille des vésicules, les liposomes sont classés en petites vésicules unilamellaires (SUV, 0-100nm); en larges vésicules unilamellaires (LUV, 100-1000nm) et en vésicules multilamellaires (MLV, plusieurs bicouches 100nm-20 $\mu$ m) [3].

Bien que les phospholipides seuls soient suffisants pour la formation des liposomes, quelques propriétés de ces derniers peuvent être améliorées par une incorporation de molécules liposolubles dans la structure liposomale. La stabilité des bicouches phospholipidiques (en terme de rigidité et de perméabilité) peut être modifiée par une inclusion d'un stérol ou par une incorporation de molécules amphiphiles chargées. Ceci peut, non seulement



rendre la surface liposomale positivement ou négativement chargée, mais peut aussi augmenter la distance, par conséquent le volume aqueux, entre les bicouches [3].

Les liposomes possèdent un vaste domaine d'applications thérapeutiques. Une large gamme de composés peut être encapsulée dans les liposomes, incluant les petites molécules, les protéines ainsi que les acides nucléiques. Les applications thérapeutiques des liposomes ont abondamment été décrites dans la littérature [4-9]. Dans les sciences médicales, les trois domaines présentement exploités (utilisant les liposomes comme vésicules de transport) sont: le transport des médicaments, le transfert génétique et la potentialisation immunitaire.

Les liposomes sont des systèmes attrayants dans le milieu pharmaceutique car:

- Ils sont formés de composants naturels et biodégradables et possèdent une faible toxicité systémique.
- Ils peuvent incorporer des médicaments hydrophobes et hydrophiles.
- Ils peuvent être utilisés comme transporteurs de médicaments pour une libération soutenue ou contrôlée.
- Ils peuvent aussi être utilisés dans le transport ciblé des médicaments.

### **0.1.2 L'incorporation des médicaments dans les liposomes**

Une large gamme de médicaments peut être encapsulée dans les liposomes. L'encapsulation est représentée ici soit par une incorporation des substances lipophiles dans la bicouche lipidique, soit par une incorporation des substances hydrosolubles dans les régions aqueuses du système. Les macromolécules ayant une tête hydrophile et une queue hydrophobe peuvent donc occuper à la fois la région aqueuse et lipidique des liposomes. La capacité d'incorporer des médicaments dans les liposomes dépend non

seulement des caractéristiques liposomales mais aussi des propriétés physico-chimiques des médicaments. Les médicaments polaires et non polaires s'associent aux liposomes de différentes manières [10, 11]. Les molécules polaires comme le 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT), un médicament utilisé contre le virus d'immunodéficience humaine, sont retenues ou encapsulées dans la région aqueuse interne des liposomes et sont libérées lorsque la membrane liposomale est perforée [12-14]. Quant aux molécules non polaires, elles s'associent à la membrane des vésicules et restent associées aux liposomes jusqu'à rupture au niveau de la structure membranaire [15-17].

La manière classique de préparer les liposomes implique la dissolution de concentrations appropriées de phospholipides dans un solvant organique, l'évaporation de celui-ci et l'hydratation de la couche lipidique sèche avec un tampon aqueux approprié. Ceci mène à la formation de liposomes multilamellaires de taille variée. Pour l'incorporation, les substances hydrophobes solubles dans les solvants organiques peuvent être mélangées avec les lipides à l'étape initiale de la procédure et finir comme composants de la structure membranaire dans l'étape finale. Par ailleurs, les substances hydrosolubles ajoutées à la solution utilisée à l'étape de l'hydratation des couches lipidiques sèches, seront localisées dans le milieu aqueux, à l'intérieur des liposomes. La sonication des liposomes multilamellaires suite à leur préparation va mener à la formation de vésicules plus petites de taille [18]. La séparation des substances incorporées dans les liposomes des substances libres peut être achevée par des méthodes variées, dépendamment des caractéristiques physiques (exemple taille, charge, etc.) des liposomes ainsi que des solutés. Les substances de faible masse moléculaire non incorporées dans les liposomes sont éliminées de préférence par dialyse puisque par cette méthode, le nombre de liposomes ainsi que le volume final de la préparation sont conservés [19]. La centrifugation peut être utilisée pour les préparations contenant des

liposomes de grande taille bien que par cette méthode, il est possible de perdre dans le surnageant les structures les plus petites [19]. Pour les liposomes au-dessous d'une certaine taille, le matériel non-incorporé peut être éliminé par chromatographie d'exclusion de taille. Toutefois, une certaine portion de la préparation peut être partiellement adsorbée dans la colonne [19].

### **0.1.3 Problèmes associés au ciblage des liposomes in vivo**

Comparés aux espaces intercellulaires de l'endothélium présents dans le corps, les liposomes sont de taille volumineuse. Même les plus petites vésicules unilamellaires ont un diamètre de 25-50 nm, tandis que les liposomes de grande taille varient autour de 1-10  $\mu\text{m}$  en diamètre [3]. L'architecture de la circulation ne permet pas le déplacement de ces grosses vésicules à plusieurs endroits dans le corps. Ainsi, les liposomes de grande taille ( $> 250$  nm) ont tendance à quitter la circulation seulement dans les endroits où l'endothélium est ouvert ou perforé, comme c'est le cas dans les sinusoides du foie et de la rate [20]. Les particules liposomales de plus petite taille peuvent quitter la circulation à plusieurs endroits, à travers plusieurs perforations.

Le ciblage des liposomes peut alors prendre place seulement dans certains compartiments du corps (exemple le foie, la rate, le sang, les organes lymphoïdes et la moëlle osseuse) permettant la circulation de particules aussi larges que les liposomes. Les autres sites comme le cerveau et les muscles squelettiques sont probablement inaccessibles au transport médicamenteux des liposomes.

### **0.1.4 Comparaison entre le comportement des liposomes et celui des particules étrangères in vivo**

Le devenir des liposomes in vivo est semblable à celui des particules étrangères se trouvant dans le corps. Les liposomes concentrent les médicaments dans le système réticuloendothélial (SRE), les monocytes sanguins et les macrophages [20]. Ils ont la capacité de réduire l'apport de médicaments vers le cœur, le rein et le tractus gastrointestinal. Ces vésicules lipidiques restent dans la circulation et peuvent la quitter pour se diriger vers des sites spécialisés, où l'endothélium est désorganisé par une nécrose ou une inflammation [21]. Les liposomes dépendent des cellules du système phagocitaire qui débarrasse le sang des bactéries, des virus, des débris cellulaires ainsi que d'autres particules étrangères [22]. Le devenir des liposomes est comparable à celui des substances colloïdales étrangères qui sont rapidement déplacées du flot sanguin par les phagocytes mononucléés, particulièrement les macrophages et les cellules de Kupffer présentes dans le foie. La clairance des colloïdes peut aussi impliquer les opsonines qui sont des facteurs circulants dans le serum [23]. Les opsonines aident les macrophages à trier les particules étrangères incluant les liposomes. Les opsonines peuvent être spécifiques ou non spécifiques. Par exemple, les particules immunogènes comme les bactéries et les virus, induisent la production d'anticorps spécifiques. Ces molécules d'anticorps peuvent se lier aux particules virales et bactériennes et induire leur clairance du flot sanguin via leur interaction avec les récepteurs Fc des macrophages [23]. Quant aux particules non immunogènes, comme les débris et certains colloïdes inertes, elles interagissent avec des opsonines non spécifiques retrouvées dans le serum et ces substances favorisent l'élimination des particules étrangères présentes.

### **0.1.5 La toxicité associée aux liposomes**

La toxicité associée à l'administration des liposomes peut être induite de plusieurs façons. Premièrement, des réactions indésirables causées par certaines caractéristiques liposomales peuvent avoir lieu (exemple la taille:

les liposomes, dont la taille n'est pas réduite aux ultrasons, peuvent bloquer les capillaires au niveau des poumons). Deuxièmement, certains composants lipidiques des liposomes peuvent être toxiques soit d'une manière directe ou soit par induction de changements métaboliques. Les liposomes constitués de phosphatidylcholine d'œuf ont la capacité d'inhiber l'activation des lymphocytes par une réduction des niveaux de cholestérol cellulaire [24]. Une toxicité directe in vivo sous forme de crises épileptiques ou de nécroses du tissu cérébral a été observée [25]. Un troisième type de toxicité peut être induit par une modification de la distribution du médicament liposomal causant l'apparition d'un nouvel effet du médicament [26]. L'administration d'une enzyme étrangère dans les liposomes, lors d'une thérapie de remplacement enzymatique de certains désordres métaboliques héréditaires, induit une production d'anticorps beaucoup plus élevée que celle observée lors d'une administration de l'enzyme libre [26]. Alors, le traitement des patients "immunisés" avec les préparations liposomales dans lesquelles l'enzyme étrangère est libérée des liposomes suite à une injection, déclenche la production de réactions d'hypersensibilité pouvant être fatales à ce niveau [26].

#### **0.1.6 Les liposomes comme transporteurs de médicaments**

Bien que les liposomes soient biodégradables [27], ils ont la capacité de protéger les médicaments contre l'activité biodégradante des enzymes [28] et réduire simultanément la toxicité associée à ces médicaments (ex. doxorubicine [29] et amphotéricine B [30]). Les limitations imposées par l'incorporation de promédicaments lipophiles dans les bicouches des liposomes (ex. libération rapide des promédicaments lipophiles à partir des liposomes à 37°C) [31] a poussé la recherche vers un nouveau moyen de transport de médicaments tel celui des émulsions lipidiques. Les émulsions de phospholipides-triglycérides (Intralipid®) ont été largement utilisées dans le domaine de la nutrition parentérale [32, 33] et ont été évaluées comme

transporteurs pour une large gamme de médicaments [34-38]. Depuis 1970, les liposomes ont largement été étudiés comme modèles pour les membranes biologiques [39] et comme transporteurs pour plusieurs substances incluant les enzymes [26], les agents chélatants [40], les antibiotiques [41], les hormones [42], les protéines [43] et les antigènes [44]. L'encapsulation de médicaments dans les liposomes leur donne l'avantage d'augmenter leur efficacité et de diminuer leur toxicité. Ainsi leur index thérapeutique peut être augmenté de différentes façons [45]. Lorsqu'une molécule de médicament est fermement associée à un liposome, le caractère colloïdal de ce dernier réduit la libération du médicament, réduisant ainsi la neurotoxicité de certains médicaments (ex. amphotéricine B [46-48]) ou la cardiotoxicité d'autres (ex. doxorubicine [49, 50]).

Les liposomes ont la capacité de protéger les médicaments contre la dégradation. L'insuline lorsque administrée oralement est dégradée par les fluides gastriques, par conséquent, doit être injectée. Il a été démontré que l'administration orale de l'insuline encapsulée dans les liposomes peut diminuer la glycémie à des niveaux comparables à ceux obtenus par administration par voies intrapéritonéale (i.p.) ou intraveineuse (i.v.) de l'insuline libre [51, 52]. L'incorporation de polynucléotides comme l'ARN immun dans les liposomes, résulte en une protection de leur dégradation, améliorant de ce fait leur capacité de potentialiser la production d'interférons (IFN) [53].

De même, les liposomes ont été examinés pour leur potentiel de transport ciblé ainsi que dans la réduction des effets secondaires associés à certains médicaments. Cette dernière application a été la principale raison pour le développement du produit doxorubicine-liposome afin qu'il soit utilisé dans le traitement du cancer. Ce produit liposomal a démontré une réduction des effets secondaires cardiovasculaires reliés au médicament lorsqu'il est administré sous sa forme libre [54].

L'incorporation d'un médicament dans les liposomes fournit un système de libération contrôlée et soutenue dans lequel la distribution du médicament in vivo est déterminée par les propriétés physico-chimiques du vecteur plutôt que par celles du médicament. Les liposomes peuvent être utilisés soit dans la livraison passive des médicaments, c'est-à-dire la libération lente au niveau de certains organes ou tumeurs, soit dans la vectorisation des médicaments à un site ou à un organe spécifique par une attache d'un ligand (exemple anticorps ou glycoprotéine) à la surface liposomale [55]. La distribution du médicament in vivo est affectée par les caractéristiques structurales des liposomes (composition lipidique), la nature des médicaments, hydrophiles ou lipophiles, et le contact des liposomes avec les composants biologiques comme les lipoprotéines plasmatiques [56]. Les lipoprotéines plasmatiques de haute densité peuvent enlever une quantité importante des phospholipides de la membrane liposomale résultant en une libération accélérée de solutés encapsulés [57, 58].

Les transporteurs efficaces de médicaments présentent une ou plusieurs caractéristiques parmi les suivantes: a) avoir une longue demi-vie dans le plasma, b) avoir un taux d'encapsulation élevé, c) retenir les médicaments d'une manière quantitative, d) avoir la capacité de retarder le métabolisme du médicament, e) dans le cas des médicaments dirigés vers des sites spécifiques, permettre la fixation de ligands à la surface des vésicules. Les liposomes doivent aussi être non immunogènes et biodégradables.

La libération contrôlée du contenu liposomal est une des propriétés les plus importantes des liposomes utilisés comme transporteurs d'agents pharmacologiquement actifs. Dans une forme de dosage liposomal, seule la portion de médicaments libérée des liposomes peut être pharmacologiquement active. Ainsi, le taux et l'importance de la libération



des médicaments liposomaux dans les tissus cibles influencent le degré et la durée de l'effet thérapeutique du médicament.

Les liposomes sont de plus en plus utilisés comme transporteurs pour les médicaments ayant des propriétés pharmacocinétiques non favorables (ex. courte demi-vie dans le plasma ou inactivation métabolique rapide). Ces liposomes sont préparés selon deux approches. Dans le premier cas des composés hydrosolubles comme l'AZT [12, 13, 14], le didésoxyuridine [59], les nucléosides phosphorylés [60], les antisens [61], les médicaments anticancéreux ou d'autres agents antiviraux [62-64] sont encapsulés dans le volume interne aqueux des vésicules lipidiques. Il a déjà été démontré que les dérivés didésoxyuridine phosphorylés qui ont été encapsulés dans les immunoliposomes peuvent inhiber la réplication du VIH-1 *in vitro* [65]. L'avantage de l'encapsulation dans de telles préparations réside dans le fait que les molécules ne sont pas chimiquement modifiées. D'autre part, une faible efficacité d'incorporation ainsi qu'une possibilité de fuite des molécules incorporées lors de l'encapsulation peuvent empêcher l'application clinique de ces préparations. Dans le second cas, ces inconvénients sont contournés en utilisant des molécules chimiquement modifiées. Il a déjà été démontré que les dérivés lipophiles de l'arabinoside de la cytosine (ara-C) possèdent des activités cytostatiques dans les modèles tumoraux de murine [66, 67]. L'incorporation de ces dérivés liposolubles dans les liposomes a inhibé la prolifération du VIH-1 dans les lignées cellulaires infectées et ce d'une manière semblable à celle de l'AZT [68].

À cause de leur taille et leur faible degré de pénétration dans les barrières du tissu épithélial et conjonctif, les liposomes ont tendance à rester dans les endroits où ils sont administrés. Ce fait a été exploité par Dingle *et al.* dans la thérapie expérimentale de l'arthrite avec des liposomes contenant des corticostéroïdes [69]. Alors que les corticostéroïdes inflammatoires sont largement utilisés contre l'arthrite, ces médicaments possèdent plusieurs



effets indésirables. Dans le but de diminuer leur toxicité et d'augmenter leur efficacité, le groupe de Dingle a incorporé le palmitate de cortisol de caractère lipophile dans les liposomes et injecté ce matériel dans les articulations arthritiques. Une diminution de l'enflure ainsi que de la température ont été observées dans les articulations à des concentrations beaucoup moins élevées que celles requises pour le médicament libre. Ceci démontre que l'index thérapeutique d'un corticostéroïde anti-inflammatoire peut être augmenté lorsque ce dernier est incorporé dans les liposomes.

### **0.1.7 Applications immunologiques des liposomes**

Les liposomes sont des transporteurs relativement non immunogènes et peuvent ainsi réduire le risque d'induction de réactions d'hypersensibilité associées aux vaccins lors d'une immunisation répétée [70]. Les liposomes sont utilisés comme modulateurs des immunogènes encapsulés [71, 72] et comme inducteurs de la réponse immunitaire aux haptènes<sup>1</sup> ancrés dans la membrane liposomale via des dérivés phospholipidiques [73-75]. Dans les deux cas, la réponse immunitaire est régulée par les aspects pharmacocinétiques déterminés par les propriétés physico-chimiques des liposomes (ex. la température de transition de phase des phospholipides incorporés, la charge et la taille des vésicules) [76, 77]. Plusieurs molécules présentes à la surface des liposomes peuvent changer la distribution de ces vésicules lipidiques et modifier de ce fait le degré de la réponse immunitaire [78, 79]. Les expériences faites dans les années 80 ont prouvé que les petites vésicules unilamellaires peuvent être utilisées afin d'induire une réponse immunitaire reproductible contre les haptènes synthétiques conjugués ou contre les dérivés d'oligosaccharides bactériens [80, 81]. La réponse immunitaire contre les liposomes présentant des haptènes est du type thymus indépendant [82]. Ainsi, les réponses immunitaires, qui sont de

---

<sup>1</sup> L'haptène est une substance non immunogène mais qui peut se lier à une protéine immunogène afin d'activer une réponse immunitaire.

la famille des isotypes de l'immunoglobuline M (IgM), ont une courte vie et manquent de mémoire immunologique [83, 84]. L'immunogénicité des liposomes présentant des haptènes peut être modulée par une incorporation de plusieurs composés à la surface des liposomes ou simplement par l'ajout d'adjuvants à la suspension colloïdale [85, 86].

En immunologie, les liposomes peuvent être efficaces comme adjuvants aux vaccins contre plusieurs maladies virales, bactériennes et protozoaires [87, 88]. Les adjuvants liposomaux ont plusieurs avantages: (a) ils possèdent une versatilité structurale qui peut être exploitée dans la mise au point des vaccins, (b) ils peuvent agir comme adjuvants: en plus d'être des transporteurs et un milieu de dépôt pour les antigènes, ils ont la capacité d'améliorer l'apport et la présentation des antigènes aux macrophages menant à une stimulation plus efficace des lymphocytes T [50], (c) ils ont aussi la capacité et la facilité à se lier aux adjuvants de faible toxicité afin d'améliorer l'immunogénicité des vaccins.

L'association de petites molécules avec les liposomes peut induire la production d'anticorps voire provoquer une réaction allergique suite à une administration parentérale ou épidermique. Le dinitrophénolphosphatidyl-éthanolamine (DNP-PE), lorsque présent dans la bicouche des liposomes, fonctionne comme un haptène et stimule la production d'anticorps anti-dinitrophénol [15]. Les liposomes contenant du gallate de propyle, un antioxydant utilisé dans les crèmes cutanées à base de liposomes, induisent des réponses allergiques lors d'applications répétées [16]. L'amphotéricine B, un antibiotique polyénique lipophile, provoque des réactions anaphylactiques chez certains patients lorsqu'il est administré sous forme de préparation liposomale [17]. Le propofol, un anesthésique lipophile administré dans des porteurs amphiphiles, s'est avéré immunogène chez l'homme lorsqu'administré dans des émulsions de phospholipides/triglycérides [89].

## 0.2 Formation des promédicaments

Changer les propriétés physiques et/ou chimiques d'un médicament en le modifiant chimiquement d'une manière bioréversible est la définition du terme promédicament [90]. Le terme promédicament a d'abord été décrit par Albert [90] pour les composés qui subissent une biotransformation avant que leur effet pharmacologique ait lieu. Ce dernier a suggéré que cette approche pouvait être utilisée pour modifier les propriétés de certains médicaments, d'une manière temporaire afin d'augmenter leur effet ou de diminuer leur toxicité [90]. Présentement, les dérivés lipophiles des molécules antitumorales et antivirales peuvent être intégrés quantitativement et d'une manière stable dans les membranes lipidiques des liposomes. La synthèse de promédicaments amphiphiles utilisant des chaînes lipophiles aux membranes phospholipidiques a été utilisée comme moyen d'augmenter l'incorporation ainsi que la rétention des molécules hydrosolubles dans les liposomes (exemple, les muramyl tripeptides [91], les agents chimiothérapeutiques comme le 5-fluorouracil [92] ainsi que les promédicaments nucléosidiques comme le 3'-azido-3'-désoxythymidine [93]). La nature amphiphile de ces promédicaments assure leur exposition à la surface des liposomes résultant en une conformation polyhapténique. Ce type de structure possède un potentiel significatif pour la stimulation des lymphocytes B [94].

La sensibilisation des liposomes avec les dérivés du phosphatidyl-éthanolamine N-substitués demeure une méthode efficace pour obtenir des anticorps spécifiques aux haptènes dépendants de liaisons covalentes de ces derniers avec des porteurs hydrosolubles de masse molaire élevée (ex. protéines). Le muramyl-tripeptide-phosphatidyléthanolamine (MTP-PE), un agent anticancéreux, est un analogue lipophile du muramyl-dipeptide (MDP) qui est la plus petite unité structurale des mycobactéries capable d'activer le système immunitaire [95, 96]. Le MDP, dont la masse moléculaire est 495,

est soluble dans la phase aqueuse des liposomes et possède des effets puissants sur les cellules de défense, incluant les macrophages [95]. Il est libéré des liposomes à une vitesse de 10-20%/h dépendamment de la composition phospholipidique de ces derniers [97]. Les analogues lipophiles du MDP, comme le MTP-PE [98], le muramyl-dipeptide-glycéryldipalmitate (MDP-GDP) [99] et le 6-O-stéroyl-MDP [100] peuvent être directement et efficacement incorporés dans les couches lipidiques des liposomes multilamellaires sans aucune perte à l'extérieur des liposomes [101, 102]. Par ailleurs, le couplage de la molécule de DNP avec une chaîne lipophile résulte en une potentialisation de sa capacité de stimuler les fonctions effectrices des macrophages comme celles de la formation des anions superoxydes [103] et de la lyse des cellules cibles de tumeur [104]. Ces molécules couplées semblent avoir une meilleure efficacité comme immunoadjuvants, surtout lorsqu'elles sont incorporées dans les liposomes [105].

Le MTP-PE a été spécialement conçu pour des ciblage des macrophages in vivo après administration intraveineuse et demeure le seul médicament présent sur le marché utilisé en clinique. Le MDP-PE liposomal est capable d'activer in vitro et in vivo les macrophages d'une manière efficace [99]. Plusieurs études ont prouvé que les dinitrophénolphosphatidyl-éthanolamine (DNP-PE) sont requis pour la liaison des protéines du myélôme aux liposomes et que ceux-ci jouent le rôle d'antigènes lors d'un ajout passif<sup>2</sup> [106]. Une série de dérivés de DNP-PE est utilisée à la place des antigènes lipidiques naturels afin d'activer les liposomes [106]. Ces haptènes amphiphiles sont efficaces pour permettre aux liposomes de libérer le marqueur de glucose et ce en présence d'un anticorps [15]. Un prérequis important pour l'activation des liposomes par le DNP-PE est la présence du caractère amphiphile permettant l'insertion du dérivé dans la bicouche

---

<sup>2</sup> Dans un ajout passif, le DNP-PE est ajouté suite à la formation des liposomes, tandis que dans un ajout actif, le DNP-PE est ajouté lors de la préparation des liposomes.

liposomale d'une manière à ce que la région polaire du groupement dinitrophénol soit accessible à l'anticorps [15].

### **0.2.1 Hypersensibilisation et phénomènes autoimmuns**

Lorsqu'une substance étrangère pénètre dans l'organisme, une réaction immunologique peut avoir lieu. L'efficacité du système immunitaire repose essentiellement sur un processus de reconnaissance. Le système doit être capable de reconnaître la présence d'un corps étranger. Il doit également pouvoir distinguer les agents étrangers et les constituants naturels d'un organisme, c'est à dire distinguer le soi du non soi. L'importance d'un tel pouvoir de discrimination est révélée dans certaines pathologies dans lesquelles le système immunitaire réagit contre le soi: ce sont les maladies dites autoimmunes dont quelques-unes sont fatales [94]. La reconnaissance d'un agent étranger est la première étape de la réponse immunitaire. Par la suite, d'autres événements entraîneront la destruction et l'élimination de l'agent étranger. Ainsi le système immunitaire intervient dans deux types d'activités: d'une part, il y a reconnaissance d'un agent étranger, ce qui lui permet de distinguer diverses cibles et, d'autre part, il y a élaboration des réponses, suite à cette reconnaissance, qui permettent au système immunitaire d'élaborer une attaque contre l'agent étranger (ex. destruction d'une bactérie). Ces réponses résultant de la reconnaissance sont appelées fonctions effectrices [94].

Le système immunitaire fonctionne selon deux modes fondamentalement différents. Ces deux modes sont: l'immunité humorale<sup>3</sup> et l'immunité à médiation cellulaire. L'immunité humorale est celle que confèrent des molécules (comme les immunoglobulines (Ig) secrétées par les lymphocytes B) présentes en solution dans les fluides d'un organisme.

---

<sup>3</sup> Le terme humeur se réfère aux fluides d'un organisme.

Dans la médiation cellulaire, ce sont les cellules (plutôt que les immunoglobulines) qui sont responsables de la reconnaissance. Aucune molécule libre soluble ne participe à cette réaction. Ce sont plutôt des molécules fortement liées à la surface des cellules en cause qui se comportent comme des immunoglobulines, tout en ne se dissociant jamais de la membrane.

Dans l'immunité humorale, un antigène peut stimuler la différenciation des cellules B en des plasmocytes. Il existe deux différents moyens par lesquels les cellules B peuvent être activées afin de se différencier en des plasmocytes:

1. Par une réponse T-indépendante. Dans une réponse immunitaire T-indépendante, les cellules B sont activées en absence de cellules T. Les anticorps produits dans ce type de réponse immunitaire sont principalement de la classe IgM.
2. Par une réponse T-dépendante. Dans ce cas, la réponse dépend des cellules T ainsi que des cellules B reconnaissant les antigènes. Dans une réponse T-dépendante, les cellules B se développent d'abord dans le plasma, sécrètent des anticorps du type IgM et alternent par la suite à une autre classe d'anticorps (IgG, IgA ou IgE), un processus dépendant des facteurs sécrétés par les cellules T.

Des études précédentes ont montré qu'une variété de médicaments peuvent causer des désordres autoimmuns et allergiques [107] ainsi que des réactions d'hypersensibilité. La consommation d'une huile comestible dénaturée avec 2% d'aniline induit la production d'anticorps chez certaines personnes par suite à l'utilisation de cette huile dans la préparation de mayonnaise, phénomène reconnu sous le nom du syndrome toxique de l'huile espagnole ayant lieu en 1981. Cette huile mélangée aux œufs (phospholipides) en présence d'un milieu aqueux, se comporte comme un haptène à la surface des liposomes et induit la production de réactions

autoimmunes [108]. La toxicité directe de l'huile semblait dépendre de sa concentration en acide linoléique et/ou de son oxydation en dérivés hydroxylés et époxydés. Plusieurs études ont mené à la conclusion que les consommateurs de l'huile ont dû développer des déficiences en vitamine E (composant fonctionnant comme antioxydant aux lipides insaturés protégeant ainsi l'attaque de la membrane lipidique par les radicaux libres) [109].

Le Taxol, un médicament actif pour le traitement du cancer du sein et des ovaires peut aussi causer des réactions d'hypersensibilité suite à la première et deuxième ingestion [110, 111]. La dyspnée avec ou sans bronchospasme, l'angioédème et l'hypotension sont les manifestations les plus communes. L'AZT est aussi capable d'induire des réactions allergiques. La fièvre non accompagnée de démangeaison [112], la vasculite leucoblastique [113], l'urticaire et le bronchospasme étaient les manifestations les plus communes chez les patients après leur première exposition à l'AZT. Ces réactions d'hypersensibilité inhabituelles de l'AZT sont probablement reliées aux irrégularités immunitaires retrouvées chez les patients infectés par le virus d'immunodéficience.

### **0.3 Le Syndrome d'Immunodéficience Acquis (SIDA) et les principaux inhibiteurs de la transcriptase inverse**

Le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH), le principal virus du SIDA, a la capacité de détruire les lymphocytes ( $CD_4^+$ ) et d'affecter la fonction d'autres cellules du corps comme les macrophages et les lymphocytes B [114, 115]. De plus, ce virus peut entrer dans le système nerveux central causant des désordres neurologiques sévères et une susceptibilité accrue de la persistance des infections due à la suppression du système immunitaire [116]. Le VIH a la capacité de se répliquer dans le cerveau et celui-ci peut servir comme réservoir principal du virus [114].



Suite à la pénétration du virus dans le cytoplasme, l'ARN viral est utilisé, en association avec la transcriptase inverse, afin de servir comme patron pour la production d'ADN viral. La transcriptase inverse (VIH-I) se sert de la lysine, comme promoteur de l'ARN, afin de produire une copie négative du brin d'ADN viral et donner lieu à un hybride du type ARN-ADN. La transcriptase inverse rétrovirale possède une activité RNase H capable de dégrader l'ARN postérieurement à la formation de l'hybride ARN-ADN. Cette transcriptase inverse catalyse par la suite la formation d'un brin positif d'ADN ayant la capacité de rester sous sa forme non-intégrée ou de s'insérer dans le génôme cellulaire [117].

L'infection par le VIH-1 induit une dégradation lente des fonctions immunes. Peu après l'infection par ce virus, il y a production d'anticorps et liaison de ceux-ci avec les virus circulants. Ces complexes antigène-anticorps sont rapidement éliminés par les cellules du système réticuloendothélial. Quant aux complexes immuns apparents dans la circulation lymphatique, ils se déposent sur les cellules folliculaires dendritiques [117]. Il a été démontré que les macrophages, les lymphocytes-T ainsi que les centres germinaux des tissus lymphoïdes se trouvent être les principaux réservoirs du VIH-1 [117].

L'inhibition de la transcriptase inverse et la suppression de la réplication du VIH-I dans les lignées cellulaires ont été observées suite à une administration de suramine [118], de phosphonoformate (foscarnet) [119] et d'ammonium-21-tungsto-9-antimoniate (HPA-23) [120]. Le phosphonoformate est un analogue du pyrophosphate ayant une activité directe sur la transcriptase inverse. Une infusion intraveineuse régulière de ce médicament est requise afin d'atteindre les niveaux plasmatiques de la dose efficace (0.1 mM). Le foscarnet possède un usage limité puisqu'une toxicité rénale est observée suite à son administration pendant plusieurs



semaines. Les analogues des didésoxynucléotides, comme l'AZT, ont été les plus efficaces car ils peuvent être métabolisés afin de devenir des inhibiteurs de la transcriptase inverse. Suite à leur phosphorylation dans les cellules cibles, les 2'-3'-didésoxynucléosides-5'-triphosphates jouent le rôle d'analogues des 2'-désoxynucléosides-5'-triphosphates qui sont des substrats naturels des ADN polymérases et de la transcriptase inverse. Les 2'-3'-didésoxynucléosides-5'-triphosphates peuvent faire compétition avec les nucléosides naturels pour la liaison aux ADN polymérases et peuvent être incorporés dans le développement de la chaîne d'ADN. Les didésoxynucléotides ayant démontré le plus haut rendement thérapeutique in vitro incluent le didésoxycytosine (ddC), le didésoxyadénosine (ddA) et le didésoxyinosine (ddI) [121-124]. Les didésoxycytosines, incluant l'AZT, sont les plus efficaces sur une base molaire. Des études préliminaires ont suggéré que l'AZT réduit le nombre des antigènes p24 et résulte en une neuropathie périphérique.

### **0.3.1 Histoire du 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT)**

Le 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT), dont le nom commercial est Rétrovir®, a été le premier médicament présent sur le marché pour le traitement du SIDA. Il a d'abord été synthétisé et testé en 1964 par Jérôme Horwitz à l'institut de recherche du cancer à Detroit afin de vérifier son activité chimiothérapeutique [125]. Cette dernière s'étant avérée limitée dans ce domaine, l'AZT a été mis de côté à l'attente d'agents moins toxiques.

Au début des années 70, un groupe allemand à l'institut Max Planck a démontré que l'AZT avait la capacité d'inhiber in vitro la réplication des rétrovirus murins du type C [126]. Comme les rétrovirus humains n'avaient pas encore été identifiés, ce travail a été ignoré dans le domaine scientifique. En 1978, l'AZT a été resynthétisé par Lin et Pursoff afin d'étudier son activité comme un analogue aminé de la thymidine [127].

Durant les années 80, l'AZT a été repris par Burroughs Wellcome, une industrie pharmaceutique grandement impliquée dans la recherche antimicrobienne, afin qu'il soit étudié comme agent antirétroviral et antimicrobien. Bien que l'AZT était actif contre les bactéries gram-négatif chez les animaux, son spectre d'activité était trop faible pour permettre son usage chez l'homme [128]. De nouveau, l'AZT a été remis de côté.

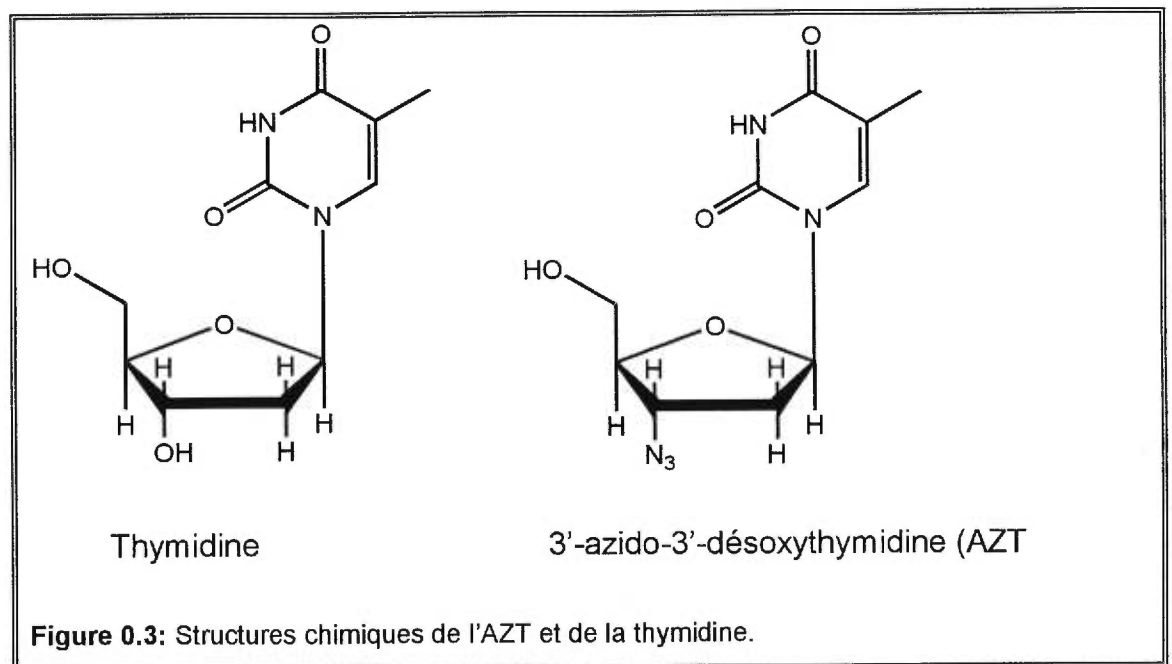
L'intérêt pour l'AZT a été renouvelé en 1984, peu après l'apparition du VIH, un rétrovirus identifié comme le principal agent causant le SIDA. Une recherche menée par Dr Hiroaki Mitsuya du laboratoire du Dr Samuel Broder, a démontré que l'AZT avait une activité significative in vitro contre le VIH [129].

En juillet 1985, les études en phase I ont vu le jour. Une des trouvailles les plus significatives dans cette première phase était que l'AZT pénétrait les membranes par diffusion passive [130], traversant la barrière hémato-encéphalique [131] et inversait partiellement le mal fonctionnement neurologique observé chez certains patients atteints par le VIH. Des études pharmacocinétiques ont démontré que la demi-vie de l'AZT dans le plasma était d'environ 1 heure [131] nécessitant ainsi une administration fréquente du médicament afin de pouvoir maintenir son niveau thérapeutique dans le sang. Bien que l'AZT pouvait atteindre le fluide cérébrospinal, les niveaux de l'AZT étaient à 35-70 % de la concentration plasmatique suite à une administration de 2.5-5 mg/Kg respectivement, suggérant ainsi une dose plus élevée du médicament afin d'avoir des concentrations antivirales adéquates dans le liquide cérébrospinal. Toutefois, une hausse de la dose résultait en une toxicité au niveau de la moëlle osseuse [132, 133].

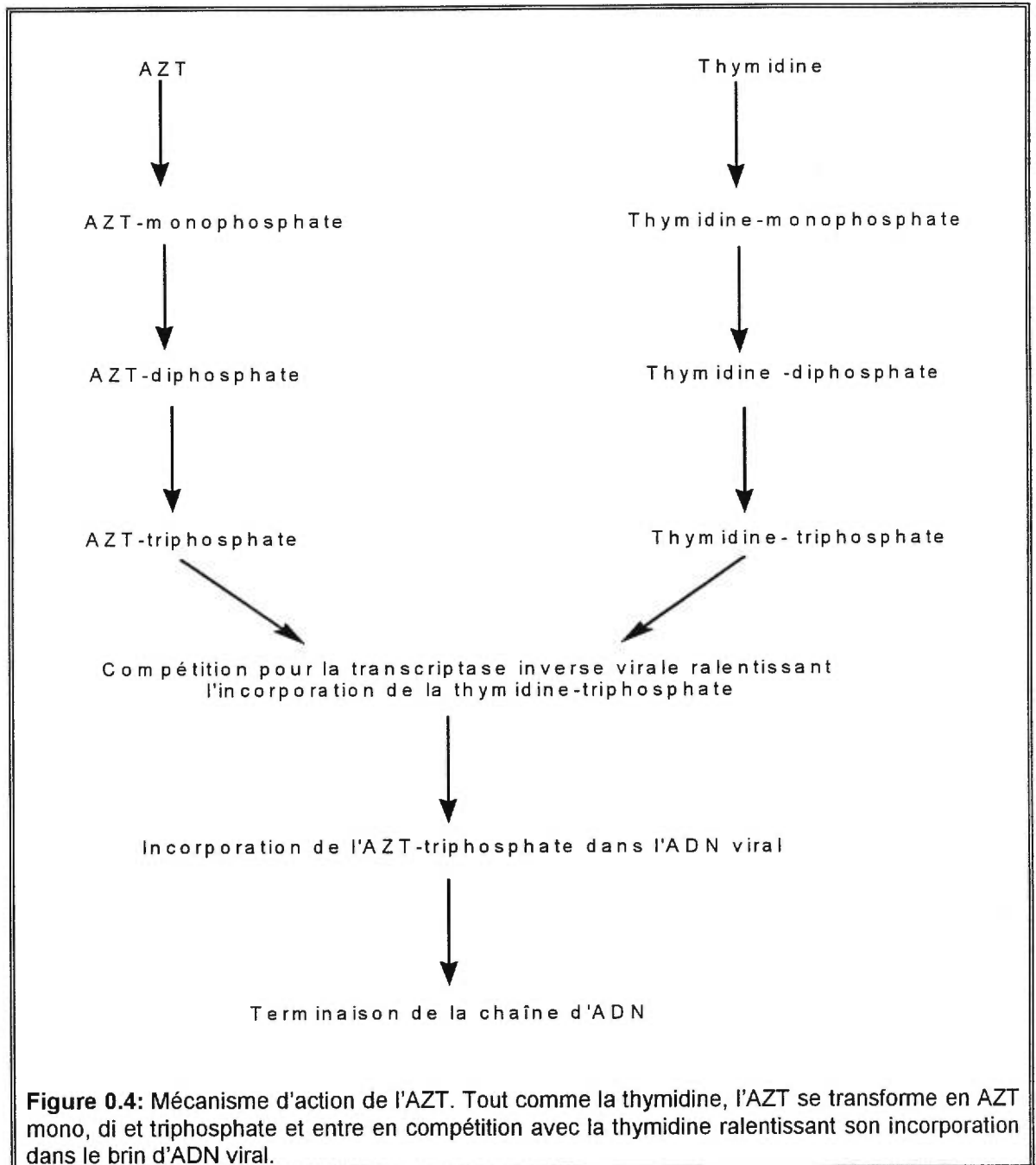
Les études faites durant la phase II (automne 86) ont démontré que le traitement du syndrome d'immunodéficience acquise par l'AZT diminuait le

nombre de protéines virales du type p24, augmentait le nombre de lymphocytes du type  $CD_4^+$ , améliorant ainsi la réponse immunitaire, réduisait la fréquence et la gravité des infections et prolongeait la vie [130]. Cependant, l'AZT ne pouvait pas éviter le virus d'immunodéficience humaine (VIH) d'être isolé par les cellules sanguines périphériques mononucléaires. Cette incapacité d'éliminer le virus infectieux peut être dûe à une inhibition inadéquate de la production virale par les macrophages, le principal réservoir du VIH [134-136].

La structure de l'AZT est relativement comparable à celle de la thymidine (Figure 0.3), un nucléoside basique endogène obtenu à partir de l'ADN, distinguée de celle-ci par un remplacement du groupement hydroxyle en position 3' du noyau ribose par un groupement azide ( $N_3$ ) non réactif. Comparée à d'autres médicaments, la synthèse de l'AZT est complexe et dispendieuse nécessitant au moins sept étapes à partir de la thymidine et 23 à partir du composé brut au produit final [137].



Son mécanisme d'action (Figure 0.4) implique l'inhibition de l'incorporation d'une thymidine par une transcriptase inverse dans l'ADN viral et une terminaison subséquente de la chaîne d'ADN dans les cellules du VIH par suite de la transformation de l'AZT en sa forme active triphosphatée (AZT-TP) [138].



L'AZT a été commercialisé en mars 1987. Désormais, une large gamme de dérivés de ce médicament a été synthétisée afin de pouvoir prévenir la toxicité due à une dose élevée de celui-ci et de prévenir les effets secondaires associés à l'administration de ce médicament.

### 0.3.2 Les promédicaments de l'AZT

Dans le but d'augmenter l'apport de l'AZT vers les organes cibles, de diminuer sa toxicité, d'améliorer sa rétention dans le corps ou son passage à travers la membrane hémato-encéphalique, plusieurs chercheurs ont synthétisé divers dérivés lipophiles préparés à partir de l'estérification de l'hydroxyle présente en position 5' de la molécule mère. Il a été démontré que les dérivés de l'AZT contenant un hydrocarbure polaire et une chaîne hexadécyle possèdent une activité anti VIH-1 et manifestent une grande affinité envers les membranes lipidiques [139]. De même, les éthers lipidiques liés à l'AZT par des liaisons phosphates ont une meilleure activité antivirale que celle de l'AZT libre [140, 141].

L'estérification de l'hydroxyle avec des chaînes alkylées a aussi été étudiée afin d'augmenter la rétention de l'AZT dans le corps [142], de contrôler sa concentration dans le plasma [142] et d'améliorer son transport lymphatique [143]. Par ailleurs, une série d'esters alkylés et arylés a été synthétisée par Aggarwal *et al.* [144] pour augmenter la stabilité et la lipophilicité de l'AZT et d'améliorer son transport à travers la membrane plasmique et les barrières lipidiques.

Des dérivés d'AZT à base de dihydropyridine [145, 146] et d'adamantane [147] ont été synthétisés dans le but de développer des promédicaments anti-VIH plus spécifiques pour un ciblage au cerveau [145, 146] et d'améliorer l'apport vers la membrane hémato-encéphalique [147]. D'autres dérivés, comme les phosphoramidates d'AZT, ont été synthétisés

afin d'étudier l'effet d'une élongation de la chaîne introduite à l'hydroxyle en 5' de l'AZT sur l'activité antivirale in vitro de celui-ci [148].

Comme il a préalablement été mentionné (Figure 0.4), l'effet de l'AZT implique sa conversion, par les kinases cellulaires, en sa forme triphosphatée capable d'inhiber l'activité de la transcriptase inverse et d'assister ainsi à la terminaison des chaînes d'ADN virales. Cette dépendance sur la phosphorylation par les kinases peut limiter l'efficacité de l'AZT dans un environnement cellulaire pauvre en activité kinase comme c'est le cas dans les macrophages [149] ou dans des cellules ayant perdu leur capacité de phosphoryler l'AZT à cause d'une exposition prolongée au médicament [150]. Ainsi, des tentatives ont été faites afin de contourner cette dépendance à travers l'utilisation de promédicaments d'AZT-monophosphate (AZT-MP) [139, 151, 152] ou de dérivés diphosphates d'AZT encapsulés dans les liposomes [93, 153]. Avec de telles stratégies, l'AZT démontre une augmentation de la réponse biologique in vitro et une amélioration de l'effet anti-VIH due à une meilleur transport intracellulaire du mononucléotide d'AZT [65, 152, 154].

Il a été démontré que les dérivés du 5'-hydrogéo-phosphonate d'AZT ainsi que les diacylglycérols monophosphate possèdent une activité anti-VIH semblable à celle observée chez la molécule mère [155, 156]. D'autres, comme les glycosyles phosphotriesters d'AZT ont une demi-vie plasmatique plus élevée (24 h vs. 1h pour l'AZT) ainsi qu'une amélioration du transport de l'AZT vers le système nerveux central [157].

Afin de contourner le problème de la phosphorylation limitée de l'AZT dans les macrophages et celui des effets secondaires associés à la forme active du médicament (AZT-triphosphate), le di-(thymidine-3'-azido-2'-3'-désoxy-D-ribose)-5'-5'-p<sup>1</sup>-p<sup>2</sup>-pyrophosphate a été synthétisé. Malheureusement cette substance a démontré une faible activité inhibitrice

de la transcriptase inverse ainsi qu'une protection insuffisante des macrophages contre l'infection rétrovirale [158].

La formation des dérivés à partir de l'AZT peut être possible par une méthode autre que celle de l'introduction de groupements lipophiles à la position 5' de l'hydroxyle. La modification du noyau thymine a préalablement été faite en synthétisant les 5-halo-6'-alkoxy-5, 6-dihydro-3'azido-3'-désoxythymidines, des dérivés lipophiles de l'AZT capables de traverser la barrière hémato-encéphalique afin de fournir au cerveau une concentration plus élevée en médicament actif [159, 160].

Une des méthodes utilisées pour diminuer la toxicité de l'AZT et modifier sa biodistribution dans le corps est l'utilisation des liposomes. Étant donné qu'ils ont une affinité naturelle pour les cellules du système des phagocytes mononucléés (SPM) et les tissus lymphoïdes, ils fournissent ainsi des nouvelles possibilités de transport des médicaments et des promédicaments antiviraux vers les cellules réservoirs du virus [161-163]. La localisation de ces vésicules dans des organes riches en macrophages comme le foie, la rate, les reins et les poumons leur donne l'avantage de diminuer l'apport de l'AZT vers la moelle osseuse diminuant ainsi sa toxicité à ce niveau [14].

Phillips *et al.* [13] ont tenté d'incorporer l'AZT dans les liposomes ( $25.0 \pm 3.2 \mu\text{g} / \mu\text{mol}$  phospholipides) et ont prouvé que l'encapsulation liposomale de ce médicament résulte en une diminution de la toxicité dans les cellules de la moelle osseuse et celles du rein ainsi qu'en une augmentation de la disponibilité de l'AZT dans les organes réticuloendothéliaux tels le foie, la rate et les poumons. D'autres tentatives ont suivi cherchant à déterminer l'effet d'une incorporation liposomale de l'AZT sur l'activité antivirale chez les souris [14]. Deux types de dérivés lipophiles d'AZT (des phosphates dinucléosides alkylé et arylé) ont été

synthétisés et encapsulés dans les liposomes afin de pouvoir étudier l'effet de leur incorporation liposomale sur les propriétés antivirales *in vitro* et *in vivo* [164].

Une nouvelle série de promédicaments lipophiles d'AZT a été synthétisée par Squalli Houssaini *et al.*, utilisant les lipoprotéines de faible densité (LDL) comme transporteurs de ces promédicaments, afin d'étudier l'effet d'une telle incorporation sur l'activité antirétrovirale et sur le degré de l'internalisation de ces complexes dans les récepteurs des apolipoprotéines B-E [165]. Heiati *et al.* ont utilisé le palmitate d'AZT, un promédicament d'AZT préalablement synthétisé par Kawaguchi *et al.* [142] afin de pouvoir étudier la capacité d'incorporation et de rétention de cette molécule dans les nanoparticules de lipides solides (NLS) [166]. Cet ester d'AZT s'incorporait mieux dans les NLS que l'AZT non estérifié [166]. À partir de ce principe, celui de l'encapsulation des médicaments dans les liposomes, nous allons synthétiser et caractériser quatre promédicaments d'AZT, préalablement préparés par Kawaguchi *et al.* [142] et tenter de les encapsuler dans les liposomes. Une étude complète sera faite sur le palmitate d'AZT en particulier cherchant à étudier son incorporation et rétention dans les liposomes ainsi que son immunogénicité, utilisant plusieurs formulations de lipides/ phospholipides. Ce promédicament, connu pour son caractère lipophile, aura tendance à s'insérer dans la double couche liposomale donnant lieu à une encapsulation améliorée en comparaison avec celle du promédicament libre. De même, sa présentation à la surface des liposomes sera semblable à celle d'un haptène, qui, lorsque associé aux liposomes donnera lieu à une production d'immunoglobulines. Ainsi, la détermination du type d'anticorps produits à partir du palmitate d'AZT liposomal sera étudiée *in vivo* suivie par une étude de l'effet de la variation de la concentration de l'haptène (le palmitate d'AZT) sur la production d'anticorps.



## 0.4 RÉFÉRENCES

1. Bangham AD, "Physical structure and behaviour of lipids and lipid enzymes", *Adv. Lipid Res.*, 1, 65-70, 1963.
2. Nassander UK, Storm G, Peters PAM, Cromellin DJA, "Liposomes. In Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems", (Ed. Chasin M, Langer R), New York: Marcel Dekker, 261-338, 1990.
3. Liebermann HA, Rieger M, Banker G, dans "*Pharmaceutical dosage forms, disperse systems*", volume 2, (Ed. Liebermann HA), New York: Marcel Dekker, 567-601, 1989.
4. Davis SS, Lisbeth I, "Colloidal carriers and drug targeting", *Acta Pharm. Tech.*, 32, 4-9, 1986.
5. Gregoriadis G, "Engineering of liposomes for drug delivery: progress and problems", *Trends In Biotechnology*, 13, 527-37, 1995.
6. Gregoriadis G, Florence AT, Patel HM, "Liposomes in drug delivery", (Ed. Gregoriadis G), London: Harwood, 25-33, 1993.
7. Mezei M, Nugent FJ, "Methods of encapsulating biologically active materials in multilamellar lipid vesicles", US patent 4, 54, 485-490, 1984.
8. Ostro MJ, "Liposomes: From Biophysics to Therapeutics", (Ed. Ostro MJ), New York: Marcel Dekker, 255-267, 1987.
9. Ostro MJ, Cullis PR, "Use of liposomes as injectable drug delivery systems", *Amer. J. of Hosp. Pharm.*, 46, 1576-1587, 1989.
10. Juliano RL, Stamp D, "Factors affecting the encapsulation of drugs within liposomes", *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 57, 535-9, 1979.
11. Stamp D, Juliano RL, "Pharmacokinetics of liposome-encapsulated antitumor drugs and implications for therapy", *Annals N. Y. Acad Sci.*, 308, 411-25, 1978.
12. Phillips NC, "liposomal carriers for the treatment of acquired immune deficiency syndromes ", *Bull. Inst. Pasteur*, 90, 205-230, 1992.
13. Phillips NC, Skame E, Tsoukas C, "Liposomal encapsulation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) results in decreased bone marrow toxicity and enhanced activity against murine AIDS-induced immune suppression", *J. of AIDS*, 4, 959-66, 1991.

14. Phillips NC, Tsoukas C., "Liposomal encapsulation of azidothymidine, results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome", *Blood*, 79, 1137-43, 1992.
15. Kinsky SC, "Antibody-complement interaction with the lipid model membranes", *Biochim. Biophys. Acta*, 265, 1-23, 1972.
16. Marston S, "Propyl gallate on liposomes", *Contact Dermatitis*, 27, 74-76, 1992.
17. Tollemar J, Andersson S, Ringden O, Tygen G, "A retrospective clinical comparison between antifungal treatment with liposomal amphotericin B (Ambisome) and conventional amphotericin B transplant recipients", *Mycoses*, 35, 215-20, 1992.
18. Müller RH, "Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery", (Ed. Müller RH), Stuttgart : CRC press, 123-143, 1991.
19. Gregoriadis G, Allison AC, "Liposomes in biological systems", (Ed. Gregoriadis G), New York : John Wiley, 1-462, 1980.
20. Juliano RL and Layton D, "Drug Delivery systems: Characteristic and Biomedical Applications", (Ed. Juliano RL), New York : Oxford University Press, 1-42, 1989.
21. Papahadjopoulos D, Gabizon A, "Targeting of liposomes to tumor cells in vivo", *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 507, 67-74, 1987.
22. Gregoriadis G, "Targeting of drugs: implications in medicine", *Lancet*, ii, 241-247, 1981.
23. Silverstein SC, Steinman RM, Cohn Z, "Endocytosis", *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 669-727, 1977.
24. Chen SS, Keenan RM, "Effect of phosphatidylcholine liposomes on the mitogen-stimulated lymphocyte activation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79, 852-858, 1977.
25. Adams DH, Joyce G, Richardson VJ, Ryman BE, Wisniewski HM, "Liposome toxicity in the mouse central nervous system", *J. Neurol. Sci.*, 31, 173-179, 1977.
26. Gregoriadis G, "Targeting of drugs", *Nature*, 265, 407-411, 1977.

27. Gritt M, de Smidlt JH, Struijka A, Cromellin DJA, "Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersion", *Int. J. Pharm.*, 50, 1-6, 1989.
28. Rowland RN, Woodley JF, "The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pchaïneatic lipase", *Biochim. Biophys. Acta*, 620, 400-409, 1980.
29. Rahman A, White G, More N and Schien PS, "Pharmacological, toxicological and therapeutic evaluation in mice of doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes", *Cancer Res.*, 45, 796-803, 1985.
30. Lopez-Berestein G, Boday GP, Frankel LS, Mehta K, "Treatment of hepatosplenic candidiasis with liposomal amphotericin B", *J. Clin Oncol.*, 5, 310-317, 1987.
31. Shaw IH, Knight CG, Dingle JT, "Liposomal retention of a modified anti-inflammatory steroid", *Biochem. Journal*, 158, 473-76, 1976.
32. McNiff BL, "Clinical use of 10% soya bean oil", *Am. J. Hosp. Pharm.*, 34, 1080-1086, 1977.
33. Leibowitz AB, O' Sullivan P, Iberti TJ, "Intravenous fat emulsions and the pchaïneas", *Mt Sinai J. Med.*, 59, 38-42, 1992.
34. El Sayed AA, Repta AJ, "Solubilization and stabilization of an investigational antineoplastic drug (NSC no 278214) in an intravenous formulation using an emulsion vehicle", *Int. J. Pharm.*, 13, 303-312, 1983.
35. Caillot D, Casasnovas O, Solary E, Chavanet P, Bennotte B, Reny G, Entezam F, Lopez J, Bonnin A, Guy H, "Efficiency and tolerance of an amphotericin B lipid (Intralipid) emulsion in the treatment of candidaemia in neutropenic patients", *J. Antimicrob. Chemother.*, 31, 161-169, 1993.
36. Tibell A, Lindholm A, Sawe J, Chen G, Norrlind B, "Cyclosporin A in fat emulsion carriers: experimental studies of pharmacokinetics and tissue distribution", *Pharm. Tox.*, 76, 115-121, 1995.
37. Yamagushi T, Fukushima S, Itai S, Hayashi H, "Rate of release and retentivity of prostaglandin E<sub>1</sub> in lipid emulsion", *Biochim. Biophys. Acta*, 1256, 381-386, 1995.
38. Higashi S, Shimizu M, Nakashima T, Iwata K, Ushiyama F, Tateno S, Tamura S, Setogushi T, "Arterial-injection chemotherapy for hepatocellular carcinoma using monodispersed poppy-seed oil microdroplets containing fine aqueous vesicles of epirubicin. Initial medical application of a membrane emulsification technique", *Cancer*, 75, 1245-1254, 1995.

39. Chang TM, "The in vivo effects of semipermeable microcapsules containing L-asparagine on 6 C 3 HED lymphosarcoma", *Nature*, 229, 117-118, 1971.
40. Rahmann YE, Rosenthal MW, Cerny EA, "Intracellular plutonium: Removal by liposome encapsulated chelating agent", *Science*, 180, 300-302, 1973.
41. Gregoriadis G, "Drug entrapment in liposomes", *FEBS letters*, 36, 292-296, 1973.
42. Patel HM, Ryman BE, "Oral administration of insulin by encapsulation with liposomes", *FEBS letters*, 62, 60-63, 1976.
43. Gregoriadis G, Allison AC, "Entrapment of proteins in liposomes prevents allergic reactions in pre-immunized mice", *FEBS letters*, 45, 71-74, 1974.
44. Uemara KI, Chafflin JL, Davie JM, Kinsky SC, "Immune response to liposomal model membranes-restricted IgM and IgG anti-dinitrophenyl antibodies produced in guinea pigs", *J. Immunol.*, 114, 958-961, 1975.
45. Lasic DD, "Doxorubicin in sterically stabilized liposomes", *Nature*, 380, 561-2, 1996.
46. Juliano RL, Lopez-Berestein G, Hopfer R, Mehta R, Mehta K, Mills K, "Selective toxicity and enhanced therapeutic index of liposomal polyene antibiotic in systemic fungal infections", *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 446, 390-402, 1985.
47. Medoff G, Brajtburg J, Bolard J and Kobayashi GS, "Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections", *Sci. & Med.*, 23, 303-30, 1983.
48. Viviani MA, Rizzardini G, Tortorano AM, Fasan M, Roverselli AM, Gringeri A and Suter F, "Lipid based amphotericin B in the treatment of cryptococcosis", *Infection*, 22, 137-42, 1994.
49. Herman EH, Rahman A, Ferrans VJ, Vicks JA and Schein PS, "Prevention of chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles by liposomal encapsulation", *Cancer Res.*, 43, 5427-32, 1983.
50. Gabizon A, Meshorer A, Barenholz Y, "Comparative long-term study of the toxicities of free and liposome associated doxorubicin in mice after intravenous administration", *J. Natl. Cancer Inst.*, 77, 459-69, 1986.

51. Dapergolas G, Gregoriadis G, "Hypoglycaemic effect of liposome-entrapped insulin administered intragastrically into rats", *Lancet*, ii, 824-827, 1976.
52. Tragl KH, Kinsat H, Pohl A, "Oral administration of insulin by means of liposomes in animal experiments", *Wien. Klin. Wochenschr.*, 91, 448-51, 1979.
53. Magee WE, "Potentiation of interferon-production and stimulation of lymphocytes by polyribonucleotides entrapped in liposomes", *Ann. N. Y. Acad. Sci. U.S.A.*, 308, 308-324, 1978.
54. Spalding BJ, "Liposomal drugs come of clinical age", *Chem. Week*, 2, 24-25, 1988.
55. Gregoriadis G, "Targeting of drugs: implications in medicine", *Lancet*, ii, 241-247, 1981.
56. Gregoriadis G, "Liposomes" : Drug Carriers in Biology and Medicine, (Ed. Gregoriadis G), London, New York : Academic Press, 287-341, 1983.
57. Kimelberg HK, Mayhew EG, "Properties and biological effects of liposomes and their uses in pharmacology and toxicology" *Crit. Rev. Toxicol.*, 6, 25-79, 1978.
58. Damen J, Regts J, Scherphof G, "Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins", *Biochim. Biophys. Acta*, 665, 538-545, 1981.
59. Kim S, Scheerer S, Geyer MA, Howell SB, "Direct cerebrospinal fluid delivery of an antiretroviral agent using multivesicular liposomes", *J. Infect. Dis.*, 162, 750-752, 1990.
60. Szebeni J, Wahl SM, Betagri GV, Wahl LM, Gartner S, Popovic M, Parker RJ, Black CDV, Weinstein JN, "Inhibition of HIV-1 in monocyte macrophage cultures by 2', 3'-dideoxycytidine-5'-triphosphate, free and in liposomes", *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 6, 691-701, 1990.
61. Renneisen K, Leserman L, Matthes E, Schröder HC, Müller WEG, "Inhibition of expression of human immunodeficiency virus-1 in vitro by the antibody-targeted liposomes containing antisense RNA to the env region", *J. Biol. Chem.*, 265, 16337-16342, 1990.
62. Gabizon AA, "Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulation liposomes", *Cancer Res.*, 52, 891-896, 1992.

63. Gangemi JD, Nashtigal M, Barnhart D, Krech L, Jani P, "Therapeutic efficacy of liposome encapsulated ribavirin and muramyl tripeptide in experimental infection with enfluenza or herpes simplex virus", *J. Infect. Dis.*, 155, 510-517, 1987.
64. Hong F, Mayhew E, "Therapy of central nervous system leukemia in mice by liposome-entrapped 1- $\beta$ -arabinofuranosylcytosine", *Cancer Res.*, 49, 5097-5102, 1989.
65. Zelphati O, Degols G, Loughrey H, Leresman L, Pompon A, Puech F, Maggio A,F, Imbach J,L, Gosselin G, "Inhibition of HIV-1 replication in cultured cells with phosphorylated dideoxyuridine derivatives encapsulated in immunoliposomes", *Antiviral Res.*, 21, 181-195, 1993.
66. Rubas W, Supersaxo A, Weder HG, hatarmann HR, Hengartner H, Schott H, Schwendener RA, "Treatment of murine L1210, lymphoid leukemia and melanoma B16 wiht lipophylic cytosine arabinoside derivatives incorporated into unilamellar liposomes", *Int. J. Cancer*, 37, 149-154, 1986.
67. Schwendener RA, Schott H, "Treatment of L1210 murine leukemia with liposome-incorporated N<sup>4</sup>-hexadecyl-1- $\beta$ -arabinofuranosylcytosine", *Int. J. cancer*, 51, 466-469, 1992.
68. Schwendener RA, pestallozi B, Berger S, Schott H, Hengartner H, Sauter Chr, "Treatment of acute myelogenous leukemia with liposomes containing N<sup>4</sup>-oleyl-cytosine arabinoside", dans "Liposomes in the therapy of infectious diseases and cancer", (Ed. Lopez-Berestein G, Fidler JI), New York : AR Liss, 95-103, 1989.
69. Dingle JT, Gordon JL, Hazleman BL, Knight CG, Page Thomas DP, Phillips NC, Shaw IH, Fildes FJ, Oliver JE, Jones G, Turner EH, Lowe JS, "Novel treatment for joint inflammation", *Nature*, 271, 372-373, 1978.
70. Van Houte AJ, Snippe H, "Liposomes as carriers of immunogenic determinants", *Liposome Technology*, Vol 2, (Ed. Gregoriadis G), Boca Raton, FL : CRC Press, 125-133, 1984.
71. Wachsmann D, Klein JP, Scholler M, Ogier J, Achermans F, Frank RM, "Serum and salivary antibody responses in rats orally immunized with *Streptococcus mutans* carbohydrate protein conjugate associated with liposomes", *Infect. Immun.*, 52, 408-413, 1986.
72. Bruyere T, Wachsmann D, Klein JP, Scholler M, Frank RM, "Local response in rat to liposome-associated *Streptococcus mutans* polysacccharide-protein conjugate", *Vaccine*, 5, 39-42, 1987.

73. Wood C, Kabat EA, "Immunochemical studies of conjugates of isomaltosyl oligosaccharides to lipids. I. Antigenicity of the glycolipids and the production of specific antibodies in rabbits", *J. Exp. Med.*, 154, 432-449, 1981.
74. Sarkar DP, Das PK, Bachhawat BK, Das MK, "The adjuvant effect of liposomes in eliciting anti-galactosyl antibodies", *Immunol. Commun.*, 11, 175-188, 1982.
75. Snippe H, Van Dam JEG, Van Houte AJ, Willers JMN, Kamerling JP, Vliegthart JFG, "Preparation of a semisynthetic vaccine to *Streptococcus pneumoniae* type 3", *Infec. Immun.*, 42, 842-844, 1983.
76. Bakouche O, Gerliez D, "Enhancement of immunogenicity of tumour virus antigen by liposomes: the effect of lipid composition", *Immunology*, 58, 507-513, 1986.
77. Roerdink F, Wassef NM, Richardson EC, Alving CR, "Effects of negatively charged lipids on phagocytosis of liposomes opsonized by complement", *Biochim. Biophys. Acta*, 734, 33-39, 1983.
78. Takada M, Yuzuriha T, Katayama K, Iwamoto K, Sunamoto J, "Increased lung uptake of liposomes coated with polysaccharides", *Biochim. Biophys. Acta*, 802, 237-244, 1984.
79. Das PK, Murray GJ, Zirzow GC, Brady RO, Barranger JA, "Lectin-specific targeting of beta-glucocerebrosidase to different liver cells via glycosylated liposomes", *Biochem. Med.*, 33, 124-131, 1985.
80. Van Houte AJ, Snippe H, Peulen GTM, Willers JMN, "Characterization of immunogenic properties of haptenated liposomal model membranes in mice. I. Thymus independence of the antigen", *Immunology*, 37, 505-514, 1979.
81. Van Houte AJ, Snippe H, Shmitz MGJ, Willers JMN, "Characterization of immunogenic properties of haptenated liposomal model membranes in mice. V. Effect of membrane composition on humoral and cellular immunogenicity", *Immunology*, 43, 627-634, 1981.
82. Yasuda T, Dancey GF, Kinsky SC, "Immunogenic properties of liposomal model membranes in mice", *J. Immunol.*, 119, 1863-1867, 1977.
83. Snippe H, Van Dam JEG, Van Houte AJ, Willers JMN, Kamerling JP, Vliegthart JFG, "Preparation of a semisynthetic vaccine to *Streptococcus pneumoniae* type 3", *Infec. Immun.*, 42, 842-844, 1983.

84. Snippe H, Van Houte AJ, Janssen A, Lizzio EF, Willers JM, Merchant B, "Characterization of immunogenic properties of haptened liposomal model membranes in mice. VII. Synergistic responses to haptened liposomes and haptened thymus-dependent antigens in CBA/N mice", *Immunology*, 45, 613-20, 1982.
85. Zigterman GJWJ, Jansze M, Snippe H, Willers JMN, "Immunomodulation properties of substances to be used in combination with liposomes", *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 81, 245-252, 1986.
86. Zigterman GJWJ, Jansze M, , Snippe H, Ernste EBHW, De Reuver MJ, Willers JMN, "Nonionic block polymer surfactants enhance immunogenicity of pneumococcal hexasaccharide-protein vaccine", *Infect. Immun.*, 56, 1391-1393, 1988.
87. Gregoriadis G, "Vaccines: recent trends and progress", *Immunol. Today*, 11, 427-29, 1990.
88. Alving CR, "Liposomes as carriers of antigens and adjuvants", *J. Immunol. Methods*, 140, 1-13, 1991.
89. Laxenaire MC, Mata Bermejo E, Moneret-Vautrin DA, Gueant JL, "Life threatening anaphylactoid reactions to propofol (Diprivan)", *Anesthesiology*, 77, 275-80, 1992.
90. Albert A, "Selective Toxicity", (Ed. Albert A), New York : John Wiley 21-62, 1973.
91. Fidler IJ, Sone S, Smith SD, Fogler WE, Braun DG, Tarcsay L, Gisler RJ and Schroit A, "Selective delivery of drugs encapsulated in liposomes: natural targeting to macrophages involved in various disease state", *J. Biol. Response Modif.*, 2, 97-100, 1983.
92. Elorza B, Elorza MA, Fructos G, Chantres JR, "Characterization of 5-fluorouracil located liposomes prepared by reverse phase evaporation or freeze-thawing extrusion methods: study of drug release", *Biochim. Biophys. Acta*, 1153, 135-42, 1993.
93. Hostetler KY, Stuhmiller LM, Lenting HB, Van Der Bosch H, Richman DD, "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine", *J. Biol. Chem.*, 265, 6112-7, 1990
94. Roitt IM, "Essential Immunology", 8<sup>ème</sup> édition, (Roitt IM), London : Blackwell Scientific Publications, 1-438, 1994.



95. Fogler WE, Fidler IJ, "Modulation of the immune response by muramyl dipeptide", dans *Immune Modulation agents and their Mechanisms*, (Ed. Chirigos MA, Fenichel RL), New York : Marcel Dekker, 499-530, 1984.
96. Asano T, Mc Watters A, An T, Matsushima K, Kleinerman ES, "Liposomal muramyl tripeptide up-regulates interleukin-1 alpha, interleukin-1 Beta, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-8 gene expression in human monocytes", *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, 268, 1032-9, 1994.
97. Schroit AJ and Fidler IJ, "Effects of liposome structure and lipid composition on the activation of the tumoricidal properties of macrophages by liposomes containing muramyl dipeptide", *Cancer Res.*, 42, 161-7, 1982.
98. Fidler IJ, Sone S, Fogler WE, Barnes ZL, "Eradication of spontaneous metastases and activation of alveolar macrophages by intravenous injection of liposomes containing muramyl dipeptides", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 1680-1684, 1981.
99. Phillips NC, Mora ML, Chedid L, Lefrancier P, Bernard JM, "Activation of tumoricidal activity and eradication of experimental metastases by freeze-dried liposomes containing a new lipophilic muramyl dipeptide derivative", *Cancer Res.*, 45, 128-134, 1985.
100. Lopez-Berestein G, Mehta K, Mehta R, Juliano RL, Hersh EM, "The activation of human monocytes by liposome-encapsulated muramyl dipeptide analogues", *J. Immunol.*, 130, 1500-1504, 1983.
101. Fogler WE, Wade R, Brundish DE, Fidler IJ, "Distribution and fate of free and liposome-encapsulated [<sup>3</sup>H] nor-muramyl dipeptide and [<sup>3</sup>H] muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine in mice", *J. Immunol.*, 135, 1372-1377, 1985.
102. Fidler IJ, Sone S, Smith SD, Fogler WE, Braun DG, Tarcsay L, Gisler RJ and Schroit A, "Selective delivery of drugs encapsulated in liposomes: natural targeting to macrophages involved in various disease state", *J. Biol. Response Modif.*, 2, 97-100, 1983.
103. Pabst MJ, Cummings NP, Shiba T, Kumusoto S, Kotani S, "Lipophilic derivative of muramyl dipeptide in priming macrophages to release superoxide anion", *Infect. Immun.*, 29, 617-622, 1980.
104. Nishimura K, Okumar H, Okuyama H, Azuma I, "Activation of mouse peritoneal adherent cells in N-acetyl muramyl dipeptide derivatives", *Infect. Immunol.*, 47, 665-669, 1985.

105. Kotani S, Takada H, Tsujimoto M, Kubo T, Ogawa I, Azuma I, Ogawa H, Matsumoto K, Siddiqui WA, Tanaka A, Nagao S, Kohashi O, Kanoh S, Shiba T, Kusomoto S, "Nonspecific and antigen-specific stimulation of host defence mechanisms by lipophilic derivatives of muramyl dipeptides", dans "Bacteria and Cancer", (Ed. Jeljaszewicz J, Pulvere G, Roszkowski E), London : Academic Press, 67-107, 1982.
106. Uemura K, Nicolotti RA, Six HR and Kinsky SC, "Antibody formation in response to liposomal model membranes sensitized with N-substituted phosphatidylethanolamine derivatives", *Biochemistry*, 13, 1572-8, 1974.
107. Zurker K, Krebs A, "Cutaneous Side effects of Systemic Drugs", a commented synopsis of today's drugs, (Ed. Karger B), Academic Press : London, 43-55, 1980.
108. Gutierrez C., Gaspar L, Muro R, Kreisler M, Ferriz P, "Autoimmunity in patients with spanish toxic oil syndrome", *Lancet*, 1: 8325, 644, 1983.
109. Pestana A, Munoz E, "Anilides and the spanish toxic oil syndrome", *Nature*, 298, 608, 1982.
110. Mc Guire WP, Rowinsky EK, Rosenhein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, Donehower RC, "Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms", *Ann. Intern. Med.*, 111, 273-79, 1989.
111. Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, Forman AD, Newton LK, Raber MN, Buzdar AU, Frye DK, Hortobagyi GN, "Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer", *J. Natl. Cancer Inst.*, 83, 1797-805, 1991.
112. Jacobson MA, Mc Grath MS, Joseph P, Molaghan JB, Tadeipalli S, Quinn R, "Zidovudine-induced fever", *J.AIDS*, 2, 382-8, 1989.
113. Torres RA, Lin RY, Lee M, Barr MR, "Zidovudine-induced leukocytoclastic vasculitis", *Arch. Intl. Med.*, 152, 850-1, 1992.
114. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto M, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, Janotta F, Aksami A, Martin MA, Fauci AS, "Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy", *Science*, 233, 1089-1093, 1986.
115. Ho DD, Rota JR, Hirsch MS, "Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III", *J. Clin. Invest.*, 7, 1712-1715, 1986.

116. Price RW, Brew B, Sidtis J, Rosenblum M, Scheck A, Cleary P, "The brain in AIDS: Central nervous system HIV Infection and AIDS Dementia Complex", *Science*, 239, 586-592, 1988.
117. Embreston J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Pizzo PA, Fauci AS, Tenner-Racz K, Haase AT, "Massive convert infection of T helper lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS", *Nature*, 362, 359-362, 1993.
118. Mitsuya H, Popovic M, Yarchoan R, "Suramin protection of T cells in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III", *Science*, 226, 172-174, 1984.
119. Sandstrom EG, Kaplan JC, Byington RE, Hirsch MS, "Inhibition of human T-cells lymphotropic virus type III in vitro by phosphonoformate", *Lancet*, I, 1480-1481, 1985.
120. Dormont D, Spire B, Barré-Sinoussi F, "Inhibition of RNA dependent DNA polymerases of two primate retroviruses (LAV and simian AIDS virus) by ammonium-21-tungsto-9-antimoniate (HPA-23)", *Ann. Inst. Pasteur Virol.*, 136E, 75, 1985.
121. Cooney DA, Dalal M, Mitsuya H, "Initial studies on the cellular pharmacology of 2'-3'-dideoxycytidine, an inhibitor of HTLV-III infectivity", *Biochem. Pharmacol.*, 35, 2065-2068, 1986.
122. Cooney DA, Ahluwalia G, Mitsuya H, "Initial studies on the cellular pharmacology of 2'-3'-dideoxyadenosine, an inhibitor of HTLV-III infectivity", *Biochem. Pharmacol.*, 36, 1765-1768, 1987.
123. Horwitz JP, Chua J, Noel M, "Nucleosides. XI. 2'-3'-dideoxycytidine", *J. Org. Chem.*, 32, 817-818, 1967.
124. Starnes MC, Cheng YC, "Cellular metabolism of 2'-3'-dideoxycytidine, a compound active against human immunodeficiency in vitro", *J. Biol. Chem.*, 262, 988-991, 1987.
125. Horwitz JP, Chua JL, Noel M, "Nucleosides. V. The monomecylates of 1-(2'-deoxy-beta-D-lyxofuranosyl) thymine", *J. Org. Chem.*, 29, 2076-2078, 1964.
126. Ostertag W, Roesler G, Krieg CJ, Kind J, "Introduction of endogenous virus and thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by friend virus", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 7, 4980-4985, 1974.

127. Lin TS, Prusoff WH, "Synthesis and biological activity of several amino analogues of thymidine", *J. Med. Chem.*, 21, 109-112, 1978.
128. Elwell LP, Ferone R, Freeman GA, "Antibacterial activity and mechanism of action of 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U)", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31, 274-280, 1987.
129. Mitsuya H, Broder S, "Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/ lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2'-3'-deoxynucleotides", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 1911-1915, 1986.
130. Zimmerman TP, Mahony WB, Prus KL, "3'-azido-3'-deoxythymidine. An unusual nucleoside analogue that permeates the membrane of human erythrocytes and lymphocytes by nonfacilitated diffusion", *J. Biol. Chem.*, 262, 5748-5754, 1987.
131. Klecker RW, Collins JM, Yarchoan R, Thomas R, Jenkins JF, Broder S, Meyers CE, "Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine: a novel pyrimidine analog with potential application for the treatment of patients with AIDS and related diseases", *Clin. Pharmacol. Ther.*, 41, 407-412, 1987.
132. Fischl MA, Richman DD, Gierco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Schooley RT, Jackson GG, Durack DT, King D, "The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS related-complex. A double blind placebo control trial", *N. Engl. J. Med.*, 317, 185-191, 1987.
133. Richman DD, Fischl MA, Gierco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Schooley RT, Jackson GG, Durack DT, Hirsch MS, Nusinoff-Lehrman SN, "The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial", *N. Engl. J. Med.*, 317, 192-197, 1987.
134. Epstein LG, Sharer LR, Cho ES, Myenhofer M, Navia BA, Price RW, "HTLV-III-like retrovirus particles in the brains of patients with AIDS encephalopathy", *AIDS Res.*, 14, 447-454, 1984.
135. Chayt KJ, Harper ME, Marselle LM, Lewin EB, Rose RN, Oleske JM, Epstein LG, Woong Staal F, Gallo RC, "Detection of HTLV-III RNA in lungs of patients with AIDS and pulmonary involvement", *J. Amer. Med. Assoc.*, 256, 2356-2359, 1986.

136. Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, Lampert PA, Oldstone MBA, "Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 7089-7093, 1986.

137. Veal GJ, Back D, "Metabolism of Zidovudine", *Gen. Pharm.*, 7, 1469-1475, 1995.

138. Konig H, Behr E, Lower J, Kurth R, "Azidothymidine triphosphate is an inhibitor of both human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase and DNA polymerase gamma", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, 2109-14, 1989. 139. Henin Y, Gouyette C, Schwartz O, Debouzy JC, Newman JM and Huyn-Dinh T, "Lipophilic glycosyl phosphotriester derivatives of AZT: synthesis, NMR, transmembrane transport study and antiviral activity", *J. Med. Chem.*, 34, 1830-7, 1991.

140. Meyer KL, Marasco CJ, Morris Natschke SL, Ishaq KS, Piantadosi C, "In vitro evaluation of phosphocholine and quaternary ammonium containing lipids as novel anti-HIV agents", *J. Med. Chem.*, 34, 1377-1383, 1991.

141. Piantadosi C, Marasco CJJ, Morris Natschke SL, Meyer KL, Gumus F, Surles JR, Ishaq KS, Kucera LS, Iyer N, Wallen CA, "Synthesis and evaluation of novel ether nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity", *J. Med. Chem.*, 34, 1408-1414, 1991.

142. Kawaguchi T, Ishikawa K, Seki T, Juni K, "Ester prodrugs of Zidovudine", *J. Pharm. Sci.*, 79: 6, 531-33, 1990.

143. Bibby DC, Charman WN, Charman SA, Iskander MN, Porter CJH, "Synthesis and evaluation of 5' alkyl ester prodrugs of zidovudine for directed lymphatic delivery", *Int. J. Pharmaceutics*, 144, 61-70, 1996.

144. Aggarwal SK, Gogu SR, Rangan SRS, Agrawal KC, "Synthesis and biological evaluation of prodrugs of AZT", *J. Med. Chem.*, 33, 1505-1510, 1990.

145. Chu CK, Bhadti VS, Doshi KJ, Etse JT, Gallo JM, Boudinot FD, Schinazi RF, "Brain targeting of anti-HIV nucleosides: synthesis and in vitro and in vivo studies of dihydropyridine derivatives of 3'-azido-3'-dideoxyuridine and 3'-azido-3'-deoxythymidine", *J. Med. Chem.*, 33, 2188-2192, 1990.

146. Brewster E, Anderson W, Bodor N, "Brain, blood and cerebrospinal fluid distribution of a zidovudine chemical delivery system in rabbits", *J. Pharm. Sci.*, 80, 843-846, 1991.

147. Tsuzuki N, Hama T, Kawada M, Hasui A, Ryoji K, Shiwa S, Ochi Y, Futaki S, Kitagawa K, "1. Adamantane as brain-directed drug carrier for poorly absorbed drug. 2. AZT derivatives conjugated with 1-Adamantane moiety", *J. Pharm. Sci.*, 83, 481-484, 1994.
148. Curley D, Mcguigan C, Devine KG, O'Connor TJ, Jeffries DJ, Kinchington D, "Synthesis and anti-HIV evaluation of some phosphoramidate derivatives of AZT: studies on the effect of chain elongation on biological activity", *Antiviral Res.*, 14, 345-356, 1990.
149. Richman DD, Kornbluth RS, Carson DA, "Failure of dideoxynucleosides to inhibit human immunodeficiency virus replication in cultured human macrophages", *J. Exp. Med.*, 166, 1144-1149, 1987.
150. Stetcher BN, Pesce AJ, Murray JA, Hurtubise PE, Vine WH, Frame PT, "Concentrations of phosphorylated zidovudine (ZDV) in patient leukocytes do not correlate with ZDV dose or plasma concentrations", *Ther. Drug Monit.*, 13, 325-331, 1991.
151. McGuigan C, Pathirana R, Mahmood N, Devine KG, Hay A, "Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV-1 in cell lines which are resistant to the action of AZT", *Antiviral Res.*, 17, 311-321, 1992.
152. Puech F, Gosselin G, Lefebvre I, Pompon A, Aubertin AM, Kirn A, Imbach JL, "Intracellular delivery of nucleoside monophosphate through a reductase-mediated activation process", *Antiviral Res.*, 22, 155-174, 1993.
153. Hostetler KY, Richman DD, Carson DA, Stuhmiller LM, van Wijk GM, van den Bosch H, "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3'-deoxythymidine", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 2025-9, 1992.
154. Sastry JK, Nehete PN, Khan S, Nowak BJ, Plunkett W, Arlinghaus RB, Farquhar D, "Membrane-permeable dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human immunodeficiency virus infection", *Mol. Pharmacol.*, 41, 441-445, 1992.
155. Gosselin G, Périgaud C, Lefebvre I, Pompon A, Aubertin AM, Kirn A, Szabo T, Stawinski J, Imbach JL, "5'-hydrogenophosphonates of anti-HIV nucleoside analogues revisited: controversial mode of action", *Antiviral Res.*, 22, 143-153, 1993.
156. Steim JM, Camaioni Neto C, Sarin PS, Sun DK, Sehgal RK, Turcotte JG, "lipid conjugates of antiretroviral agents, I. Azidothymidine-monophosphate-diglyceride: anti HIV activity, physical properties and

interaction with plasma proteins", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 451-457, 1990.

157. Namane A, Gouyette C, Fillion MP, Fillion G, Huynh-Dinh T, "Improved brain delivery of AZT using a glycosyl phosphotriester prodrug", *J. Med. Chem.*, 35, 3039-3044, 1992.

158. Magnani M, Casabianca A, Fraternali A, Brandi G, Gessani S, Williams R, Giovane M, Damonte G, De Flora A, Benatti U, "Synthesis and targeted delivery of an azidothymidine homodinucleotide conferring protection to macrophages against retroviral infection", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 4403-4408, 1996.

159. Kumar R, Wang L, Wiebe LI, Knaus EI, "Synthesis, in vitro biological stability, and anti-HIV activity of 5-halo-6-alkoxy (or azido)-5, 6-dihydro-3'-azido-3'-deoxythymidine diastereomers as potential prodrugs to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)", *J. Med. Chem.*, 37, 4297-4306, 1994.

160. Wang L, Morin K, Kumar R, Cheraghali M, Todd KG, Baker GB, Knaus EE, Wiebe LI, "In vitro biodistribution, pharmacokinetic parameters, and brain uptake of 5-halo-6-methoxy (or ethoxy)-5, 6-dihydro-3'-azido-3'-deoxythymidine diastereomers as potential prodrugs to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)", *J. Med. Chem.*, 39, 826-833, 1996.

161. Fox CH, Tenner-Racz K, Racz P, Firpo A, Pizzo PA, Fauci AS, "Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA", *J. Inf. Dis.*, 164, 1051-1057, 1991.

162. Embreston J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase AT, "Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS", *Nature*, 362, 359-362, 1993.

163. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS, "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease", *Nature*, 362, 355-358, 1993.

164. Schwendener RA, Gowland P, Horber DH, Zahner R, Schertter A, Schott H, "New lipophilic alkyl/acyl dinucleoside phosphates as derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine: Inhibition of HIV-I replication in vitro and antiviral activity against Rouscher Leukemia virus infected mice with delayed treatment regimens", *Antiviral Res.*, 24, 79-93, 1994.

165. Squalli Houssaini H, Pierlot C, Kusnierz JP, Parmentier B, Martin-Nizard F, Lestave Delattre S, Tartar A, Fruchart JC, Sergheraet C, Duriez P,

"Preparation of anti-HIV-low-density lipoprotein complexes for delivery of anti-HIV drugs via the low-density lipoprotein pathways", *Biotech. Therapeutics*, 5, 69-85, 1994.

166. Heiati H, Tawashi R, Shivers R, Phillips NC, "Solid lipid nanoparticles as drug carriers I. Incorporation and retention of the lipophilic prodrug 3-azido-3'-deoxythymidine palmitate", *Intern. J. Pharmaceutics*, 147, 123-131, 1997.



**Chapitre I** *Synthèse, caractérisation et incorporation des promédicaments lipophiles d’AZT dans les liposomes*

Il a été prouvé que les liposomes sont de bons transporteurs de médicaments dans plusieurs sortes de thérapies incluant les immunomodulateurs, les virostatiques, les cytostatiques ainsi que les agents antimicrobiens [1-4]. Les liposomes ont aussi été utilisés dans le transport des agents nucléosidiques anti VIH-1 [5] et de leurs promédicaments [6-7].

La synthèse de promédicaments amphiphiles utilisant des chaînes membranaires lipophiles a déjà été utilisée afin d'améliorer l'incorporation et la rétention des médicaments hydrosolubles dans les porteurs liposomaux (ex. Les muramyltripeptides [8], les agents chimiothérapeutiques comme le 5-fluorouracil [9] et les analogues nucléosidiques comme le 3'-azido-3'-désoxythymidine [10]).

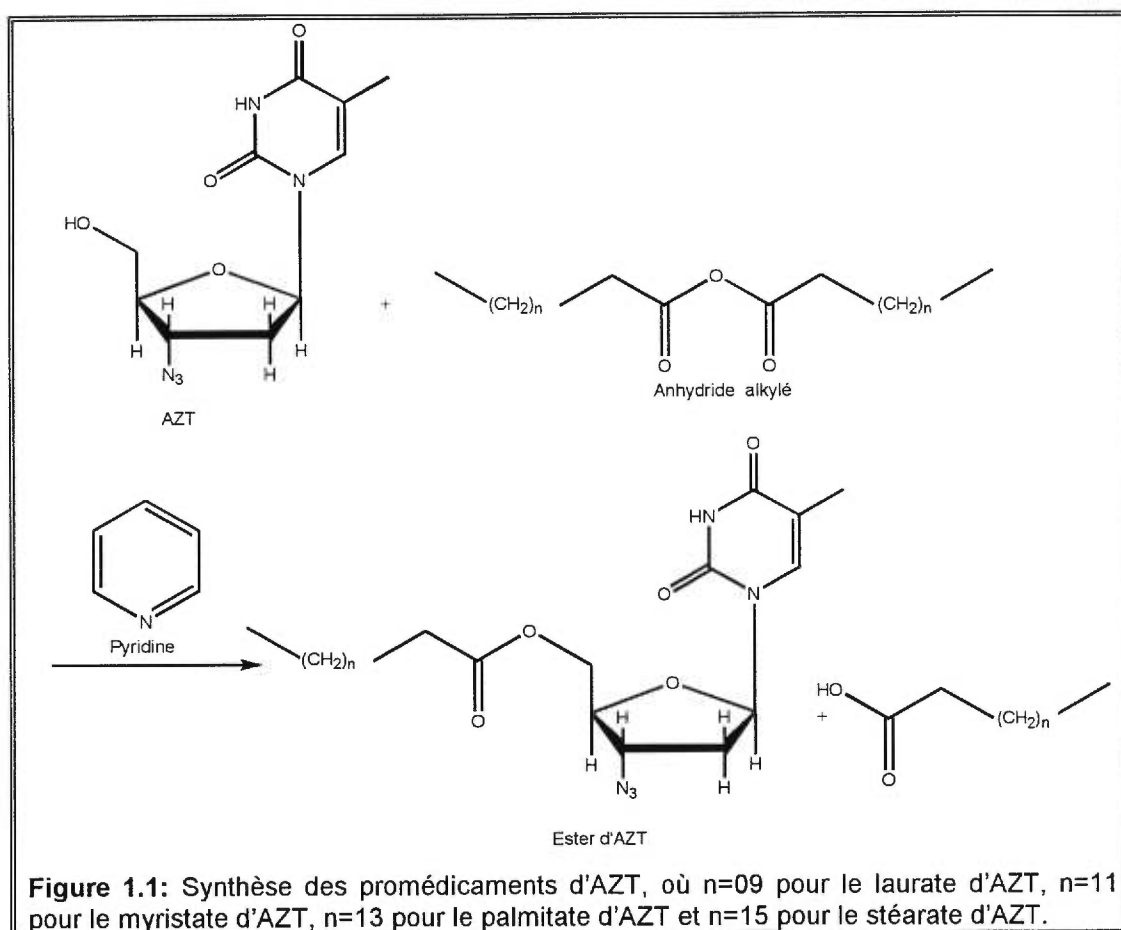
Le 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT), un médicament hydrophile possédant une activité inhibitrice de la transcriptase inverse [11-14], est présentement utilisé seul ou en combinaison avec d'autres inhibiteurs de la transcriptase inverse pour le traitement de l'infection par le VIH. Depuis une dizaine d'année, un nombre important de promédicaments d'AZT est synthétisé afin d'améliorer l'activité antivirale ainsi que la biodisponibilité de ce médicament dans le sang [15-17]. Plusieurs chercheurs ont démontré la nécessité de l'utilisation des promédicaments lipophiles afin d'augmenter la demi-vie de l'AZT suite à son administration orale [18]. La susceptibilité à l'hydrolyse chimique et enzymatique *in vitro* des dérivés de l'AZT (utilisant des homogénats de plasma, de foie, d'intestin et de rein de souris) a préalablement été décrite par Kawaguchi et al. [18]. Ces esters d'AZT, relativement stables à l'hydrolyse chimique (dégradation < 10% après 100 heures à des pH de 4 et 7), avaient une hydrolyse enzymatique variant avec la longueur de la chaîne alkylée, les chaînes courtes et longues étant relativement plus stables que les chaînes moyennes.

Dans ce chapitre, on décrit la synthèse, la caractérisation ainsi que la rétention de quatre esters lipophiles d'AZT différents (le laurate, myristate, palmitate et stéarate d'AZT), préalablement synthétisés par Kawaguchi et al. [18]. Bien que plusieurs de ces promédicaments ont déjà été étudiés séparément [19, 20], leur incorporation dans les liposomes ainsi que l'étude de la variation de leur taille et de leur potentiel zêta, lorsque administrés dans des porteurs liposomaux, restent à déterminer.

## 1.1 PARTIE EXPÉRIMENTALE

**1.1.1 Produits.** Le dimyristylphosphatidylglycérol (DMPG) ainsi que le dipalmitylphosphatidylcholine (DPPC) ont été obtenus de chez Avanti Polar Lipids, (Alabaster, AL). Les anhydrides (laurique, myristique, palmitique et stéarique) ont été fournis par Sigma Chemicals Co. (St-Louis, MO).

### 1.1.2 Synthèse des dérivés lipophiles d'AZT



L'ester d'AZT a été synthétisé selon la méthode décrite par Kawaguchi et al. [18]. L'estérification de l'AZT (0,33 mmol) utilisant (0,66 mmol) de l'anhydride alkylé a eu lieu dans de la pyridine (2 ml) sur une période de 24 heures à une température de 22°C. L'ester a été purifié par chromatographie, où la phase stationnaire est le gel de silice et la phase mobile est le CHCl<sub>3</sub>: Et-OH (95:5 v/v). Le dérivé d'AZT a été caractérisé par spectroscopie [<sup>1</sup>H]-RMN, analyse élémentaire et infrarouge. La pureté ainsi que la stabilité ont été déterminées par chromatographie sur couche mince (CCM) (95:5 v/v CHCl<sub>3</sub>: EtOH).

**1.1.3 Préparation des liposomes.** Toute la verrerie a été stérilisée à 180 °C pour 4 heures afin d'inactiver les endotoxines bactériennes. Les liposomes ont été préparés à partir du DPPC/DMPG, utilisant un rapport molaire de 9:1. Les phospholipides et l'ester de l'AZT (1 μmol dans 10 μmol phospholipides) ont été dissous dans du 2-méthylpropan-2-ol tiède (t-butanol), congelés à -40°C dans des contenants de verre de 5 ml. Les liposomes ont été préparés par réhydratation avec du tampon salin phosphate PBS (0,85% p/v NaCl contenant 10 mM de phosphate de sodium à un pH de 7,4), (1 ml de PBS/ 10 μmol de phospholipides). Les préparations liposomales ont été réduites de taille dans un bain à sonication à 10 W, 15 minutes avant d'être utilisées.

**1.1.4 Caractérisation des liposomes.** La taille des liposomes a été déterminée par spectroscopie de corrélation de photons (Coulter 4N Plus). Le potentiel zêta (ζ) des liposomes a été déterminé par électrophorèse Doppler (Coulter DELSA 440 SX).

**1.1.5 Incorporation des esters d'AZT dans les liposomes.** Les liposomes contenant l'ester d'AZT ont été mis en suspension dans du PBS (1 ml) formant une solution colloïdale. Les échantillons ont ensuite été placés dans des tubes à dialyse (MW cut-off 15000 Da), et dialysés contre du PBS (250 ml) à 4, 22 ou 37°C. L'ester d'AZT liposomal restant dans le tube à dialyse a été quantifié par spectrophotométrie UV sur une période de 24 h à une longueur d'onde de 266nm.

## 1.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

**1.2.1 Synthèse et caractérisation des promédicaments d'AZT.** L'analyse élémentaire (Tableau I.I), l'infrarouge ainsi que la spectroscopie [<sup>1</sup>H]-RMN ont été caractéristiques des esters de l'AZT. Le rendement ainsi que le point de fusion du produit était dans la moyenne déterminée par Kawaguchi et al. [18]. En regardant la variation du point de fusion dans le tableau I.III, on remarque une légère augmentation de la valeur en allant de laurate à stéarate. Ceci est dû à l'augmentation de la force de Van der Waals avec la croissance de la chaîne aliphatique. Chaque groupement méthyl ajouté à la chaîne alkylée fournit un contact additionnel entre les deux molécules de promédicaments donnant lieu à une augmentation de la force d'attraction et, simultanément, à une élévation du point de fusion. Bien que l'analyse élémentaire expérimentale (Tableau I.I) montrait une légère déviation par rapport à la théorie (Tableau I.II), l'identité des esters d'AZT a été prouvée par les spectres infrarouge et RMN donnant des pics identiques à ceux de la théorie [20]. Quant à la pureté des promédicaments, la chromatographie sur couche mince montrait la présence d'une seule tache ayant un R<sub>f</sub> différent de celui des deux produits de départ (Tableau I.III).

**Tableau I.I. Analyse élémentaire expérimentale des esters lipophiles d'AZT (moyenne ± écart type, n=3)**

% atomique	Laurate d'AZT	Myristate d'AZT	Palmitate d'AZT	Stéarate d'AZT
Azote	10,31±0,08	9,78±0,07	12,42±0,05	6,73±0,23
Carbone	62,95±0,25	64,54±0,16	63,01±0,17	70,09±0,33
Hydrogène	9,37±0,36	9,73±0,29	9,19±0,03	10,98±0,06

**Tableau I.II. Analyse élémentaire théorique des esters lipophiles d'AZT**

% atomique	Laurate d'AZT	Myristate d'AZT	Palmitate d'AZT	Stéarate d'AZT
Azote	15,57	14,66	13,84	13,12
Carbone	58,73	60,30	61,70	62,96
Hydrogène	7,79	8,17	8,50	8,81

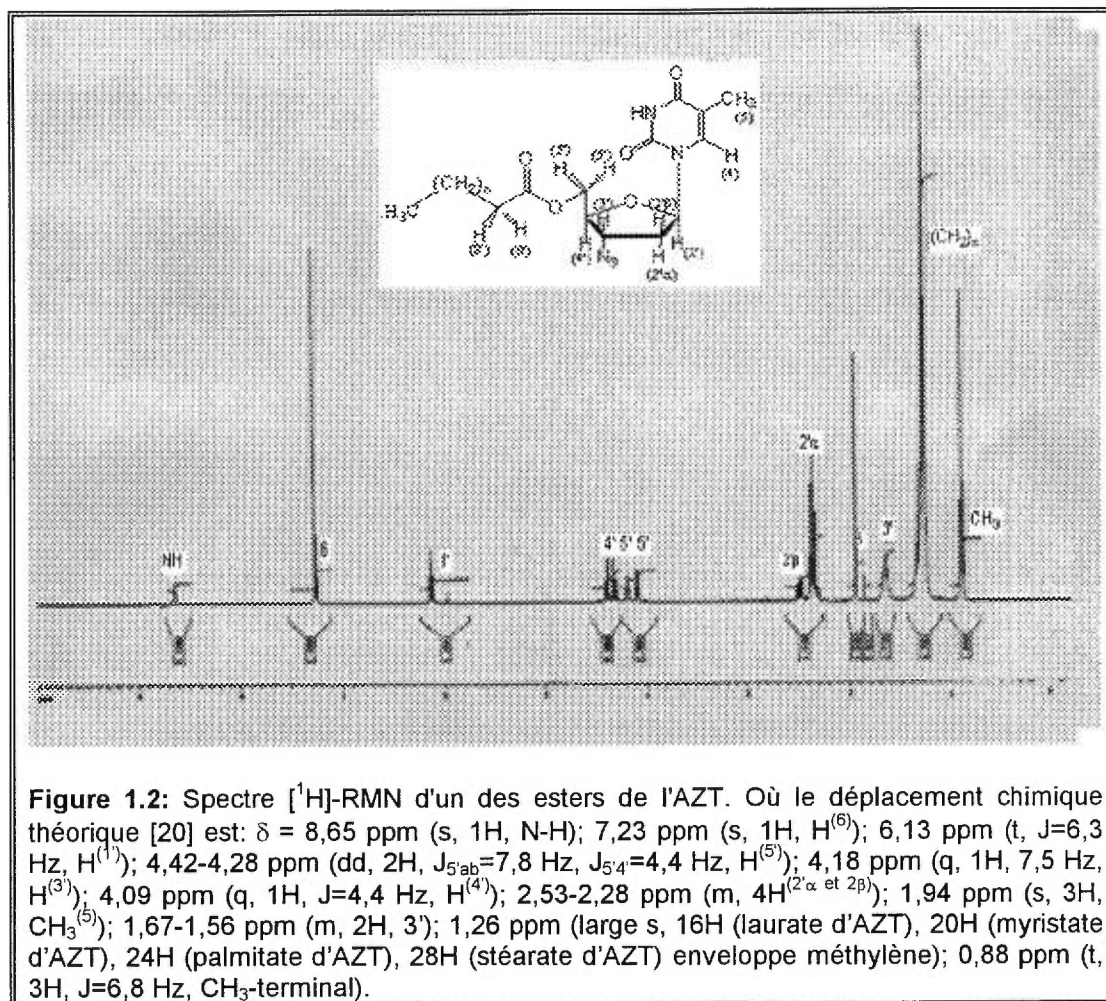
**Tableau I.III. Propriétés physiques des promédicaments d'AZT**

Ester d'AZT (C <sub>12</sub> -C <sub>18</sub> )	Point de fusion (°C)		R <sub>F</sub> (95-5% V/V) CHCl <sub>3</sub> /EtOH	Rendement (%)	Masse molaire (g/mol)
	Exp*	Théo*			
Laurate d'AZT	35-37	34-36	0,240	99,60	449,54
Myristate d'AZT	40-43	39-42	0,280	68,68	477,64
Palmitate d'AZT	54-57	54-57	0,650	67,00	505,69
Stéarate d'AZT	62-65	41-42	0,255	94,15	533,69

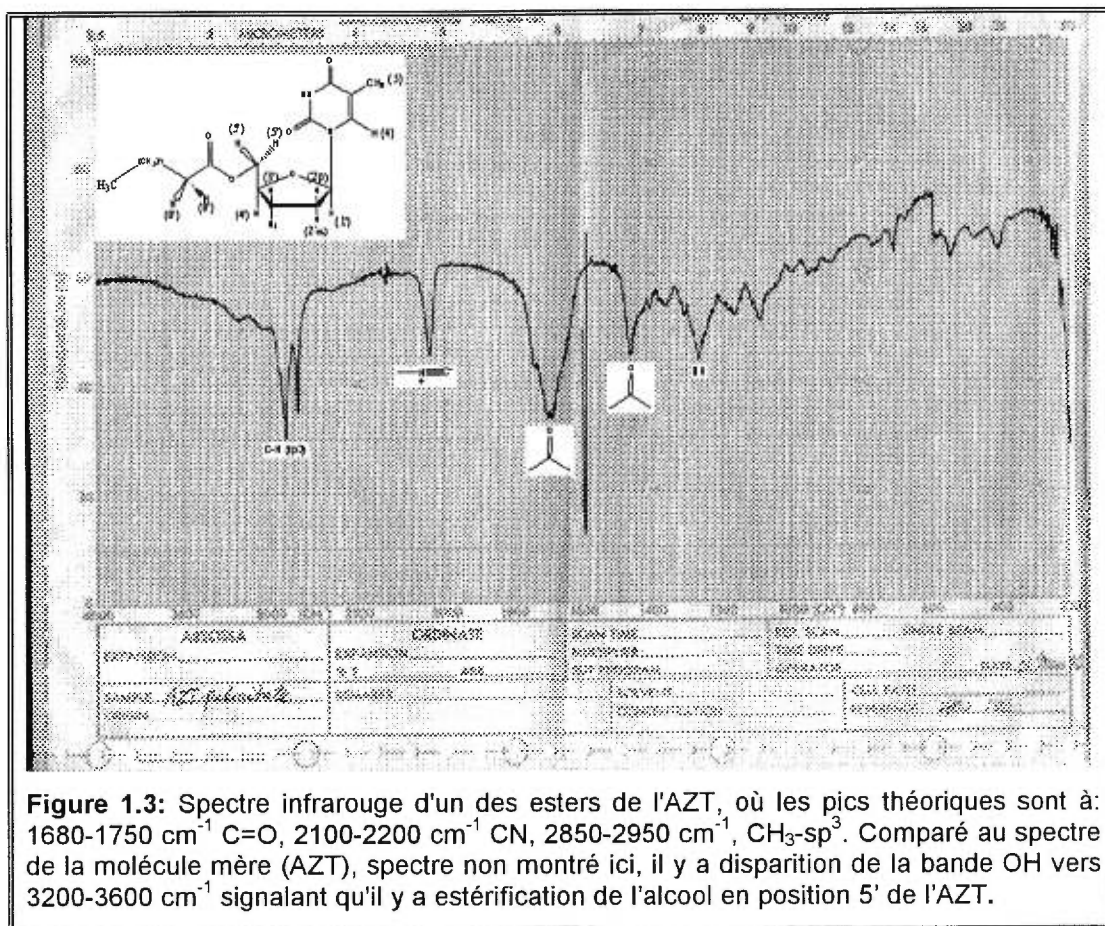
\*Exp = valeur expérimentale et Théo = valeur théorique [18].



**1.2.1.1 Spectre  $^1\text{H}$ -RMN des promédicaments de l'AZT.** Les promédicaments lipophiles synthétisés ont tous le même patron d'RMN sauf au niveau de l'avant dernier pic mentionné ici-bas. Vu qu'ils ne diffèrent que par la longueur de leur chaîne aliphatique, les atomes ont le même environnement chimique.



**1.2.1.2 Spectre infrarouge (NaCl) des promédicaments de l'AZT.** Les dérivés d'AZT synthétisés dans ce chapitre possèdent tous le même environnement chimique et ont tous le même patron d'IR.



**1.2.2. Caractérisation des promédicaments liposomaux d'AZT.** La taille ainsi que le potentiel  $\zeta$  des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG contenant l'ester d'AZT ont été déterminés dans du PBS. Le diamètre des liposomes contenant les promédicaments variait entre 120-160 nm et on remarque une légère augmentation de la taille des esters d'AZT avec une croissance de la chaîne aliphatique ( $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ ) (Figure 1.8). Le potentiel  $\zeta$  négatif des liposomes contenant l'ester d'AZT (-8,91 à -10,23 mV) (Tableau I.IV) est associé aux phospholipides chargés négativement (DMPG).

**Tableau I.IV. Variation du potentiel  $\zeta$  des liposomes contenant les dérivés lipophiles d'AZT ((moyenne  $\pm$  écart type, n=10,000)**

Liposomes contenant l'ester d'AZT (C <sub>12</sub> -C <sub>18</sub> )	Potentiel $\zeta$ (mV)
DPPC/DMPG (liposomes vides)	-8,47 $\pm$ 1,13
Laurate d'AZT (DPPC/DMPG)	-9,51 $\pm$ 1,34
Myristate d'AZT (DPPC/DMPG)	-8,91 $\pm$ 1,53
Palmitate d'AZT (DPPC/DMPG)	-9,65 $\pm$ 0,29
Stéarate d'AZT (DPPC/DMPG)	-10,23 $\pm$ 1,23

**1.2.3 Rétention des promédicaments de l'AZT dans les liposomes.** La libération des promédicaments d'AZT des liposomes a été calculée selon l'équation suivante:

$$\% \text{ de libération} = \frac{\text{concentration (à } t = 0\text{h)} - \text{concentration (t = t')}}{\text{concentration initiale}} \times 100 \quad (1)$$

Où la concentration (à t = 0h) correspond à la quantité initiale du promédicament d'AZT présente dans la préparation liposomale suite à son hydratation. Et la concentration (t = t') correspond à la quantité finale du promédicament d'AZT présente dans la préparation liposomale suite à sa dialyse pour le nombre d'heures correspondant.

Une des caractéristiques importantes des membranes lipidiques est l'existence de la température de transition de phase, où les chaînes d'hydrocarbure des phospholipides subissent une transformation d'un état ordonné (gel) à un état désordonné (liquide cristallin) [21]. L'état physique de la double couche affecte la perméabilité, le taux de libération ainsi que la stabilité totale des liposomes [21]. La libération des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG et contenant l'ester de l'AZT dans du PBS était différente

pour les quatre sortes de promédicaments suite à leur incubation à 4, 22 ou 37°C (Figures 1.5, 1.6 et 1.7). On remarque qu'il y a absence de relation entre le nombre de carbones et le degré de rétention. Ce dernier est meilleur pour le palmitate d'AZT et le laurate d'AZT (rétention plus longue) aux trois différentes températures. Ceci est dû à l'augmentation de la fluidité de la membrane (de l'état gel en état liquide cristallin) qui induit une augmentation de la libération des promédicaments à travers les couches phospholipidiques.

Le Tableau V démontre que l'augmentation de la longueur de la chaîne aliphatique fait diminuer la valeur de la pente dans la courbe d'étalonnage (Figure 1.4). Comme l'absorption UV se trouve principalement dans le noyau thymine, une élongation de la chaîne aliphatique induit une augmentation de l'encombrement stérique autour du noyau et une diminution de l'absorbance de la substance.

**Tableau I.V. Variation de la pente de la courbe d'étalonnage (Figure 1.4) avec la longueur de la chaîne aliphatique des promédicaments d'AZT (moyenne  $\pm$  écart type, n=3)**

Ester d'AZT (C <sub>12</sub> -C <sub>18</sub> )	Nombre de carbones dans la chaîne aliphatique	Pente $\pm$ écart type ( $\times 10^{-4}$ ) ( $\mu\text{g/ml}$ )
Laurate d'AZT	12	156,8 $\pm$ 4,1
Myristate d'AZT	14	151,2 $\pm$ 4,0
Palmitate d'AZT	16	110,1 $\pm$ 4,5
Stéarate d'AZT	18	91,8 $\pm$ 8,8

Figure 1.4. Courbes d'étalonnage des promédicaments d'AZT où  $\lambda=266$  nm (moyenne  $\pm$  écart type, n=3)

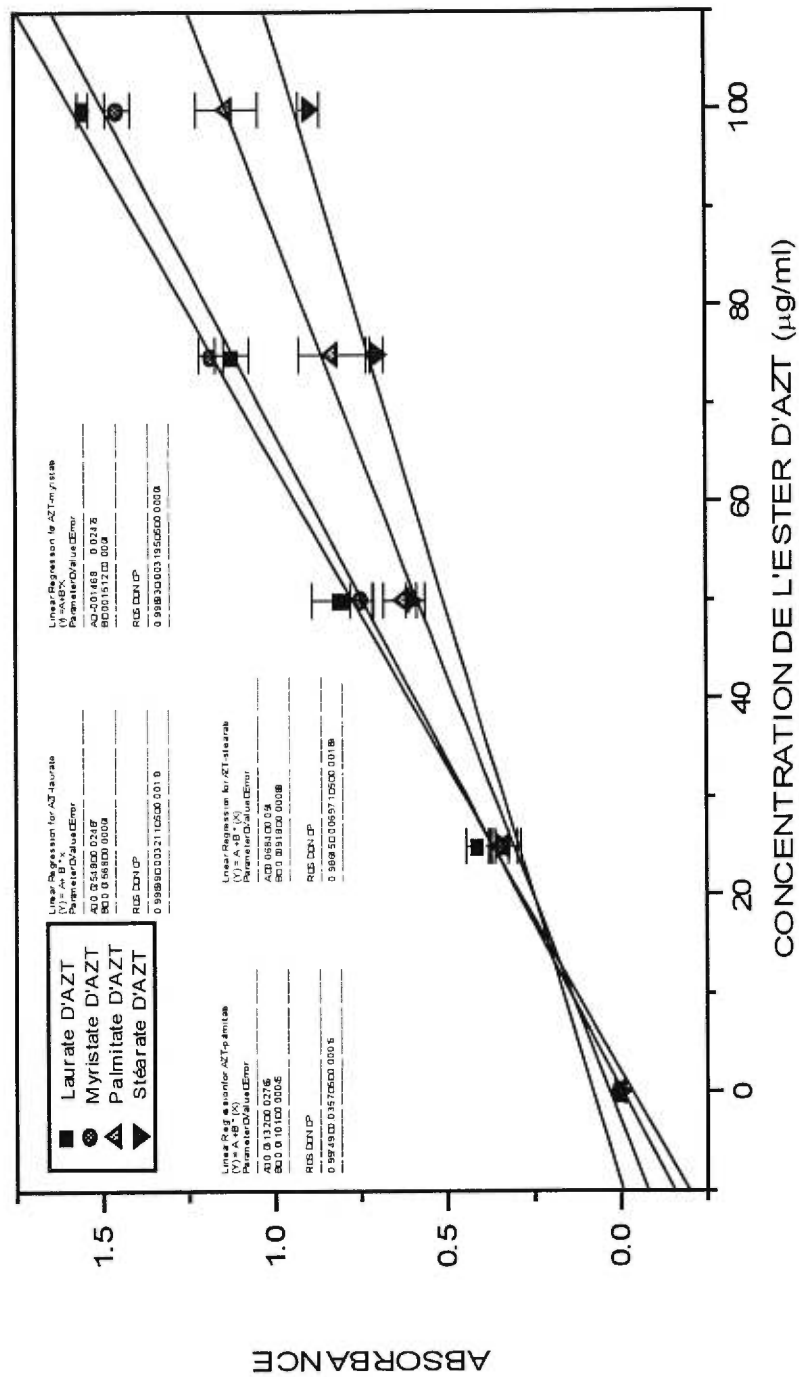


Figure 1.5. Étude de la libération des promédicaments liposomaux de l'AZT à 4°C où le milieu d'incubation est le PBS (moyenne  $\pm$  écart type, n=3)

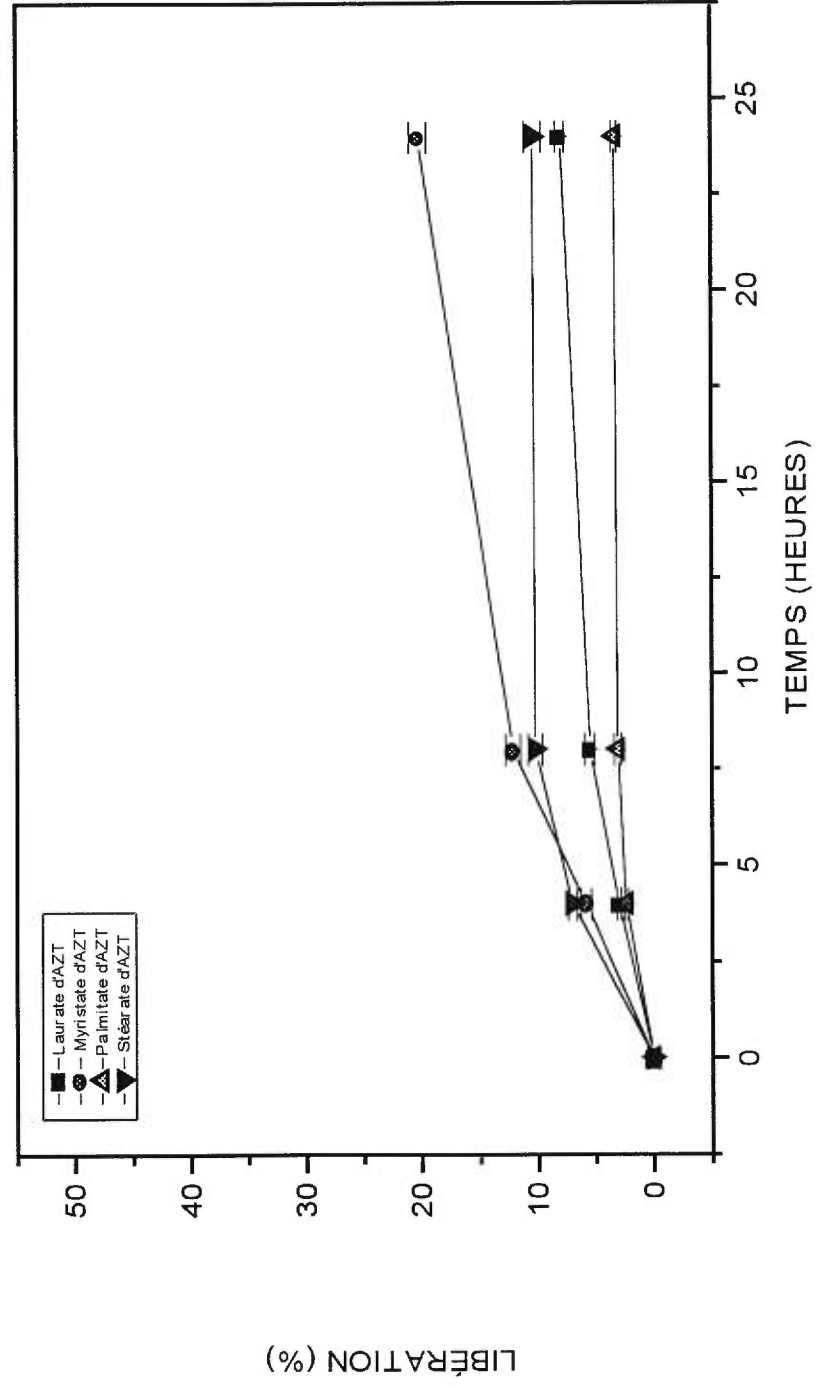


Figure 1.6. Étude de la libération des promédicaments liposomaux d'AZT à 22°C où le milieu d'incubation est le PBS (moyenne  $\pm$  écart type, n=3)

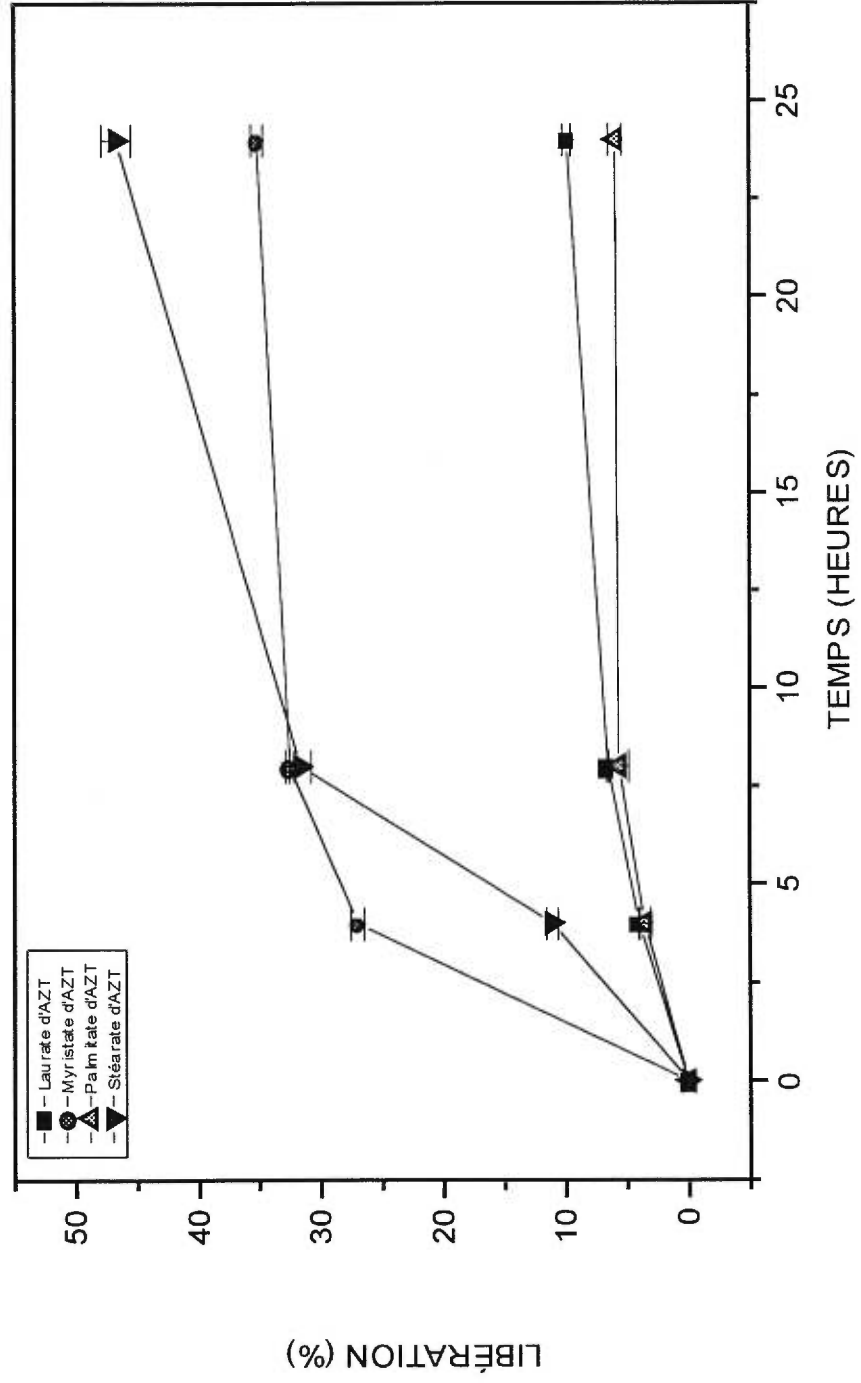


Figure 1.7. Étude de la libération des promédicaments liposomaux d'AZT à 37°C où le milieu d'incubation est le PBS (moyenne  $\pm$  écart type, n=3)

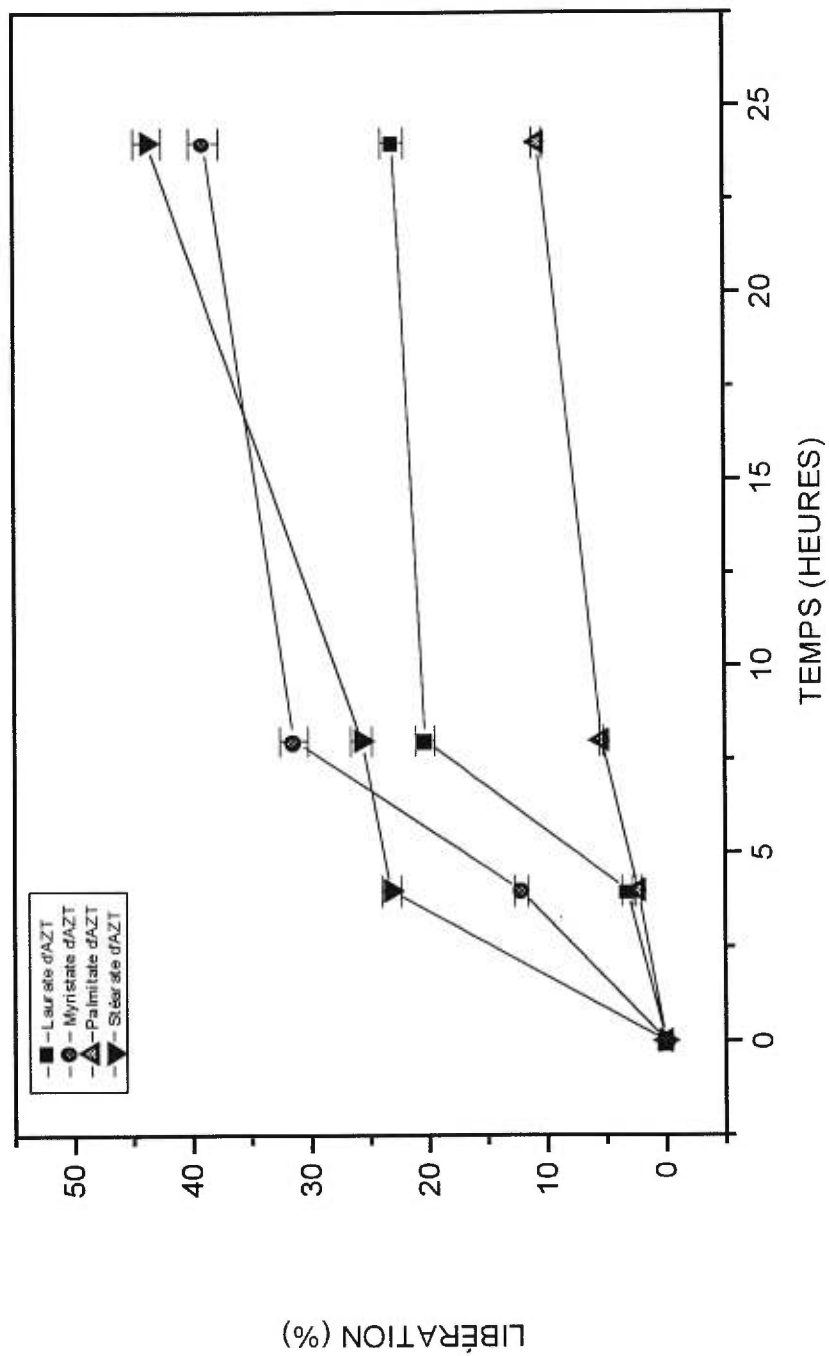
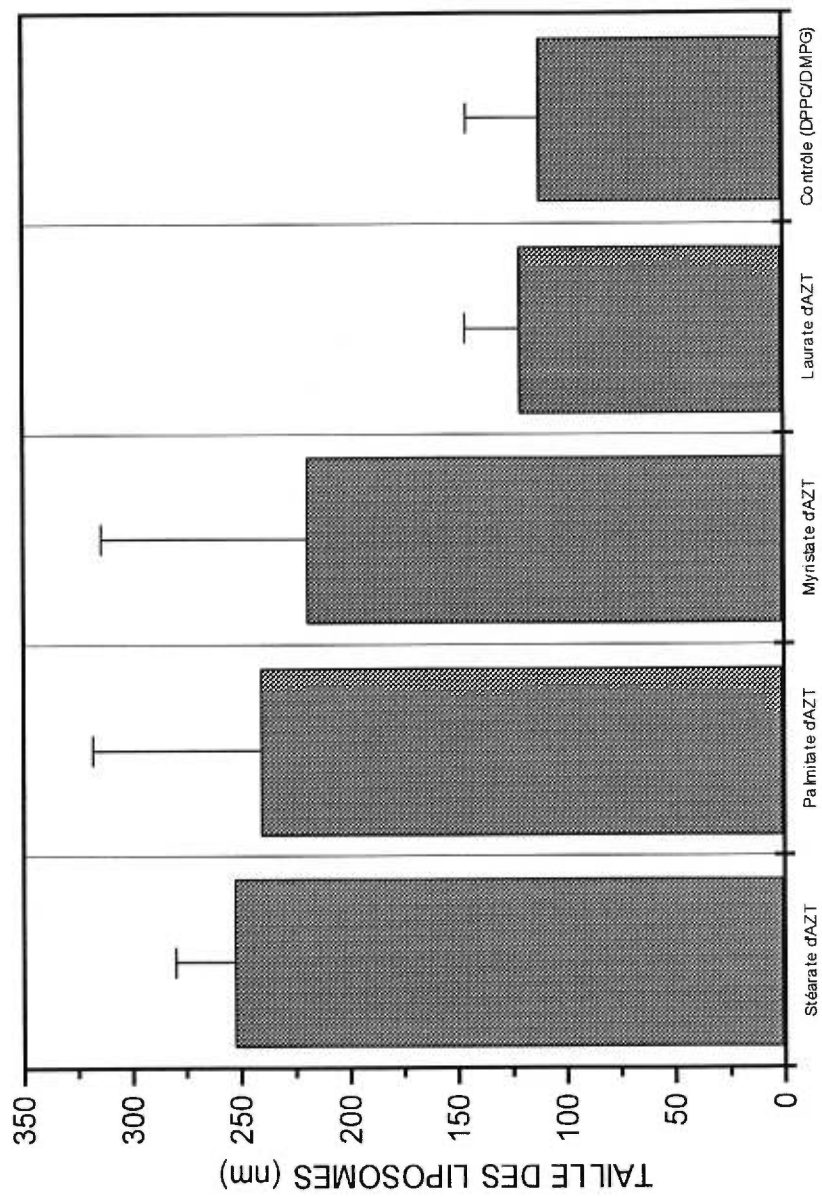




Figure 1.8. Variation de la taille des liposomes contenant les différents promédicaments d'AZT (moyenne  $\pm$  écart type, n=3)



LIPOSOMES CONTENANT LES PROMÉDICAMENTS D'AZT

### 1.3 RÉFÉRENCES

1. Daemen T, Veninga A, Roerdink FH, Schephof GL, "In vitro activation of rat liver macrophages to tumoricidal activity by free or liposomal-encapsulated muramyl dipeptide", *Cancer Res.*, 46, 4330-4335, 1986.
2. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, Barenholz Y, "Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes", *Cancer Res.*, 54, 987-992, 1994.
3. Ho, RJY, Rouse BT, Huang L, "Interactions of target-sensitive immunoliposomes with herpes simplex virus. The foundation of a sensitive immunoliposome assay for the virus", *J. Biol. Chem.*, 262, 13973-13978, 1987.
4. Karlowsky, JA, Zhanel GG, "Concepts of the use of liposomal antimicrobial agents: applications for aminoglycosides", *Clin. Infect. Dis.*, 15, 654-667, 1992.
5. Zelphati O, Degols G, Loughrey H, Leserman L, Pompon A, Puech F, Maggio AF, Imbach JL, Gosselin G, "Inhibition of HIV-1 replication in cultured cells with phosphorylated dideoxyuridine derivatives encapsulated in immunoliposomes", *Antiviral Res.*, 21, 181-195, 1993.
6. Van Borssun Waalkes, Fichtner I, Dontje B, Lemm M, Becker M, Arndt D, Scherphof GL, "In vivo distribution and antitumour activity of liposomal 3'-5'-dipalmytoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine", *J. Microencaps.*, 9, 335-345, 1992.
7. Hostetler KY, Richman DD, Carson DA, Stuhmiller LM, Van Wijk GMT, Van Der Bosch H, "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3'-deoxythymidine", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 2025-2029, 1992.
8. Fidler IJ, Sone S, Smith SD, Fogler WE, Braun DG, Tarcsay L, Gisler RJ and Schroit A, "Selective delivery of drugs encapsulated in liposomes: natural targeting to macrophages involved in various disease state", *J. Biol. Response Modif.*, 2, 97-100, 1983.
9. Elorza B, Elorza MA, Fructos G, Chantres JR, "Characterization of 5-fluorouracil located liposomes prepared by reverse phase evaporation or freeze-thawing extrusion methods: study of drug release", *Biochim. Biophys. Acta*, 1153, 135-42, 1993.

10. Hostetler KY, Stuhmiller LM, Lenting HB, Van Der Bosch H, Richman DD, "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine", *J. Biol. Chem.*, 265, 6112-7, 1990.
11. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, "3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/ Lymphadenopathy-associated virus in vitro", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 7096-100, 1985.
12. Furman PA, Fyfe JA, St-Clair MH, "Phosphorilation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of 5' triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 8333-7, 1986.
13. Nakashima H, Matsui T, Harada S, "Inhibition of repliaction and cytopathic effect of human T cell lymphotropic virus type III/ lymphadenopathy associated virus by 3'-azido-3'-deoxythymidine in vitro", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30, 933-7, 1986.
14. Yarchoan R, Klecker RW, Weinhold KJ, "Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication to patients with AIDS or AIDS-related complex", *Lancet*, 1, 575-80, 1986.
15. Aggarwal SK, Gogu SR, Rangan SR, and Aggarwal KC, "Synthesis and biological evaluation of prodrugs of Zidovudine", *J. Med. Chem.*, 33, 1505-10, 1990.
16. Henin Y, Gouyette C, Schwartz O, Debouzy JC, Newman JM and Huyn-Dinh T, "Lipophilic glycosyl phosphotriester derivatives of AZT: synthesis, NMR, transmembrane transport study and antiviral activity", *J. Med. Chem.*, 34, 1830-7, 1991.
17. Squalli-Houssaini H, Pierlot C, Kusnierz J-P, Parmentier B, Martin-Nizar F, Lestavel-Delattre S, Tartar A, Fruchart J-C, Sergheraert C and Duriez P, "Preparation of anti-HIV-Low-Density lipoprotein complexes for delivery of anti-HIV drugs via the low-density lipoprotein pathways", *Biotech. Ther.*, 5, 69-85, 1994.
18. Kawaguchi T, Ishikawa K, Seki T, Juni K, "Ester prodrugs of Zidovudine", *J. Pharm. Sci.*, 79, 531-33, 1990.
19. Heiati H, Tawashi R, Shivers RR, Phillips NC, "Solid lipid nanoparticles as drug carriers: I. Incorporation and retention of the lipophilic prodrug 3'-azido-3'-deoxythymidine palmitate", *Int. J. Pharm.*, 146, 123-131, 1997.

20. Bibby D, William NC, Charman SA, Iskander MN, Porter CJH, "Synthesis and evaluation of 5' alkyl ester prodrugs of zidovudine for directed lymphatic delivery", *Int. J. Pharm.*, 144, 61-70, 1996.

21. Liebermann HA, Rieger M, Banker G, in *Pharmaceutical dosage forms, disperse systems*, volume 2, Marcel Dekker, Inc., N.Y., 567-601, 1989.

**CHAPITRE II** *Synthèse, incorporation et rétention  
liposomales d'un promédicament radioactif d'AZT*

Le 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT), un médicament hydrophile possédant une activité inhibitrice de la transcriptase inverse [1-4], est présentement utilisé seul ou en combinaison avec d'autres inhibiteurs de cette enzyme pour le traitement de l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH). L'AZT a été le premier médicament commercialisé pour son activité inhibitrice de la réplication du VIH [1]. Dans le but d'améliorer son activité antivirale, plusieurs chercheurs ont tenté de convertir cet analogue nucléosidique en une variété de dérivés lipophiles [5-7]. L'AZT conjugué aux diacylglycérols monophosphate a démontré une activité anti-VIH comparable à celle de la molécule mère [8]. Il a été démontré que les dérivés de l'AZT contenant un hydrocarbure polaire et une chaîne hexadécyle possèdent une activité anti-VIH-1 et manifestent une grande affinité pour les membranes lipidiques [6]. De même, les éthers lipidiques liés à l'AZT par des liaisons phosphate ont montré une activité antivirale améliorée en comparaison avec celle de l'AZT libre [9, 10]. L'estérification de l'hydroxyle avec des chaînes alkylées a aussi été étudiée dans une tentative d'augmenter la rétention de l'AZT dans le corps [11], de contrôler sa concentration dans le plasma [11] et d'améliorer son transport lymphatique [12]. Par ailleurs, une série d'esters alkylés et arylés a été synthétisée par Aggarwal et al. afin d'augmenter la stabilité et la lipophilicité de l'AZT dans le but d'améliorer son transport à travers la membrane plasmique et les barrières lipidiques [5]. Hostetler et al. ont préparé des analogues phospholipidiques d'AZT possédant une activité anti-VIH-1 *in vitro* [13-15]. Les liposomes sont idéaux pour l'incorporation de ces composés antiviraux semblables aux lipides. Puisqu'ils possèdent une affinité naturelle pour les cellules du système des phagocytes mononucléés et les tissus lymphoïdes, les liposomes fournissent ainsi un nouveau moyen de transport des médicaments et des promédicaments antirétroviraux vers les cellules jouant le rôle de réservoirs aux virus [16-18].

L'incorporation liposomale et l'activité antivirale de certains dérivés lipophiles de l'AZT [19] ainsi que d'autres agents antiviraux ont largement été étudiées [20]. La molécule d'AZT seule lorsque incorporée dans des porteurs liposomaux résulte en une diminution de la toxicité au niveau de la moelle osseuse ainsi qu'en une amélioration de l'activité antivirale [21, 22]. Le palmitate d'AZT, un promédicament d'AZT préalablement synthétisé par Kawaguchi et al. [11] est mieux encapsulé et retenu dans les nanoparticules que l'AZT administré sous sa forme libre [23].

Dans ce chapitre nous décrivons la synthèse du palmitate d'AZT radioactif et évaluons le potentiel d'incorporation et de rétention de ce promédicament dans plusieurs formulations de liposomes (DPPC/DMPG; DPPC/DOPS; DPPC/CHOL) lorsque incubés dans du tampon salin phosphate (PBS) ainsi que dans un milieu plasmatique à plusieurs températures (4, 22 et 37 °C).

## 2.1 PARTIE EXPÉRIMENTALE

**2.1.1 Produits.** Le dioléylphosphatidylsérine (DOPS), le dimyristylphosphatidylglycérol (DMPG) ainsi que le dipalmitylphosphatidylcholine (DPPC) ont été obtenus de chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). L'AZT a été offert par GlaxoWellcome Inc. (Research Triangle Park, NC). Le [ $^3\text{H}$ ]-AZT, le cholestérol ainsi que l'anhydride palmitique ont été fournis par Sigma Chemicals Co. (St-Louis, MO). Le plasma de bovin frais a été obtenu de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.

**2.1.2 Synthèse du [ $^3\text{H}$ ]-palmitate d'AZT.** Le [ $^3\text{H}$ ]-palmitate d'AZT a été synthétisé selon la méthode décrite par Kawaguchi et al. [11]. L'estérification de l'AZT (88 mg; 0,33 mmol) et du [ $^3\text{H}$ ]-AZT (0,5 ml; 1,49 mCi/ml) utilisant (163,3 mg; 0,66 mmol) d'anhydride palmitique a eu lieu dans de la pyridine (2 ml) sur une période de 24 heures à une température de 22°C. Le [ $^3\text{H}$ ]-palmitate d'AZT a été purifié par chromatographie, où la phase stationnaire est le gel de silice et la phase mobile est le  $\text{CHCl}_3$  : Et-OH (95:5 v/v), et la radioactivité spécifique déterminée par comptage à scintillation. La pureté et la stabilité du [ $^3\text{H}$ ]-palmitate d'AZT ont été déterminées par spectrométrie de masse et par chromatographie sur couche mince (CCM) où la phase mobile est le  $\text{CHCl}_3$  : Et-OH (95:5 v/v).

**2.1.3 Préparation des liposomes.** Toute la verrerie a été stérilisée à 180 °C pour 4 heures afin d'inactiver les endotoxines bactériennes. Les liposomes ont été préparés à partir du DPPC/DMPG, DPPC/DOPS, DPPC/CHOL utilisant un rapport molaire de 9:1, 7:3 et 7:3 respectivement. Les lipides, les phospholipides et le [ $^3\text{H}$ ]-palmitate d'AZT (1  $\mu\text{mol}$  dans 10  $\mu\text{mol}$  phospholipides/lipides) ont été dissous dans du 2-méthylpropan-2-ol (t-butanol) tiède, mélangés selon les rapports préétablis, et lyophilisés à -40°C pendant 12 heures dans des contenants de verre de 5 ml. Les liposomes ont



été préparés par réhydratation avec du tampon salin phosphate (0,85% p/v NaCl contenant 10 mM de phosphate de sodium à un pH de 7,4), (1 ml de PBS/ 10  $\mu$ mol de phospholipides/lipides). Les préparations liposomales ont été soniquées dans un bain à sonication à 10 W, pendant 15 minutes.

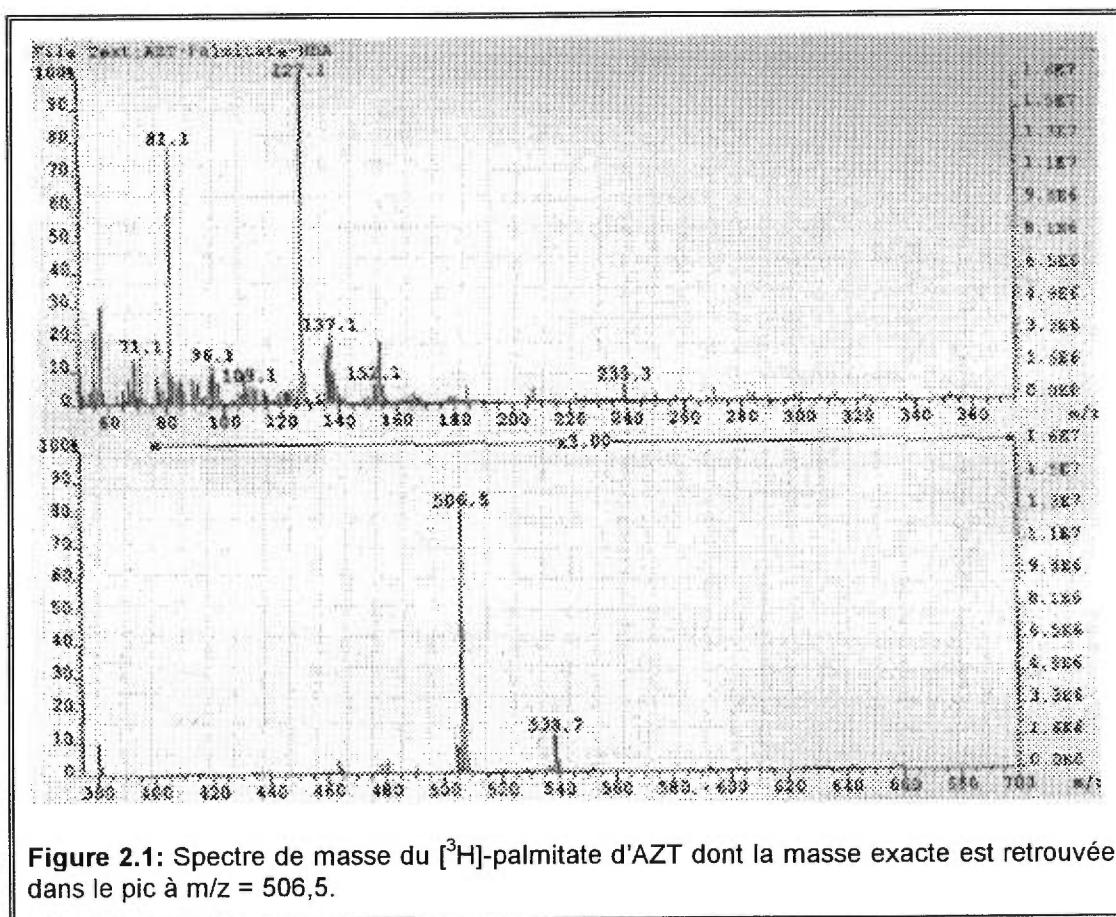
**2.1.4 Caractérisation des liposomes.** La taille des liposomes a été déterminée par spectroscopie de corrélation de photons (Coulter 4N Plus). Le potentiel zêta ( $\zeta$ ) des liposomes a été déterminé par électrophorèse Doppler (Coulter DELSA 440 SX).

**2.1.5 Incorporation du [ $^3$ H]-palmitate d'AZT dans les liposomes.** Le [ $^3$ H]-palmitate d'AZT non incorporé dans la membrane lipidique a été éliminé par chromatographie d'exclusion stérique, recueillant des fractions volumiques de 0,5 ml. Des échantillons de liposomes de 0,5 ml ont été passés sur une colonne de sépharose 2B, éluée avec du PBS, préalablement calibrée avec du [ $^3$ H]-AZT, du [ $^3$ H]-palmitate d'AZT et de liposomes (DPPC/DMPG).

**2.1.6 Rétention du [ $^3$ H]-palmitate d'AZT dans les liposomes.** Une série de liposomes contenant le [ $^3$ H]-palmitate d'AZT ont été mis en suspension dans du PBS ou dans du PBS contenant 50% v/v plasma. Les échantillons ont été placés dans des tubes à dialyse (MW cut-off range: 15000 Da), et dialysés contre du PBS à 4, 22 ou 37°C. La radioactivité restant dans le tube à dialyse a été quantifiée par comptage à scintillation sur une période de 24 h.

## 2.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

**2.2.1 Synthèse et caractérisation du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT.** La spectrométrie de masse a donné un pic majeur à  $m/z = 506,5$  correspondant à la masse moléculaire calculée du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT (Figure 2.1). La radioactivité spécifique du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT était de  $(0,123 \pm 0,001)$  Bc/mol. Le rendement a été de  $(67 \pm 3)\%$  et la CCM faite dans du  $(\text{CHCl}_3:\text{EtOH}, 95:5 \text{ v/v})$  a donné un  $R_f$  de 0,65 correspondant à la valeur retrouvée pour le palmitate d'AZT froid synthétisé au chapitre précédent.



**2.2.2 Incorporation du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT dans les liposomes.** La calibration de la colonne de sépharose 2B (Figure 2.2) a démontré que les échantillons liposomaux sont recueillis dans les fractions 6, 7 et 8; le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT est recueilli dans les fractions 9, 10 et 11; quant au [<sup>3</sup>H]-AZT, il est recueilli dans les fractions 13-18 (Figure 2.2). Le [<sup>3</sup>H]-AZT a été utilisé lors de la calibration afin de savoir si le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT subit une hydrolyse suite à son introduction dans la colonne de sépharose. Ces résultats montrent qu'il est possible de séparer le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT liposomal de la fraction libre par une simple chromatographie d'exclusion où le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT liposomal sort dans la 8<sup>ème</sup> fraction et le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT libre commence à sortir dans la 9<sup>ème</sup>. Les résultats obtenus au tableau II.1 et à la figure 2.3 montrent que les liposomes ont une capacité d'incorporer le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT avec une efficacité d'environ 100%. Ceci est nettement supérieur aux bas niveaux d'AZT incorporés dans les porteurs liposomaux (2,5-5,0%) suite à une hydratation passive [22].

**Tableau II.1. Incorporation du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT dans les liposomes (moyenne ± écart type, n=10,000)**

Formulation liposomale	Incorporation (%)
DPPC/DMPG	99,8
DPPC/DOPS	92,3
DPPC/CHOL	98,3

**2.2.3 Caractérisation des liposomes contenant le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT.**

L'incubation des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG, DPPC/DOPS et DPPC/CHOL et contenant l'ester radioactif dans du PBS/plasma résulte en une hausse significative du diamètre apparent et en une baisse de la charge négative associée aux liposomes formulés avec du DPPC/DMPG et

DPPC/DOPS (Tableau II.II). Ces résultats montrent que les liposomes chargés négativement contenant le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT ont une interaction significative avec les protéines plasmatiques ou avec les lipoprotéines. La hausse significative au niveau du diamètre des liposomes neutres (DPPC/CHOL) indique aussi qu'il y a un certain degré d'interaction protéines/lipoprotéines. La fonction azide hydrophobe de l'AZT [24], favorise une interaction accrue avec les composants plasmatiques, peut permettre la localisation de l'AZT en surface des liposomes plutôt qu'une localisation vis à vis aux phospholipides ou au cholestérol.

**Tableau II.II. Caractérisation des liposomes contenant le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT**

Liposomes	PBS <sup>(a)</sup>		PBS/PLASMA <sup>(b)</sup>	
	Taille(nm)	ζ(mV)	Taille(nm)	ζ (mV)
DPPC/DMPG	253±18	-10±1	499±21	-6.1±0.2
DPPC/DOPS	273±10	-22±1	853±18	-5.9±0.7
DPPC/CHOL	739±10	-5±1	918±19	-4.7±0.2

\*La taille ainsi que le potentiel ζ des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG, DPPC/DOPS et DPPC/CHOL contenant le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT ont été déterminés, sur une période de 24 heures, (a) dans du PBS et (b) dans du PBS/plasma.

**2.2.4 Rétention du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT dans les liposomes.** L'incubation des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG, DPPC/DOPS ou avec du DPPC/CHOL et contenant du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT dans du PBS à 4, 22 ou 37°C était dépendante de la composition ainsi que de la température (Figures 2.4, 5 et 6). Aucune des formulations liposomales n'a montré une perte significative du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT lorsque incubée à 4 ou à 22°C (≤ 5%). La rétention relative de ce promédicament radioactif dans les liposomes

à 37°C s'établissait comme suit: DPPC/CHOL  $\geq$  DPPC/DMPG  $\geq$  DPPC/DOPS. L'incubation de ces 3 préparations liposomales dans 50% de plasma résultait en une libération significative du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT qui était, aussi, dépendante de la formulation ainsi que de la température (avec une libération de 30-60% sur une période de 24 heures). Des différences remarquables ont été détectées au niveau de la libération du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT dans les 3 différentes préparations liposomales. Les liposomes formulés avec du DPPC/DMPG (Figure 2.4) ainsi que ceux formulés avec du DPPC/DOPS (Figure 2.5) ont montré une libération rapide (burst effect: rupture de la membrane et fuite subite du promédicament à travers la membrane liposomale) tandis que les liposomes formulés avec du DPPC/CHOL (Figure 2.6) libérait plus lentement le [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT tout au long de la période d'incubation. Il a été démontré que l'incorporation du cholestérol dans les formulations liposomales diminue la perméabilité de la membrane aux solutés en retenant davantage les molécules de phospholipides les unes contre les autres [25]. Cette organisation de la structure liposomale par le cholestérol peut aussi prévenir la dissociation des phospholipides par les lipoprotéines plasmatiques de haute densité et maintenir la stabilité liposomale en présence de serum [26]. Ainsi, l'incorporation du cholestérol dans les membranes liposomales possède trois effets différents: (1) augmenter la fluidité ou la microviscosité de la bicouche, (2) réduire la perméabilité membranaire aux solutés et (3) stabiliser la membrane en présence d'un milieu plasmatique.

**Tableau II.III. Pourcentage de libération par heure du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT à partir des liposomes dans un milieu d'incubation de PBS**

Phospholipides/lipides	% de libération/h* 0-2 heures			% de libération/h* 8-24 heures		
	4°C	22°C	37°C	4°C	22°C	37°C
DPPC/DMPG	0.885	0.589	0.585	0.015	0.014	0.329
DPPC/DOPS	1.535	1.070	1.333	0.061	0.040	0.552
DPPC/CHOL	0.070	0.303	0.193	0.033	0.078	0.109

**Tableau II.IV. Pourcentage de libération par heure du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT dans du PBS/Plasma**

Phospholipides / lipides	% de libération/h* 0-2 heures			% libération/h* 8-24 heures		
	4°C	22°C	37°C	4°C	22°C	37°C
DPPC/DMPG	7.10	6.00	13.00	0.30	0.61	1.26
DPPC/DOPS	10.11	8.55	9.48	0.29	0.71	0.92
DPPC/CHOL	2.10	2.31	2.10	0.25	0.79	0.55

\*Le % de libération/h du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT à partir des liposomes a été calculé selon l'équation suivante:

$$\% \text{ libération/h} = \frac{\text{concentration (à } t = 0\text{h)} - \text{concentration (} t = t'\text{)}}{\text{concentration initiale}} \times 100$$

(1)

Où la concentration (à  $t = 0\text{h}$ ) correspond à la quantité initiale de [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT présente dans la préparation liposomale suite à son hydratation avec du PBS ou avec du PBS suspendu par la suite dans un volume équivalent de plasma. Et la concentration ( $t = t'$ ) correspond à la quantité finale de [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT présente dans la préparation liposomale suite à sa dialyse pour le nombre d'heures correspondant.

Figure 2.2. Calibration de la colonne de sépharose 2B avec des échantillons de 0,5 ml de liposomes (DPPC/DMPG); de [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT et de [<sup>3</sup>H]-AZT

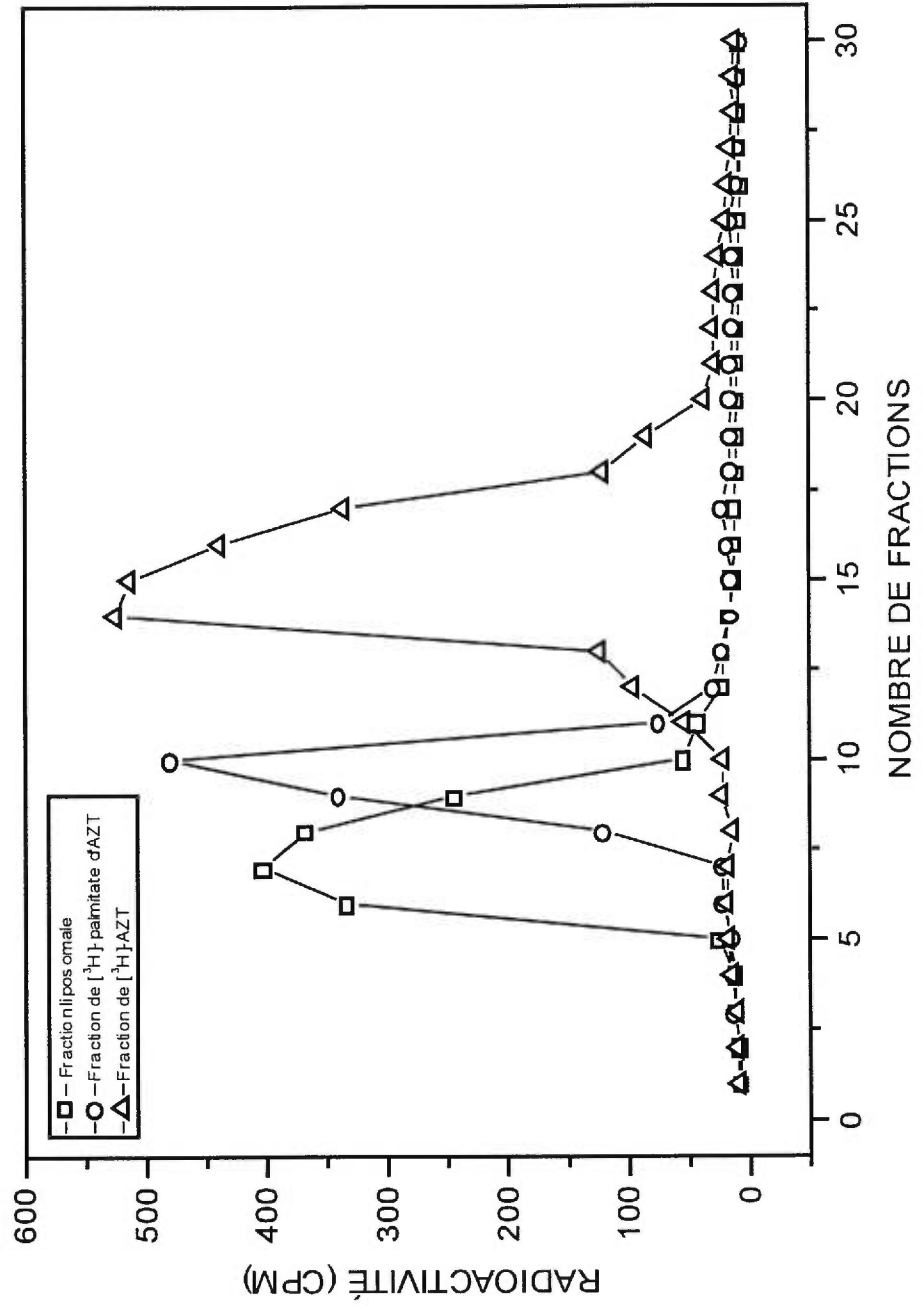


Figure 2.3. Incorporation du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT dans les liposomes

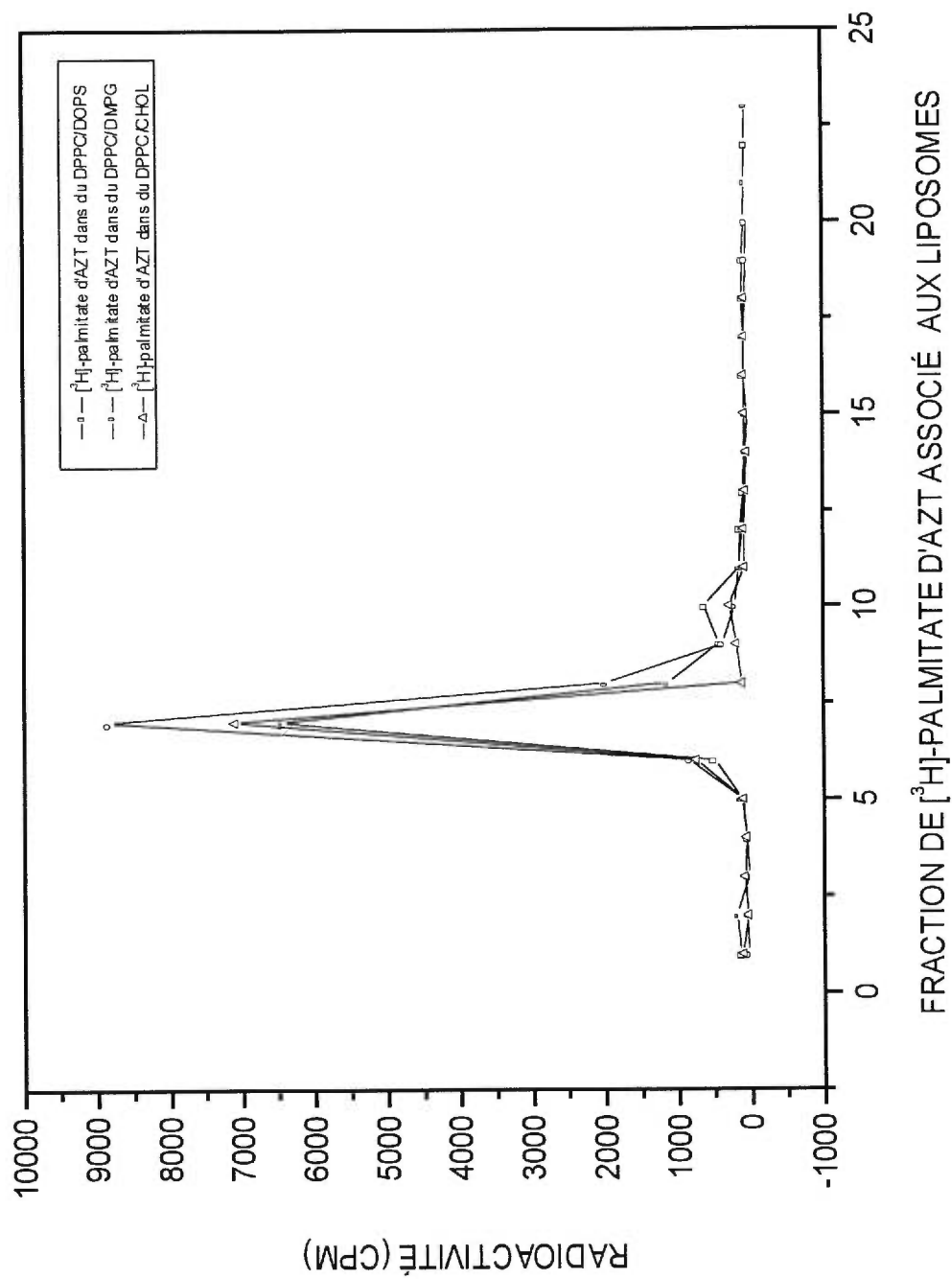




Figure 2.4. Libération du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG suite à une incubation dans du PBS ou du PBS/Plasma (1:1)

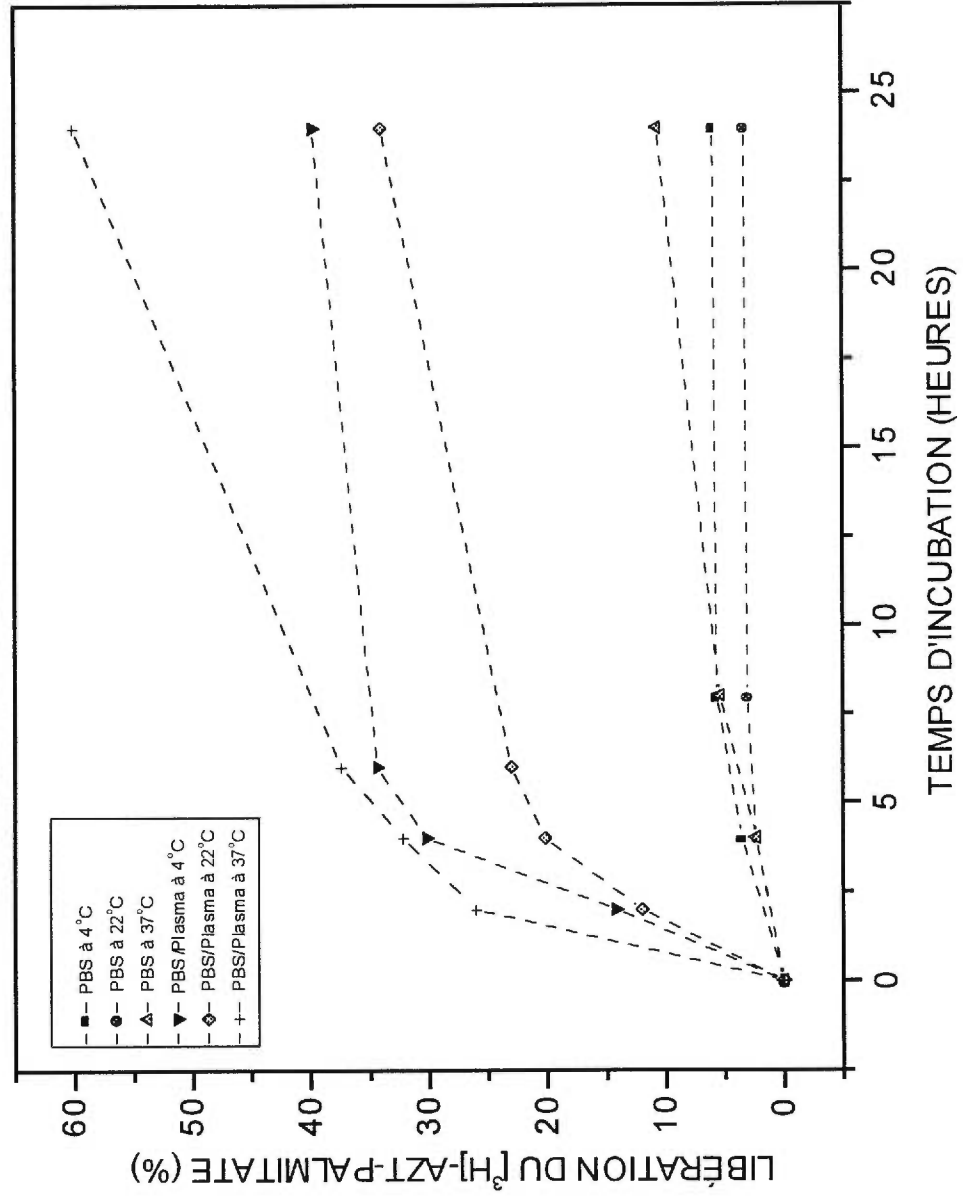


Figure 2.5. Libération du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT des liposomes formulés avec du DPPC/DOPS suite à une incubation dans du PBS ou du PBS/Plasma (1:1)

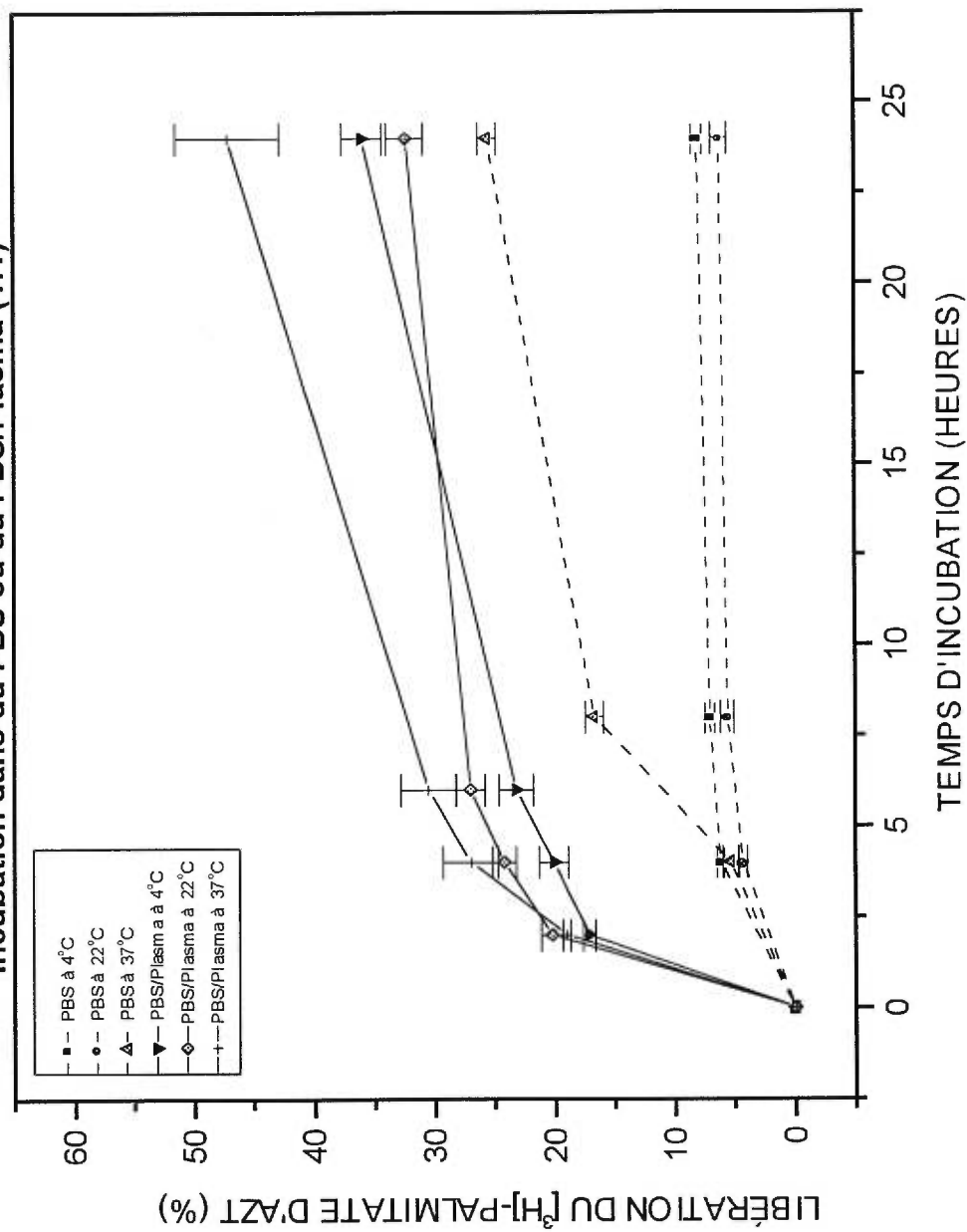
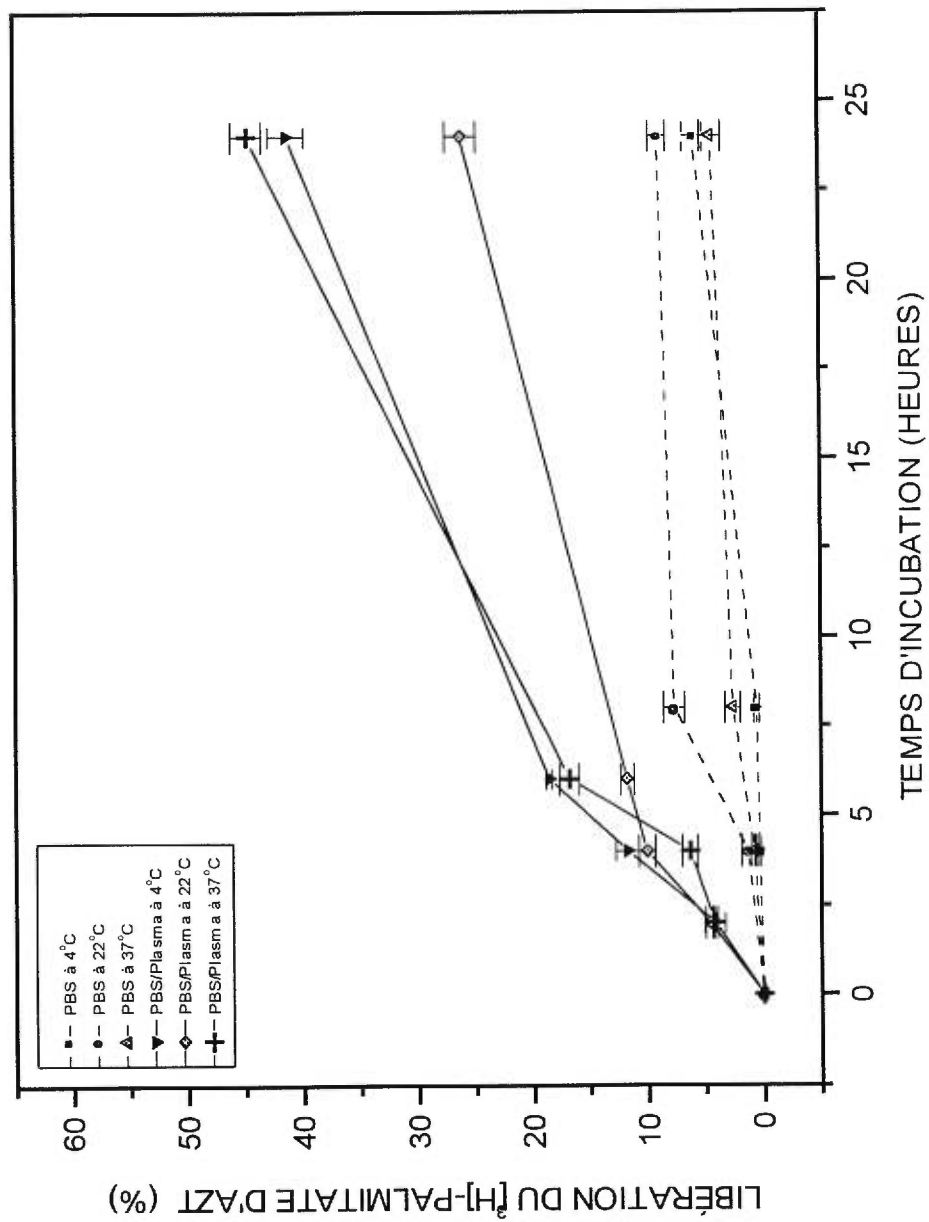


Figure 2.6. Libération du [<sup>3</sup>H]-palmitate d'AZT des liposomes formulés avec du DPPC/Cholestérol suite à une incubation dans du PBS ou du PBS/Plasma (1:1)



### 2.3. RÉFÉRENCES

1. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, "3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/ Lymphadenopathy-associated virus in vitro", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 7096-100, 1985.
2. Furman PA, Fyfe JA, St-Clair MH, "Phosphorilation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of 5' triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 8333-7, 1986.
3. Nakashima H, Matsui T, Harada S, "Inhibition of repliacion and cytopathic effect of human T cell lymphotropic virus type III/ lymphadenopathy-associated virus by 3'-azido-3'-deoxythymidine in vitro", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30, 933-7, 1986.
4. Yarchoan R, Klecker RW, Weinhold KJ, "Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication to patients with AIDS or AIDS-related complex", *Lancet*, 1, 575-80, 1986.
5. Aggarwal SK, Gogu SR, Rangan SR, and Aggarwal KC, "Synthesis and biological evaluation of prodrugs of Zidovudine", *J. Med. Chem.*, 33, 1505-10, 1990.
6. Henin Y, Gouyette C, Schwartz O, Debouzy JC, Newman JM and Huyn-Dinh T, "Lipophilic glycosyl phosphotriester derivatives of AZT: synthesis, NMR, transmembrane transport study and antiviral activity", *J. Med. Chem.*, 34, 1830-7, 1991.
7. Squalli-Houssaini H, Pierlot C, Kusnierz J-P, Parmentier B, Martin-Nizar F, Lestavel-Delattre S, Tartar A, Fruchart J-C, Sergheraert C and Duriez P, "Preparation of anti-HIV-Low-Density lipoprotein complexes for delivery of anti-HIV drugs via the low-density lipoprotein pathways", *Biotech. Ther.*, 5, 69-85, 1994.
8. Steim JM, Camaioni Neto C, Sarin PS, Sun DK, Sehgal RK, Turcotte JG, "Lipid conjugates of antiretroviral agents, I. Azidothymidine-monophosphate-diglyceride: anti HIV activity, physical properties and interaction with plasma proteins", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 451-457, 1990.
9. Meyer KL, Marasco CJ, Morris Natschake SL, Ishaq KS, Piantadosi C, "In vitro evaluation of phosphocholine and quaternary ammonium containing lipids as novel anti-HIV agents", *J. Med. Chem.*, 34, 1377-1383, 1991.

10. Piantadosi C, Marasco CJJ, Morris Natschke SL, Meyer KL, Gumus F, Surles JR, Ishaq KS, Kucera LS, Iyer N, Wallen CA, "Synthesis and evaluation of novel ether nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity", *J. Med. Chem.*, 34, 1408-1414, 1991.
11. Kawaguchi T, Ishikawa K, Seki T, Juni K, "Ester prodrugs of Zidovudine", *J. Pharm. Sci.*, 79, 531-33, 1990.
12. Bibby DC, Charman WN, Charman SA, Iskander MN, Porter CJH, "Synthesis and evaluation of 5' alkyl ester prodrugs of zidovudine for directed lymphatic delivery", *Int. J. Pharmaceutics*, 144, 61-70, 1996.
13. Hostetler KY, Stuhmiller LM, Lenting HB, Van Den Bosch H, Richman DD, "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine", *J. Biol. Chem.*, 265, 6112-7, 1990.
14. Hostetler KY, Carson DA, Richman DD, "Phosphatidylazidothymidine. Mechanism of antiretroviral action in CEM cells", *J. Biol. Chem.*, 266, 11714-11717, 1991.
15. Hostetler KY, Richman DD, Carson DA, Stuhmiller LM, Van wijk GMT, Van Den Bosch H, "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type I replicaton in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid derivative of 3'-deoxythymidine", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 436-441, 1992.
16. Embreston J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Pizzo PA, Fauci AS, Tenner-Racz K, Haase AT, "Massive covert infection of T helper lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS", *Nature*, 362, 359-362, 1993.
17. Fox CH, Tenner-Racz K, Racz P, Firpo A, Pizzo PA, Fauci AS, "Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA", *J. Inf. Dis.*, 164, 1051-1057, 1991.
18. Pantaleo G, Graziosi C, Demaret JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS, "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease", *Nature*, 362, 355-358, 1993.
19. Schwendener RA, Gowland P, Horber DH, Zahner R, Schertter A, Schott H, "New lipophilic alkyl/acyl dinucleoside phosphates as derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine: Inhibition of HIV-I replication in vitro and antiviral

activity against Rouscher Leukemia virus infected mice with delayed treatment regimens", *Antiviral Res.*, 24, 79-93, 1994.

20. Kamps JAAM, Swart PJ, Morselt HWM, Pauwels R, Debethume MP, Declercq E, Meijer DKF, Scherphof GL, "Preparation and characterization of conjugates of (modified) human serum albumin and liposomes-drug carriers with an intrinsic anti-HIV activity", *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, 1278, 183-190, 1996.

21. Phillips NC, Skame E, Tsoukas C, "Liposomal encapsulation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) results in decreased bone marrow toxicity and enhanced activity against murine AIDS-induced immune suppression", *J. of AIDS*, 4, 959-66, 1991.

22. Phillips NC, Tsoukas C., "Liposomal encapsulation of azidothymidine, results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome", *Blood*, 79, 1137-43, 1992.

23. Heiati H, Tawashi R, Shivers R, Phillips NC, "Solid lipid nanoparticles as drug carriers I. Incorporation and retention of the lipophilic prodrug 3'-azido-3'-deoxythymidine palmitate", *Intern. J. Pharmaceutics*, 147, 123-131, 1997.

24. Robbins MJ, Dalley NK, Herdewijn P, Balzarini J, De Clercq E, "Nucleic acid related compounds. 57. Synthesis, X-ray crystal structure, lipophilic partition properties, and antiviral activities of anomeric 3'-azido-2', 3'-dideoxy-2, 6-diaminopurine ribose", *J. Med. Chem.*, 32, 1763-1768, 1989.

25. Papahadjopoulos D, Jacobson K, Nir S, Isac T, "Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol", *Biochim. Biophys. Acta*, 311, 330-48, 1973.

26. Gregoriadis G., Kirby C, Meehan A, Senior J, "Targeting of liposomes: some prerequisites for success", in *Liposomes, "Drugs and Immunocompetent Cell Functions"*, Nicolau C, Paraf A, Eds., Academic Press, New York, 29-32, 1981.

**CHAPITRE III** *Immunogénicité du palmitate d'AZT  
libre et liposomal*

Les liposomes, des vésicules de taille microscopique formées de couches concentriques uniques (SUV ou LUV) ou multilamellaires (MLV) de phospholipides, ont préalablement été utilisés comme adjuvants [1, 2] ou comme transporteurs de médicaments [3, 4, 5]. Il a été démontré que l'association d'un bon nombre de médicaments de faible poids moléculaire aux liposomes ou aux transporteurs phospholipidiques de médicaments est capable de produire des allergies ou des anticorps suite à des applications cutanées ou parentérales.

Le dinitrophénolphosphatidyléthanolamine (DNP) lorsque présent dans les liposomes, fonctionne comme un haptène et stimule la production d'anticorps anti-DNP [6]. Les liposomes contenant du gallate de propyle, un antioxydant déjà utilisé dans les crèmes cutanées à base de liposomes, produisent des réponses allergiques suite à des applications répétées [7]. La consommation d'une huile comestible dénaturée avec 2% d'aniline induit la production d'anticorps chez certaines personnes suite à leur utilisation de cette huile dans la préparation de mayonnaise, phénomène reconnu sous le nom du syndrome toxique de l'huile espagnole. Cette huile dénaturée lorsque mélangée aux œufs (phospholipides) en présence d'un milieu aqueux, se comporte comme un haptène à la surface des liposomes et induit la production de réactions autoimmunes [8]. L'amphotéricine B [9, 10], un antibiotique polyène lipophile, induit des réponses anaphylactiques chez certains patients lorsque administré dans des préparations liposomales [11]. Le Propofol, un anesthésique lipophile administré dans des porteurs amphiphiles, est aussi immunogène suite à son administration dans des émulsions de phospholipides/triglycérides [12]. Par ailleurs, l'incorporation d'un certain nombre de médicaments à l'intérieur des liposomes réduit les réactions anaphylactiques qui leur sont associées [13-15]. Il a été démontré que l'incorporation des allergènes à l'intérieur des liposomes diminue le



nombre de réactions anaphylactiques chez les animaux et augmente la production d'anticorps [16, 17].

La synthèse de promédicaments amphiphiles ayant des chaînes membranaires lipophiles a déjà été utilisée afin d'améliorer l'incorporation et la rétention des médicaments hydrosolubles dans les porteurs liposomaux (ex. les muramyltripeptides [18], les agents chimiothérapeutiques comme le 5-fluorouracil [19] et les analogues nucléosidiques comme le 3'-azido-3'-désoxythymidine [20]). La nature amphiphile de ces promédicaments assure leur exposition à la face externe des liposomes, résultant en une conformation polyhapténique. Ce type de structure possède un potentiel significatif pour les lymphocytes B [21]. Bien que plusieurs de ces dérivés ont déjà été incorporés dans les liposomes, leur capacité de fonctionner comme des haptènes reste à déterminer.

Le système immunitaire, quand il reconnaît des agents étrangers, produit des anticorps d'au moins deux façons: d'une part, les antigènes de surface des agents pathogènes se lient à des récepteurs présents à la surface des globules blancs appelés lymphocytes B, qui se différencient en plasmocytes, prolifèrent et sécrètent des anticorps spécifiques des agents pathogènes. Les macrophages se lient aux agents pathogènes et, après les avoir phagocytés, en exposent les antigènes à leur propre surface. La liaison des lymphocytes T aux antigènes exposés conduit, après différentes étapes, à la prolifération des plasmocytes et à la production d'anticorps.

Théoriquement, il est possible d'obtenir une multiplicité de réponses immunitaires (tolérance ou réaction immune) envers chaque déterminant antigénique (haptène) d'un antigène. La tolérance implique la différenciation des réactivités de l'hôte en deux différentes catégories: l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. Les réponses humorales sont associées à une classe de lymphocytes provenant de la moëlle osseuse et migrant vers les tissus

lymphoïdes périphériques. Ces lymphocytes (B) dérivés de la moelle osseuse sont les précurseurs des cellules plasmiques sécrétant les immunoglobulines dont la spécificité est de détecter l'antigène immunisant. L'immunité médiée par les cellules inclue un certain type d'hypersensibilité ou une réactivité de l'hôte. Quant à l'immunité cellulaire, elle est affectée d'abord par les lymphocytes (T) provenant du thymus.

Chez les animaux sains, la réponse immunitaire obtenue sera déterminée par: (1) la structure de l'antigène (la nature du porteur, le nombre d'haptènes ainsi que les propriétés physico-chimiques); (2) la manière dont l'antigène est présenté (la porte d'entrée, les adjuvants ainsi que la dose d'antigènes) et (3) la constitution génétique de l'hôte. Durant les trois dernières décennies, des complexes transporteurs-haptènes conventionnels (ex. haptène-protéine ou haptène-polysaccharide) ont fréquemment été utilisés afin d'étudier l'effet de la présentation de l'antigène sur la réponse immunitaire [22]. Une des applications immunologiques, préalablement utilisée comme transporteur antigénique nonimmunogène, est le modèle membranaire liposomal [23]. Plusieurs antigènes protéiniques (ex. les globulines gamma, l'albumine et la toxine au choléra) peuvent être attachés à la surface liposomale [24-27] par liaison covalente à un des phospholipides [28-30], ou par insertion artificielle d'un récepteur [31].

Ce chapitre comporte deux études distinctes. La première décrit la capacité du palmitate d'AZT liposomal de fonctionner comme un haptène suite à son administration in vivo et la seconde décrit l'effet de la variation de la concentration du palmitate d'AZT liposomal sur la production d'anticorps.

### 3.1 PARTIE EXPÉRIMENTALE

**3.1.1 Produits.** Le dioléylphosphatidylsérine (DOPS), le dimyristylphosphatidylglycérol (DMPG) ainsi que le dipalmitylphosphatidylcholine (DPPC) ont été obtenus de chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Le palmitate d'AZT a été synthétisé au chapitre I. Les anticorps anti-souris (IgG et IgM) ainsi que le 2', 2'-azino-di-[3-éthylbenzthiazoline sulfonate] (substrat ABTS) ont été fournis par Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, AL). Les plaques d'ELISA Immulon-3 ont été obtenues de chez Dynatech Laboratories (Chantilly, VA).

**3.1.2 Préparation des liposomes.** Toute la verrerie a été stérilisée à 180 °C pour 4 heures afin d'inactiver l'endotoxine bactérienne. La première série de liposomes a été préparée à partir du DPPC/DMPG et du DPPC/DOPS, utilisant un rapport molaire de 9:1 et 7:3 respectivement et une concentration de 1 µmol du palmitate d'AZT (synthétisé au chapitre I) dans 10 µmol de phospholipides. Quant à la deuxième série, elle a été préparée à partir du DPPC/DMPG utilisant un rapport molaire de 9:1 et une concentration de 0,04; 0,1 et 0,2 µmol du palmitate d'AZT dans 10 µmol de phospholipides. Les phospholipides et le palmitate d'AZT ont été dissous dans du 2-méthylpropan-2-ol tiède (t-butanol), mélangés selon les rapports préétablis, et lyophilisés à -40°C pendant 12 heures dans des contenants de verre de 5 ml. Les liposomes ont été préparés par réhydratation avec du tampon salin phosphate (PBS) (0,85% p/v NaCl contenant 10 mM de phosphate de sodium à un pH de 7,4), (1 ml de PBS/ 10 µmol de phospholipides/lipides). Les préparations liposomales ont été soniquées avant qu'elles soient utilisées dans un bain à sonication à 10 W, pendant 15 minutes.

**3.1.3 L'AZT liposomal.** Les liposomes formulés avec du DPPC/DMPG contenant l'AZT hydrosoluble non estérifié ont été préparés par hydratation des phospholipides lyophilisés avec une solution de 5 mg/ml d'AZT dans du PBS. L'AZT non-incorporé a été enlevé par chromatographie d'exclusion stérique utilisant une colonne de Sephadex G-25 (PD-10). Les fractions contenant l'AZT liposomal ont été recueillies et l'incorporation de l'AZT a ainsi été déterminée par spectroscopie UV. La concentration de l'AZT a préalablement été ajustée pour donner une concentration de 0,1  $\mu\text{mol}$  d'AZT/1  $\mu\text{mol}$  de phospholipides [32].

**3.1.4 L'immunisation.** *1<sup>er</sup> protocole d'immunisation:* quatre séries de cinq souris femelles du type CD1 (âgées entre 7-9 semaines) chacune ont été immunisées 1 fois par semaine, par injections s.c sur une période d'un mois avec des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG (9:1 en rapport molaire), utilisés comme contrôle, pour le 1<sup>er</sup> protocole d'immunisation, avec des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG contenant du palmitate d'AZT pour la deuxième série, avec des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG contenant une dose équivalente d'AZT hydrosoluble pour la troisième ou avec des liposomes formulés avec du DPPC/DOPS (7:3 en rapport molaire) contenant du palmitate d'AZT pour la quatrième (Tableau III.I).

**Tableau III.I. Premier protocole d'immunisation pour les quatre séries de souris**

Série de souris	Formulation liposomique injectée (/200 $\mu\text{mol}$ de PBS)
1	1 $\mu\text{mol}$ de DPPC/DMPG (contrôle)
2	0,1 $\mu\text{mol}$ de palmitate d'AZT dans 1 $\mu\text{mol}$ de DPPC/DMPG (9:1)
3	0,1 $\mu\text{mol}$ d'AZT hydrosoluble dans 1 $\mu\text{mol}$ de DPPC/DMPG (9:1)
4	0,1 $\mu\text{mol}$ de palmitate d'AZT dans 1 $\mu\text{mol}$ de DPPC/DOPS (7:3)

*2<sup>ème</sup> protocole d'immunisation:* six séries de souris femelles du type CD1 (âgées entre 7-9 semaines) de cinq souris chacune ont été immunisées 1 fois par semaine, par injections s.c sur une période d'un mois avec 0,25  $\mu\text{mol}$  de palmitate d'AZT libre pour la première série, avec 0,50  $\mu\text{mol}$  de palmitate d'AZT libre pour la deuxième, avec des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG (9:1 en rapport molaire) pour la troisième, avec des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG (9:1 en rapport molaire) contenant du palmitate d'AZT (1  $\mu\text{mol}$  de phospholipides contenant 0,04  $\mu\text{mol}$  ou 0,1  $\mu\text{mol}$  ou 0,2  $\mu\text{mol}$  du palmitate d'AZT dans une dose volumique de 200  $\mu\text{l}$ ) pour la quatrième, cinquième et sixième série respectivement (Tableau III.II). Le serum a été recueilli une semaine après la dernière immunisation pour les deux séries de souris et les anticorps ont été dosés par ELISA.

**Tableau III.II. Deuxième protocole d'immunisation pour les six séries de souris**

Série de souris	Formulation injectée (/200 $\mu\text{l}$ de PBS)
1	0,25 $\mu\text{mol}$ de palmitate d'AZT libre
2	0,50 $\mu\text{mol}$ de palmitate d'AZT libre
3	1 $\mu\text{mol}$ de DPPC/DMPG
4	0,04 $\mu\text{mol}$ de palmitate d'AZT dans 1 $\mu\text{mol}$ DPPC/DMPG
5	0,10 $\mu\text{mol}$ de palmitate d'AZT dans 1 $\mu\text{mol}$ DPPC/DMPG
6	0,20 $\mu\text{mol}$ de palmitate d'AZT dans 1 $\mu\text{mol}$ DPPC/DMPG

**3.1.5 L'ELISA.** L'ELISA sur phase solide a été étudiée utilisant comme support solide des liposomes contenant le palmitate d'AZT (1  $\mu\text{mol}$  de palmitate d'AZT dans 10  $\mu\text{mol}$  de DPPC/ml de PBS). Les échantillons de serum (20  $\mu\text{l}$ ) ont été incubés pendant une heure avec 0,1  $\mu\text{mol}$  de support solide et lavés par la suite par centrifugation (12000 x g, 10 min) avec du PBS. Après une heure d'incubation avec des anticorps anti-souris (du type IgG et IgM marqués avec de la peroxydase de cheval) et de lavages par centrifugation, les anticorps de souris liés aux liposomes sont détectés après une incubation avec le substrat 2', 2-azino-di-[3-éthylbenzthiazoline sulfonate] (ABTS)/peroxydase. Les niveaux d'anticorps pour les immunisations de souris ont été analysés utilisant le t-test de Student [35].

## 3.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

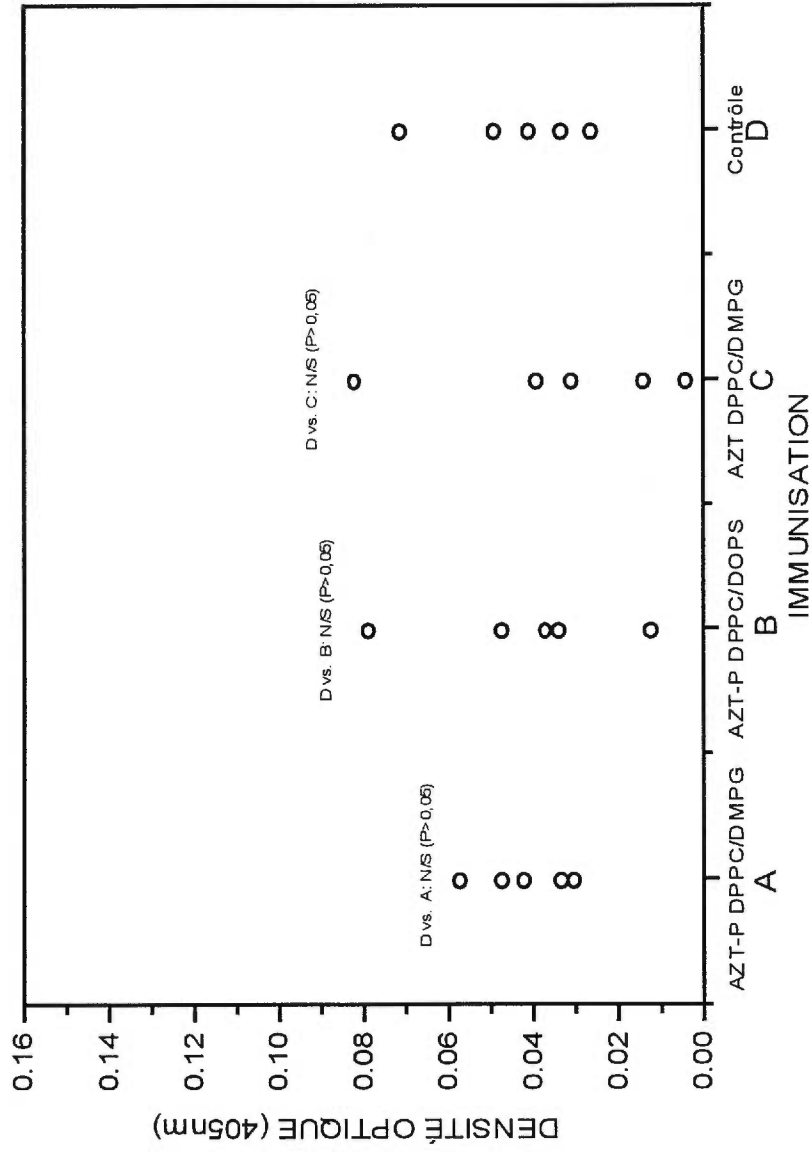
**3.2.1 Réponse immunitaire contre le palmitate d'AZT liposomal pour le 1<sup>er</sup> protocole d'immunisation.** le palmitate d'AZT liposomal a induit peu ou pas de réponse en anticorps IgG suite à l'administration s.c. répétée ( $P > 0,05$ ) (Figure 3.1). Cependant, des anticorps contre le palmitate d'AZT du type IgM ont été détectés chez les souris injectées avec du DPPC/DMPG/palmitate d'AZT ( $P < 0,05$ ) ou avec du DPPC/DOPS/palmitate d'AZT ( $P < 0,05$ ) (Figure 3.2). Les souris immunisées avec les liposomes du type DPPC/DMPG contenant la même dose en AZT non estérifié, incorporée dans la phase aqueuse interne des liposomes, n'ont produit aucune sorte d'anticorps ( $P > 0,05$ ) par rapport au contrôle, prouvant que l'expression de surface de l'AZT est importante pour la reconnaissance immunologique. De même, les souris immunisées avec les liposomes du type DPPC/DMPG (contrôle) n'ont produit aucune sorte d'anticorps anti-AZT. La capacité des liposomes formulés avec du DPPC/DOPS à présenter le palmitate d'AZT apparaît comme étant significativement meilleure que celle des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG. On a déjà démontré que les liposomes du type DPPC/DMPG sont des meilleurs adjuvants que ceux formulés avec du DPPC/PS [32]. Bien que ces deux dernières formulations soient de charge négative, leur capacité à présenter le palmitate d'AZT à leur surface est différente. Les liposomes formulés avec du DPPC/DOPS ont une membrane plus fluide que ceux formulés avec du DPPC/DMPG ( $T_m -11^\circ\text{C}$  pour le PS vs.  $25^\circ\text{C}$  pour le DMPG [34]). La fluidité membranaire des liposomes (DPPC/DOPS) permet au palmitate d'AZT d'avoir un plus grand caractère hapténique car sa présentation à la surface liposomique est plus prononcée que lorsqu'il est dans les liposomes formulés avec du DPPC/DMPG. Cette dernière formulation fait en sorte que le palmitate d'AZT est plus retenu par les molécules de phospholipides et par conséquent est moins « visible » par les lymphocytes B afin de produire des anticorps. Les résultats du présent

chapitre montrent que c'est la fluidité membranaire, plutôt que la composition phospholipidique qui est responsable de la production d'anticorps contre le palmitate d'AZT.

**3.2.2 Réponse immunitaire contre le palmitate d'AZT libre et liposomal pour la 2<sup>ème</sup> série d'injections.** En comparant la réponse immunitaire des souris injectées avec du palmitate d'AZT libre et liposomal, on remarque une augmentation de la dose d'anticorps IgG et IgM avec l'augmentation de la dose de palmitate d'AZT (Figures 3.3 et 3.4). On remarque aussi que la réponse immunitaire chez les souris injectées avec du palmitate d'AZT liposomal est plus prononcée que celle observée chez les souris injectées avec le promédicament libre ( $P < 0,05$  pour des injections de  $0,1 \mu\text{mol}$  de palmitate d'AZT liposomal vs.  $P : \text{N/S}$  pour des injections de  $0,25 \mu\text{mol}$  de palmitate d'AZT libre (Figure 3.3)), prouvant que le palmitate d'AZT est plus susceptible de produire une réponse immunitaire dans sa forme liposomale que dans sa forme libre. Les souris injectées avec du palmitate d'AZT libre à une concentration inférieure ou égale à  $0,1 \mu\text{mol}$  (résultats non montrés ici) n'ont produit aucun anticorps. Les liposomes présentant le palmitate d'AZT à leur surface sont capables de produire des anticorps IgG et IgM à une concentration aussi faible que  $0,1 \mu\text{mol}$  en palmitate d'AZT ( $P < 0,05$  (Figure 3.3)). Ces résultats montrent que le palmitate d'AZT est capable de produire des anticorps seul ou en combinaison avec les liposomes. Ceux-ci sont essentiels pour la présentation du palmitate d'AZT à des concentrations aussi faibles que  $0,1 \mu\text{mol}$ .

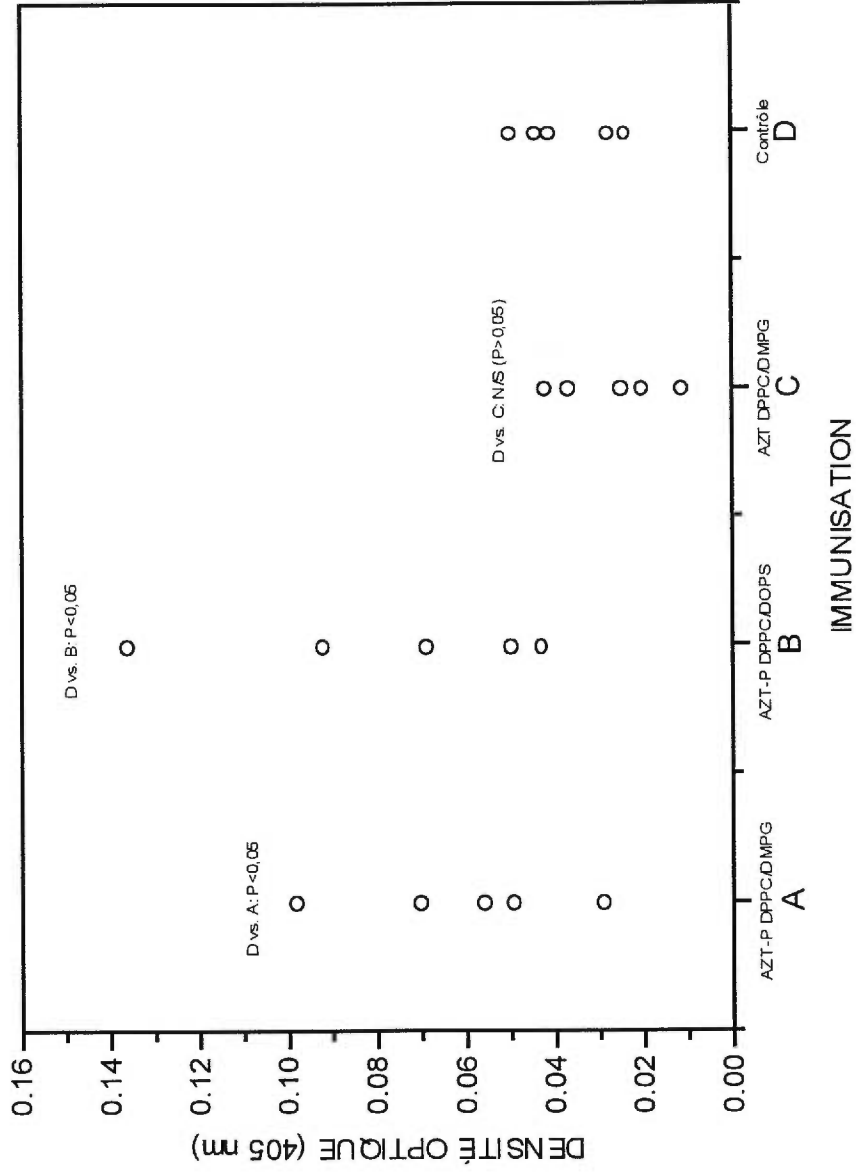


**Figure 3.1. Détermination de la quantité d'anticorps IgG présente dans le serum de souris du premier protocol d'immunisation**



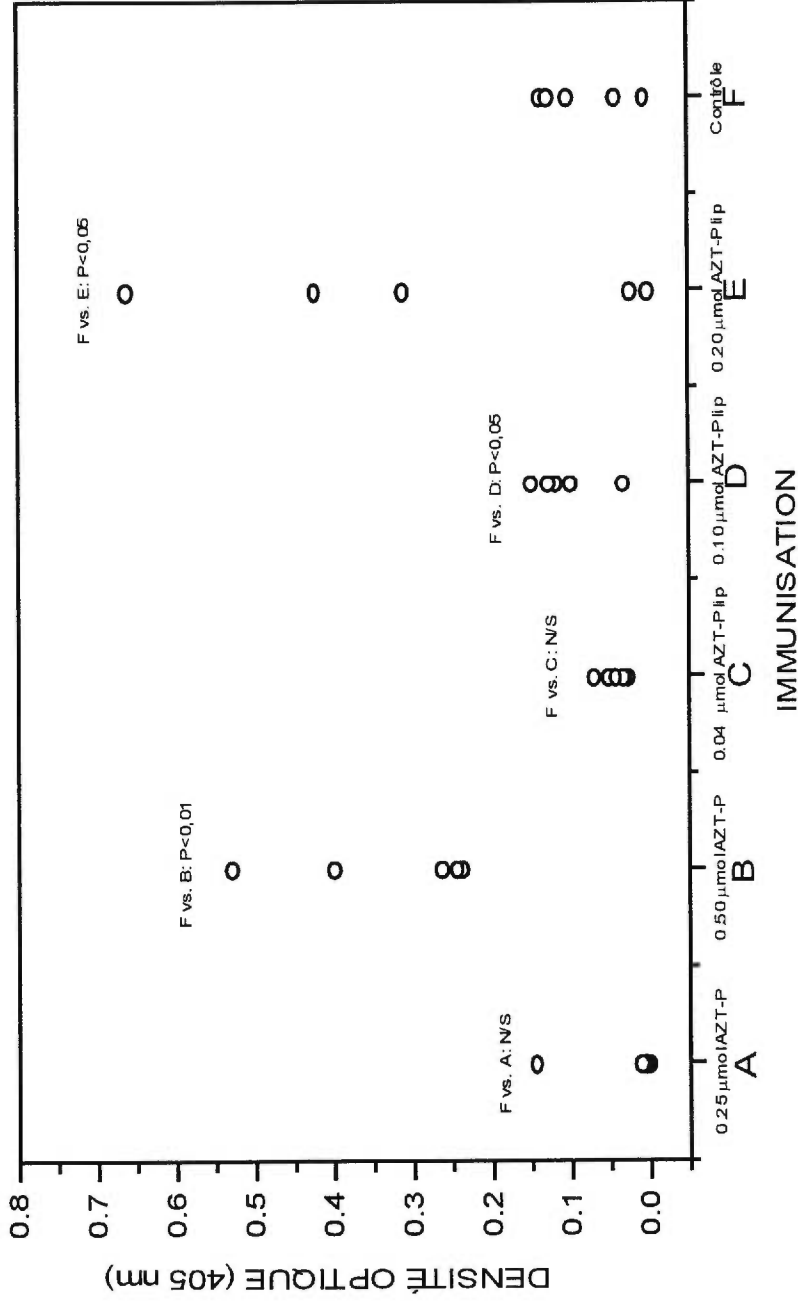
\*Où AZT-P = palmitate d'AZT et N/S = non significatif. L'analyse statistique a été déterminée par le t-test de Student [35] et la comparaison faite par rapport au contrôle de DPPC/ DMPG (D).

Figure 3.2. Détermination de la quantité d'anticorps IgM présente dans le serum de souris du premier protocole d'immunisation



\*Où AZT-P = palmitate d'AZT et N/S = non significatif. L'analyse statistique a été déterminée par le t-test de Student [35] et la comparaison faite par rapport au contrôle de DPPC/ DMPG (D).

Figure 3.3. Variation de la concentration en anticorps IgG VS la variation de la concentration en palmitate d'AZT libre et liposomal (10 $\mu$ mol DPPC/DMPG)



\*Où AZT-P = palmitate d'AZT libre, AZT-P lip = palmitate d'AZT liposomal et N/S = non significatif. L'analyse statistique a été déterminée par le t-test de Student [35] et la comparaison faite par rapport au contrôle de DPPC/ DMPG (F).



### 3.3 RÉFÉRENCES

1. Allison AC and Gregoriadis G, "An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity", *J. Immunol. Methods*, 95, 157-168, 1986.
2. Allison AC and Gregoriadis G, "Liposomes as immunological adjuvants", *Nature*, 252, 252, 1974.
3. Ostro MJ and Cullis PR, "Use of liposomes as injectable drug-delivery systems", *Amer. J. Hosp. Pharm.*, 46, 1576-87, 1989.
4. Phillips NC and Chédid L, Muramyl peptides and liposomes in "Liposomes as drug carriers" (Gregoriadis G), John Wiley & sons Ltd, New York, (pp. 243-259), 1988.
5. Zee-Cheng R.K.-Y and Cheng CC, "Delivery of anticancer drugs", *Methods Find. Exp. Clin. Pharm.*, 11, 439-529, 1989.
6. Kinsky SC, "Antibody-complement interaction with the lipid model membranes", *Biochim. Biophys. Acta*, 265, 1-23, 1972.
7. Marston S, "Propyl gallate on liposomes", *Contact Dermatitis*, 27, 74-76, 1992.
8. Gutierrez C., Gaspar L, Muro R, Kreisler M, Ferriz P, "Autoimmunity in patients with spanish toxic oil syndrome", *Lancet*, 1: 8325, 644, 1983.
9. Medoff G, Brajtburg J, Bolard J and Kobayashi GS, "Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections", *Sci. & Med.*, 23, 303-30, 1983.
10. Viviani MA, Rizzardini G, Tortorano AM, Fasan M, Roverselli AM, Gringeri A and Suter F, "Lipid based amphotericin B in the treatment of cryptococcosis", *Infection*, 22, 137-42, 1994.
11. Tollemar J, Andersson S, Ringden O, Tygen G, "A retrospective clinical comparison between antifungal treatment with liposomal amphotericin B (Ambisome) and conventional amphotericin B transplant recipients", *Mycoses*, 35, 215-20, 1992.
12. Laxenaire MC, Mata Bermejo E, Moneret-Vautrin DA, Gueant JL, "Life threatening anaphylactoid reactions to propofol (Diprivan)", *Anesthesiology*, 77, 275-80, 1992.

13. Gregoriadis G, "Liposomes in therapeutic and preventive medicine: the development of the drug carrier concept", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 308, 343-370, 1978.
14. Gregoriadis G, Allison AC, "Entrapment of proteins in liposomes prevents allergic reactions in pre-immunized mice", *FEBS Lett.*, 45, 71-74, 1975.
15. Arrora N, Gangal SV, "Immunomodulation by liposome entrapped allergen", *Mol. Cell Biochem.*, 97, 173-179, 1990.
16. Gregoriadis G, "Immunological adjuvants" a role for liposomes", *Immunol. Today*, 11, 89-97, 1990.
17. Gregoriadis G, Panagiotidi C, "Immunoadjuvant action of liposomes: comparison with other adjuvants", *Immunol. Lett.*, 20, 237-240, 1989.
18. Fidler IJ, Sone S, Smith SD, Fogler WE, Braun DG, Tarcsay L, Gisler RJ and Schroit A, "Selective delivery of drugs encapsulated in liposomes: natural targeting to macrophages involved in various disease state", *J. Biol. Response Modif.*, 2, 97-100, 1983.
19. Elorza B, Elorza MA, Fructos G, Chantres JR, "Characterization of 5-fluorouracil located liposomes prepared by reverse phase evaporation or freeze-thawing extrusion methods: study of drug release", *Biochim. Biophys. Acta*, 1153, 135-42, 1993.
20. Hostetler KY, Stuhmiller LM, Lenting HB, Van Der Bosch H, Richman DD, "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine", *J. Biol. Chem.*, 265, 6112-7, 1990.
21. Van Rooijen N, "Liposomes" in *Encyclopaedia of Immunology* (Eds. Ivan M Roitt and Peter J Delves), UK, Vol. 2, pp. 986-88, 1992.
22. Mitchison NA, Rejewsky K, Taylor RB, in *Development Aspects of Antibody Formation and Structure*, Sterzl J, Riha I, Eds., Academic Publishing House, Praha, 547-560, 1970.
23. Gregoriadis G, Neerunjun ED, "Homing of liposomes to target cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 65, 537-44, 1975.
24. Van Rooijen N, van Nieuwmegen R, "Liposomes in immunology: evidence that their adjuvant effect results from surface exposition of the antigens", *Cell. Immunol.*, 49, 402-7, 1980.

25. Van Rooijen N, van Nieuwmegen R, Immunoadjuvant properties of liposomes, in *Targeting of Drugs*, NATO ASI, series A, Gregoriadis G, Senior J, Trouet A, Eds., Plenum Press, New York, 301-315, 1982.
26. Shek PN, Sabiston BH, "Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. II. Comparison of the effectiveness of vesicle-entrapped and surface-associated antigen in immunopotential", *Immunology*, 47, 627-32, 1982.
27. Torchilin VP, Klibanov AL, Ivanov NN, Gluckhova MA, Koteliansky VE, Kleinman HK, Martin GR, "Binding of antibodies in liposomes to extracellular matrix antigens", *J. Cell. Biochem.*, 28, 23-9, 1985.
28. Jansons VK, Mallett PL, "Targeted liposomes: a method for preparation and analysis", *Anal. Biochem.*, 111, 54-9, 1981.
29. Endoh H, Suzuki Y, Hashimoto Y, "Antibody coating of liposomes with 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide and the effect on target specificity", *J. Immunol. Methods*, 44, 79-85, 1981
30. Leserman LD, Machy P, Barbet J, "Cell-specific drug transfer from liposomes bearing monoclonal antibodies", *Nature*, 293, 226-8, 1981.
31. Alving CR, Banerji B, Shiba T, Kotani S, Clements JD, Richards RL, "Liposomes as vehicles for vaccines", *Progress in Clin. Biol. Research*, 47, 339-55, 1980.
32. Phillips NC, Tsoukas C., "Liposomal encapsulation of azidothymidine, results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome", *Blood*, 79, 1137-43, 1992.
33. Phillips NC, Emili A, "Enhanced antibody response to liposome-associated protein-antigens: preferential stimulation of IgG2a/b production", *Vaccine*, 14, 898-904, 1996.
34. Kulkarni SB, Betagri GV, Singh M, "Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes", *J. Microencapsulation*, 12, 229-246, 1995.
35. Miller JC, Miller JN, "Statistics for analytical chemistry", 2<sup>ème</sup> édition, Horwood E, Chichester, 1988.

## **CONCLUSION**



Depuis la découverte des liposomes par Bangham en 1963 [1], plusieurs applications ont été évaluées et étudiées [2-8]. Les liposomes ont plusieurs caractéristiques importantes qui définissent leur potentiel comme transporteurs de médicaments. Ces vésicules lipidiques présentent plusieurs avantages dont les plus importants sont:

1. Étant obtenus à partir des phospholipides naturels, les liposomes sont complètement biocompatibles et causent peu d'effets secondaires à l'organisme.
2. Les principes actifs peuvent être incorporés, soit dans la phase aqueuse interne soit dans la bicouche phospholipidique.
3. Les composés incorporés dans les liposomes sont protégés du milieu externe et produisent ainsi moins d'effets secondaires à l'organisme.
4. Les liposomes ont la capacité d'introduire à l'intérieur des cellules les molécules de médicaments par fusion ou par endocytose.

À cause de leur versatilité structurale en termes de taille, de composition, de charge de surface, de fluidité membranaire et de capacité à incorporer pratiquement n'importe quel type de médicament sans que sa solubilité, les liposomes sont des vecteurs idéaux pour usage clinique.

Les liposomes sont de plus en plus utilisés comme transporteurs pour les médicaments ayant des propriétés pharmaco-cinétiques non favorables (ex : courte demi-vie dans le plasma ou inactivation métabolique rapide). Étant connus pour leur capacité d'encapsuler les enzymes [9], les hormones [10], les antibiotiques [11] et les agents cytostatiques [12], les liposomes ont aussi été reconnus pour leur aptitude à véhiculer des analogues nucléosidiques anti-VIH-1 [13] et les promédicaments de ceux-ci [14, 15]. Ces études ont démontré que l'activité antivirale des analogues nucléosidiques anti-VIH-1 liposomaux a été maintenue ou améliorée par

rapport au médicament libre. De plus, une diminution de la toxicité a été observée pour certaines formulations [17].

Les promédicaments lipophiles du 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT) ont été préalablement synthétisés dans le but d'augmenter l'activité antivirale et d'améliorer la biodisponibilité de la molécule mère dans le sang. Bien que plusieurs de ces promédicaments ont déjà été incorporés dans des formulations liposomales, leur stabilité dans le plasma ainsi que leur potentiel hapténique restent encore à déterminer. La synthèse d'une série lipophile d'esters aliphatiques d'AZT ( $C_{12}$ - $C_{18}$ ) a déjà été publiée par Kawaguchi et al. [18]. Dans ce mémoire on a décrit: a) la synthèse, la caractérisation ainsi que le degré de la rétention de quatre promédicaments lipophiles d'AZT (le laurate d'AZT, le myristate d'AZT, le palmitate d'AZT et le stéarate d'AZT) dans les liposomes (chapitre I), b) la synthèse du [ $^3$ H]-palmitate d'AZT, son incorporation, sa rétention ainsi que sa libération induite par le plasma à partir des porteurs liposomaux (chapitre II) et c) la capacité du palmitate d'AZT d'agir comme un haptène suite à son encapsulation dans les liposomes (chapitre III).

Des liposomes multilamellaires (0,12-0,16  $\mu$ m) ont été préparés par lyophilisation d'un mélange de phospholipides (DPPC/DMPG) dans du t-butanol et ce en présence des promédicaments d'AZT ( $C_{12}$ - $C_{18}$ ). Suite à la réhydratation, une étude de la taille, de la charge et de la rétention de ces promédicaments dans les liposomes en présence de tampon salin phosphate (PBS) a été faite à 4, 22 et 37°C .

Le potentiel  $\zeta$  des liposomes était négatif pour les quatre préparations (-8,91 à -10,23) (Tableau I.IV). Cette charge est associée aux phospholipides chargés négativement (DMPG) et dont on s'est servi pour la formulation des liposomes. La libération de l'ester d'AZT à partir des liposomes formulés avec du DPPC/DMPG et dans du PBS à 4, 22 ou 37°C

était différente pour les quatre sortes de promédicaments. Une meilleure rétention pour le palmitate d'AZT ainsi que pour le laurate d'AZT a été observée, et ce, aux trois différentes températures. De même, une augmentation du taux de libération en allant de 4 à 37°C, était observable dans ces deux formulations, due à l'augmentation de la fluidité membranaire qui induit une augmentation de la libération des promédicaments à travers les bicouches phospholipidiques. Une élongation de la chaîne aliphatique sur la fonction hydroxyle présent en position 5' de la molécule d'AZT a fait diminuer la valeur de la pente dans la courbe d'étalonnage (Tableau I.V et Figure 1.4). Puisque l'absorption UV se trouve principalement dans le noyau thymine, une élongation de la chaîne aliphatique induit une augmentation de l'encombrement stérique autour du noyau thymine et une diminution de l'absorbance de la molécule.

Des liposomes multilamellaires (0,2-0,7  $\mu\text{m}$ ) ont été préparés par lyophilisation d'un mélange de lipides/phospholipides dans du t-butanol en présence du palmitate d'AZT marqué avec du [ $^3\text{H}$ ]. Suite à la réhydratation, une étude d'incorporation liposomale et de rétention subséquente en présence de tampon salin phosphate (PBS) et de PBS/plasma (1:1 v/v) a été faite à différentes températures avec plusieurs formulations de liposomes.

L'incorporation liposomale du [ $^3\text{H}$ ]-palmitate d'AZT est meilleure avec une chaîne de palmitate lipophile. La rétention du [ $^3\text{H}$ ]-palmitate d'AZT dans les liposomes en présence de PBS est excellente avec 5 à 10% de perte sur une période d'incubation de 24 heures. L'incubation des liposomes contenant le [ $^3\text{H}$ ]-palmitate d'AZT dans le plasma résulte en une perte significative du promédicament avec le temps. Le mécanisme par lequel le cholestérol stabilise les liposomes in vitro peut s'expliquer par l'action des lipoprotéines de haute densité qui prélèvent les molécules phospholipidiques contenant peu ou pas de cholestérol dans leur formulation [19]. Le

cholestérol, en retenant les molécules de phospholipides les unes contre les autres non seulement réduit la perméabilité de la bicouche mais prévient la mobilité des phospholipides et leur dissociation subséquente par les lipoprotéines, probablement en formant des complexes avec celles-ci [20].

Des souris femelles du type CD1 ont été immunisées 1 fois par semaine sur une période d'un mois avec du palmitate d'AZT libre et liposomal ainsi qu'avec des liposomes contenant l'AZT non estérifié. Une étude d'ELISA a été faite afin de pouvoir déterminer la présence des anticorps IgG et IgM retrouvés dans le serum des souris. Des injections répétées de liposomes contenant le palmitate d'AZT résulte en une induction d'anticorps IgG et IgM chez les souris. L'absence d'une réponse immunitaire contre l'AZT non estérifié incorporé dans les liposomes montre que la molécule est présentée sur la surface des liposomes plutôt qu'à l'intérieur de ceux-ci. À une concentration plus faible que 0,1  $\mu\text{mol}$  en palmitate d'AZT, il y a absence de production d'anticorps. L'encapsulation du palmitate d'AZT dans les liposomes est capable de produire des anticorps à une concentration aussi faible que 0,1  $\mu\text{mol}/10 \mu\text{mol}$  de phospholipides. L'induction d'une réponse immunitaire contre les liposomes contenant l'ester d'AZT peut affecter la biodisponibilité ainsi que le temps de résidence dans la circulation sanguine.

La synthèse des promédicaments d'AZT a permis à celui-ci d'avoir un caractère lipophile afin qu'il puisse s'insérer dans les bicouches phospholipidiques des liposomes et avoir ainsi un meilleur taux d'incorporation. Le [ $^3\text{H}$ ]-palmitate d'AZT liposomal, lorsqu'il est présent dans un milieu contenant du plasma, est libéré plus rapidement des liposomes sous l'action des protéines plasmatiques qui s'adhèrent aux phospholipides et les enlèvent de la surface liposomale libérant ainsi le [ $^3\text{H}$ ]-palmitate d'AZT. Le palmitate d'AZT est capable de produire des anticorps seul ou en

combinaison avec les liposomes. La réponse immunitaire chez les souris injectées avec du palmitate d'AZT liposomal est plus prononcée que celle observée chez les souris injectées avec le promédicament libre, prouvant que le palmitate d'AZT est plus susceptible de produire une réponse immunitaire dans sa forme liposomale que dans sa forme libre.

## RÉFÉRENCES

1. Bangham AD, "Physical structure and behaviour of lipids and lipid enzymes", *Adv. Lipid Res.*, 1, 65-70, 1963.
2. Davis SS, Lisbeth I, "Colloidal carriers and drug targeting", *Acta Pharm. Tech.*, 32, 4-9, 1986.
3. Gregoriadis G., "Liposome technology", Vols 1-3 (Boca Raton: CRC Press) 1993.
4. Gregoriadis G., Florence AT, Patel HM, "Liposomes in drug delivery", (London: Harwood), 1993.
5. Mezei M, Nugent FJ, "Methods of encapsulating biologically active materials in multilamellar lipid vesicles", *US patent 4, 54, 485-490*, 1984.
6. Nassander UK, Storm G, Peters PAM, Cromellin DJA, "Liposomes. In Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems", Chasin M, Langer R, (New York: Marcel Dekker), 261-338, 1990.
7. Ostro MJ, "Liposomes: From Biophysics to Therapeutics", (New York: Marcel Dekker), 1987.
8. Ostro MJ, Cullis PR, "Use of liposomes as injectable drug delivery systems", *Amer. J. of Hosp. Pharm.*, 46, 1576-1587, 1989.
9. Gregoriadis G, "Targeting of drugs", *Nature*, 265, 407-411, 1977.
10. Patel HM, Ryman BE, "Oral administration of insulin by encapsulation with liposomes", *FEBS letters*, 62, 60-63, 1976.
11. Gregoriadis G, "Drug entrapment in liposomes", *FEBS lett.*, 36, 292-296, 1973.
12. Kleinerman SE, Hudson MH, "Liposome Therapy: a novel approach to the treatment of childhood osteosarcoma", in *Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer*, Lopez-Berestein G, Eds., Alan R Liss Inc, New York, 71-80, 1988.
13. Zelphati O, Degols G, Loughrey H, Leresman L, Pompon A, Puech F, Maggio A,F, Imbach J,L, Gosselin G, "Inhibition of HIV-1 replication in cultured cells with phosphorylated dideoxyuridine derivatives encapsulated in immunoliposomes", *Antiviral Res.*, 21, 181-195, 1993.

14. Van Borssum Waalkes M, Fichtner I, Dontje B, Lemm M, Becker M, Arndt D, Scherphof GL, "In vivo distribution and antitumour activity of liposomal 3',5'-O-dipalmitoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine", *J. of Microencapsulation*, 9, 335-46, 1992.
15. Hostetler KY, Richman DD, Carson DA, Stuhmiller LM, van Wijk GM, Van den Bosch H, "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3'-deoxythymidine", *Antimicrob. Agents & Chemother.*, 36, 2025-9, 1992.
16. Phillips NC, Tsoukas C., "Liposomal encapsulation of azidothymidine, results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome", *Blood*, 79, 1137-43, 1992.
17. Woodle MC, Lasic D, "Sterically stabilized liposomes", *Biochim. Biophys. Acta*, 1113, 171-99, 1992.
18. Kawaguchi T, Ishikawa K, Seki T, Juni K, "Ester prodrugs of Zidovudine", *J. Pharm. Sci.*, 79: 6, 531-33, 1990.
19. Gregory G., Kirby C, Meehan A, Senior J, "Targeting of liposomes: some prerequisites for success", in *Liposomes, "Drugs and Immunocompetent Cell Functions"*, Nicolau C, Paraf A, Eds., Academic Press, New York, 29-32, 1981
20. Papahadjopoulos D, Jacobson K, Nir S, Isac T, "Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol", *Biochim. Biophys. Acta*, 311, 330-48, 1973.