

---

Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /  
Université libre de Bruxelles Institutional Repository  
**Thèse de doctorat/ PhD Thesis**

**Citation APA:**

Benamer, H. (2003). *Développement, optimisation et caractérisation d'une pro-droque lipophile de la dexaméthasone sous forme liposomale*  
(Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté de Pharmacie, Bruxelles.

**Disponible à / Available at permalink :** <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/211320/1/c55512d3-939c-4a54-8f2d-d761fee387ef.txt>

---

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

**Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.**

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- **English Version** -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

**If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.**

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.

---

B.P.A.H.

# Université Libre de Bruxelles

Institut de Pharmacie

Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie

Professeur K. AMIGHI, promoteur  
Professeur A.J. MOËS, copromoteur

## **DEVELOPPEMENT, OPTIMISATION ET CARACTERISATION D'UNE PRO-DROGUE LIPOPHILE DE LA DEXAMETHASONE SOUS FORME LIPOSOMALE**

Par

Hassan BENAMEUR  
Ingénieur Chimiste

Université Libre de Bruxelles



003201123

pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences  
Applications pharmaceutiques

Année Académique 2002 - 2003

*À mon père et mon frère à titre posthume,  
À ma mère pour l'amour et la confiance que tu m'as  
toujours témoignée.*

*À mes sœurs et frère pour m'avoir supporté dans les bons  
comme dans les moins bons moments.*

*À mon fils et ma fille, qui par leur patience et amour me  
porte plus loin chaque jour.*

*Enfin, tous mes remerciements et toute mon affection à  
mon épouse pour m'avoir successivement encouragé et  
poussé à tous les moments pendant toutes ces années et  
spécialement lors de l'élaboration de ce travail.*

*A Monsieur le Professeur Moës qui a dirigé mon travail, pour ses qualités humaines et sa disponibilité*

*A Monsieur le Professeur Amighi qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse, qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.*

*A Monsieur le Professeur Bruno Flamion pour ses conseils et son soutien permanent. Qu'il trouve ici le témoignage de mon plus profond respect pour notre collaboration.*

*Aux membres du Jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.*

## Préambule

Le présent travail a été entrepris dans le but d'étudier certains aspects galéniques, technologiques et biologiques de liposomes contenant du palmitate de dexaméthasone, une pro drogue lipophile de la dexaméthasone.

De tels liposomes pourraient servir d'anti-inflammatoires locaux, en particulier pour une administration intra-pulmonaire en aérosols.

De plus, une méthode originale de production industrielle de liposomes apyrogènes applicable à ce type de préparation a été développée, et leur conservation par lyophilisation a été envisagée.

<b>1.</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>BASES DU TRAVAIL</b>	<b>1</b>
1.1.1	LES LIPOSOMES, VECTEURS MEDICAMENTEUX	1
1.1.2	DES LIPOSOMES A VISEE PULMONAIRE	6
1.1.3	UNE PREPARATION LIPOSOMALE D'UN GLUCOCORTICOÏDE	8
1.1.4	LA PREPARATION INDUSTRIELLE DE LIPOSOMES A VISEE PULMONAIRE	10
<b>1.2</b>	<b>STRUCTURE DES LIPOSOMES</b>	<b>11</b>
1.2.1	DEFINITION	11
1.2.2	COMPOSITION	13
1.2.2.1	Phospholipides	13
1.2.2.2	Cholestérol	16
1.2.2.3	Composants non structurels	17
1.2.2.4	Classification des liposomes selon leur structure physique	17
<b>1.3</b>	<b>PREPARATION DES LIPOSOMES</b>	<b>19</b>
1.3.1	PRINCIPE	19
1.3.2	TRANSITION DE PHASE DES PHOSPHOLIPIDES	20
1.3.3	CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES METHODES DE FABRICATION	22
1.3.4	FABRICATION DE LIPOSOMES PAR DISPERSION MECANIQUE DES PHOSPHOLIPIDES	23
1.3.4.1	Liposomes MLV obtenus par hydratation d'un film lipidique	23
1.3.4.2	Liposomes SUV obtenus au moyen d'ultrasons	25
1.3.4.3	Liposomes SUV obtenus par extrusion	26
1.3.4.4	Liposomes obtenus par homogénéisation à haute pression	30
1.3.4.5	Liposomes obtenus par microfluidisation	32
1.3.5	FABRICATION DE LIPOSOMES PAR DISPERSION D'UNE SOLUTION ORGANIQUE DE PHOSPHOLIPIDES	34
1.3.5.1	Injection d'une solution éthanolique de phospholipides	34
1.3.5.2	Evaporation en phase inversée (« REV-liposomes »)	35
1.3.5.3	Infusion d'éther	37
1.3.6	METHODES BASEES SUR L'ELIMINATION D'UN DETERGENT	39
1.3.7	AUTRES METHODES D'ENCAPSULATION EN LIPOSOMES	40
1.3.7.1	Méthodes basées sur une augmentation de taille des liposomes	40
1.3.7.2	Méthode basée sur une microencapsulation	42
1.3.8	RESUME DES PROCEDES DE PREPARATION DES LIPOSOMES	44
1.3.8.1	Caractéristiques	44
1.3.8.2	Avantages et inconvénients	45
<b>1.4</b>	<b>STABILITE ET CONSERVATION DES LIPOSOMES</b>	<b>46</b>
1.4.1	STABILITE CHIMIQUE DES LIPOSOMES	46
1.4.1.1	Peroxydation lipidique	46
1.4.1.2	Hydrolyse des phospholipides	47
1.4.2	STABILITE PHYSIQUE DES LIPOSOMES	47
1.4.2.1	Agrégation et fusion	48
1.4.2.2	Perte en principe actif encapsulé	48
1.4.3	CONSERVATION DES LIPOSOMES A L'ETAT CONGELE OU DESSECHE	49
1.4.3.1	Congélation	49
1.4.3.2	Lyophilisation et atomisation	50
<b>1.5</b>	<b>PREPARATION INDUSTRIELLE DE LIPOSOMES</b>	<b>53</b>
1.5.1	INTRODUCTION	53
1.5.2	QUALITE DES MATIERES PREMIERES	53
1.5.3	APYROGENICITE	54
1.5.4	STERILITE	55

1.5.5	AUTRES EXIGENCES	57
1.5.6	TRANSPPOSITION A L'ECHELLE INDUSTRIELLE	57
1.5.7	SYSTEME DE CONTROLE DE QUALITE DES FORMULATIONS LIPOSOMALES	59
<b>1.6</b>	<b>METHODES DE CARACTERISATION DES LIPOSOMES</b>	<b>59</b>
<b>1.7</b>	<b>ADMINISTRATION DE LIPOSOMES SOUS FORME D'AEROSOLS</b>	<b>62</b>
1.7.1	INTRODUCTION	62
1.7.2	NEBULISATION	64
1.7.3	INHALATION DE LIPOSOMES SOUS FORME DE PARTICULES SECHEES	65
<b>1.8</b>	<b>L'UTILISATION THERAPEUTIQUE DES GLUCOCORTICOÏDES</b>	<b>66</b>
1.8.1	GENERALITES	66
1.8.2	MECANISMES D'ACTION	67
1.8.2.1	Principes généraux d'action	67
1.8.2.2	Structure et fonction du récepteur aux glucocorticoïdes	68
1.8.2.3	Points d'impact cellulaires des glucocorticoïdes	70
1.8.3	EFFETS GENERAUX DES GLUCOCORTICOÏDES	72
1.8.4	EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES DES GLUCOCORTICOÏDES	73
1.8.4.1	Protéines antiinflammatoires activées	74
1.8.4.2	Protéines inflammatoires réprimées	74
1.8.5	EFFETS DES GLUCOCORTICOÏDES SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE	75
1.8.6	UTILISATION PHARMACOLOGIQUE DES CORTICOÏDES	76
1.8.6.1	Relation structure-activité	76
1.8.6.2	Aspects pharmacocinétiques des corticoïdes	79
1.8.6.3	Principales indications des corticoïdes	79
1.8.6.4	Principaux effets indésirables des corticoïdes	79
1.8.6.5	Problèmes liés aux traitements prolongés aux corticoïdes	82
1.8.6.6	Les glucocorticoïdes dans le traitement de l'asthme	82
1.8.6.7	Les glucocorticoïdes en inhalation	83
<b>1.9</b>	<b>MONOGRAPHIE DE LA DEXAMETHASONE</b>	<b>86</b>
1.9.1	ORIGINE	86
1.9.2	PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	86
1.9.3	PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES	87
1.9.4	PROPRIETES PHARMACOCINETIQUES	87
1.9.5	PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES	88
1.9.6	DOSAGE	89
1.9.7	LE PALMITATE DE DEXAMETHASONE (DMP)	89

## **2. MATERIEL ET METHODES** **90**

---

<b>2.1</b>	<b>APPAREILS</b>	<b>90</b>
2.1.1	OSMOMETRE	90
2.1.1.1	Principe	91
2.1.2	COMPTEUR BETA	92
2.1.2.1	Aspects pratiques	92
2.1.3	SPECTROPHOTOMETRE D'ABSORPTION	94
2.1.3.1	Aspects pratiques	94
2.1.4	EVAPORATEUR ROTATIF	95
2.1.5	POMPE A VIDE	96
2.1.6	MANOMETRE A MERCURE	97
2.1.7	SONDE A TEMPERATURE	97
2.1.8	ANALYSEURS DE TAILLE DES PARTICULES	98
2.1.9	DESINTEGRATEUR ULTRASONIQUE	98
2.1.10	HOTTES A FLUX LAMINAIRE	99

TABLE DES MATIERES

2.1.11	AUTOCLAVE	100
2.1.12	LYOPHILISATEURS	100
2.1.12.1	Lyophilisateur GT4	100
2.1.12.2	Lyovac GT3	102
2.1.13	CONDUCTIMETRE	103
2.1.13.1	Principe	103
2.1.13.2	Appareillage	104
2.1.14	MONITEUR EUTECTIQUE	105
2.1.15	DIFFRACTOMETRE	105
2.1.16	ANALYSE ENTHALPIQUE DIFFERENTIELLE (DSC)	106
2.1.17	CELLULE A NUMEROTATION	107
2.1.18	SYSTEME DE RECOLTE DES CELLULES	107
<b>2.2</b>	<b>SOLUTIONS ET REACTIFS</b>	<b>107</b>
2.2.1	REACTIFS POUR LA PREPARATION ET L'ANALYSE DES LIPOSOMES	107
2.2.2	REACTIFS POUR LES CULTURES ET L'ANALYSE DES LYMPHOCYTES	111
<b>2.3</b>	<b>METHODES</b>	<b>112</b>
2.3.1	METHODES CHROMATOGRAPHIQUES	112
2.3.1.1	Chromatographie Couche Mince (ascendante d'adsorption)	112
2.3.1.2	Chromatographie de filtration sur gel	113
2.3.1.3	Minicolonnes Sep Pak Plus	113
2.3.1.4	Chromatographie Liquide à Haute performance (HPLC)	115
2.3.2	COUPLAGE ENTRE LA DEXAMETHASONE ET LE CHLORURE DE PALMITOYL	115
2.3.3	PREPARATION DU DMP TRITIE (D*MP)	116
2.3.4	PREPARATION DES LIPOSOMES	117
2.3.5	EXTRACTION DU CHOLESTEROL DES LIPOSOMES	119
2.3.6	DETERMINATION DU POURCENTAGE D'ENCAPSULATION	122
2.3.6.1	Mesure par D*MP tritié	122
2.3.6.2	Mesure par spectrophotométrie	122
2.3.7	DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES PAR LA METHODE DE STEWART	123
2.3.8	COEFFICIENT DE PARTAGE	124
2.3.9	CALCUL CONFORMATIONNEL	125
2.3.9.1	Molécule isolée	125
2.3.9.2	Assemblage en monocouche	126
2.3.9.3	Assemblage en bicouche	127
2.3.10	TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE	128
2.3.10.1	Principe	128
2.3.10.2	Préparation des lymphocytes	132
2.3.10.3	Comptage total des cellules	132
2.3.10.4	Comptage des cellules viables	133
2.3.10.5	Culture cellulaire et mesure de la prolifération	134
2.3.10.6	Mesure de la production d'interféron- $\gamma$	135
2.3.10.7	Test de coloration cellulaire au Diff-Quik	136
<b>2.4</b>	<b>MESURES D'APYROGENICITE ET DE STERILITE</b>	<b>138</b>
2.4.1	TEST DE CHALLENGE MICROBIOLOGIQUE DE FILTRES MEMBRANE STERILISANT	138
2.4.1.1	Principe	138
2.4.1.2	Matériel	138
2.4.1.3	Produits	138
2.4.1.4	Mode opératoire	139
2.4.2	VERIFICATION DE LA STERILISATION	140
2.4.2.1	Principe	140
2.4.2.2	Produits	140
2.4.2.3	Mode opératoire	140
2.4.3	DETERMINATION DE LA PYROGENICITE PAR LE TEST DU L.A.L. (LYSAT D'AMOEOCYTE DE LIMULE)	142
2.4.3.1	Principe	142

2.4.3.2	Définitions	142
2.4.3.3	Matériel	143
2.4.3.4	Produits	143
2.4.3.5	Mode opératoire	144
<b>2.5</b>	<b>NETTOYAGE D'UNE MEMBRANE DE MICROFILTRATION</b>	<b>148</b>
<b>2.6</b>	<b>PROTOCOLE DE VALIDATION DE LA PRODUCTION DE LIPOSOMES</b>	<b>148</b>
2.6.1	PRINCIPE	148
2.6.2	MATERIEL	148
2.6.2.1	Matériel de production	148
2.6.2.2	Matériel de préparation des produits	149
2.6.3	PRODUITS	149
2.6.3.1	Pour le film	149
2.6.3.2	Pour le tampon	150
2.6.4	MODE OPERATOIRE:	150
2.6.4.1	Préparation de la hotte à flux laminaire vertical et des appareillages	150
2.6.4.2	Préparation du film lipidique	150

### **3. RESULTATS ET DISCUSSION** **153**

<b>3.1</b>	<b>MESURES PHYSICO-CHIMIQUES RELATIVES A LA DXM ET AU DMP</b>	<b>155</b>
3.1.1	COUPLAGE ENTRE LA DXM ET LE CHLORURE DE PALMITOYL	155
3.1.2	ANALYSE ENTHALPIQUE DIFFERENTIELLE (DSC) DU DMP	166
3.1.3	SOLUBILITE DE LA DXM ET DU DMP	168
3.1.3.1	Méthode UV	168
3.1.3.2	Comptage $\beta$	169
3.1.3.3	Solubilité du DMP	170
3.1.4	COEFFICIENT DE PARTAGE N-OCTANOL-EAU	170
3.1.5	CONCLUSION DES MESURES PHYSICO-CHIMIQUES	171
3.1.6	MONOGRAPHIE SUCCINCTE DU DMP	171
<b>3.2</b>	<b>ANALYSE CONFORMATIONNELLE</b>	<b>172</b>
<b>3.3</b>	<b>PREPARATION DES LIPOSOMES DMP</b>	<b>179</b>
3.3.1	ESSAI D'ENCAPSULATION DU DMP EN MLV	179
3.3.2	CHOIX DE LA METHODE DE SEPARATION	184
3.3.3	ESSAIS D'ENCAPSULATION DU DMP EN SUV	185
<b>3.4</b>	<b>ACTIVITE BIOLOGIQUE DES LIPOSOMES SUV-DMP</b>	<b>189</b>
3.4.1	CHOIX DE LA METHODE	189
3.4.2	EXPERIENCES PRELIMINAIRES	190
3.4.3	EFFET DES SUV-DMP SUR LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE	194
3.4.4	EFFET DES SUV-DMP SUR LA PRODUCTION D'INTERFERON- $\gamma$	196
3.4.5	CONCLUSIONS SUR L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES SUV-DMP	198
<b>3.4</b>	<b>PRODUCTION DE LIPOSOMES STERILES ET APYROGENES A L'ECHELLE DE LABORATOIRE</b>	<b>200</b>
<b>3.5</b>	<b>PRODUCTION DE LIPOSOMES A L'ECHELLE PILOTE ET INDUSTRIELLE</b>	<b>203</b>
3.5.1	ETAT DE L'ART	203
3.5.2	METHODES BREVETEEES DE PREPARATION INDUSTRIELLE DE LIPOSOMES	204
3.5.2.1	Production par extrusion de liposomes	204
3.5.2.2	Production par un évaporateur adapté	205
3.5.3	LE REACTOSOME™	206
3.5.3.1	Introduction	206
3.5.3.2	Principe général de fabrication de liposomes dans le Réactosome	206
3.5.3.3	Description du Réactosome	210
3.5.4	PRODUCTION DE LIPOSOMES AVEC LE REACTOSOME	215
<b>3.6</b>	<b>ETUDES PRELIMINAIRES DES CONDITIONS DE LYOPHILISATION DES LIPOSOMES</b>	<b>220</b>

TABLE DES MATIERES

3.6.1	LYOPHILISATION EN CONDITIONS STANDARD	220
3.6.2	EXAMEN DES CONDITIONS DE LYOPHILISATION	222
3.6.3	MESURE DE LA CONDUCTIVITE DE SOLUTIONS DE REFERENCE	223
3.6.4	MESURE DE LA CONDUCTIVITE DES DISPERSIONS LIPOSOMALES	228

**4.** CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 232

---

**5.** BIBLIOGRAPHIE 235

---

**6.** ANNEXES 259

---

# 1. Introduction

## 1.1 Bases du travail

### 1.1.1 Les liposomes, vecteurs médicamenteux

Les liposomes (terme imaginé par *Bangham et al., 1965*) sont des vésicules lipidiques non-toxiques et biodégradables constituées d'une ou plusieurs bicouches membranaires renfermant des compartiments aqueux (*Ostro, 1987 ; New, 1990 ; Delattre et al., 1993*). Selon le mode de préparation, il est possible d'obtenir des vésicules multilamellaires (MLV, pour *multilamellar vesicles*), de grandes vésicules unilamellaires (LUV, pour *large unilamellar vesicles*) ou de petites vésicules unilamellaires (SUV, pour *small unilamellar vesicles*). La taille de ces vésicules varie de 20 nm à 50 µm.

Les liposomes sont capables d'incorporer une grande variété de substances : les composés hydrophiles sont encapsulés dans les compartiments aqueux tandis que les composés lipophiles s'enchâssent dans les bicouches lipidiques. Une alternative à l'incorporation de substances liposolubles est de les complexer avec des cyclodextrines avant leur encapsulation dans la phase aqueuse des liposomes (*McCormack & Gregoriadis, 1994*).

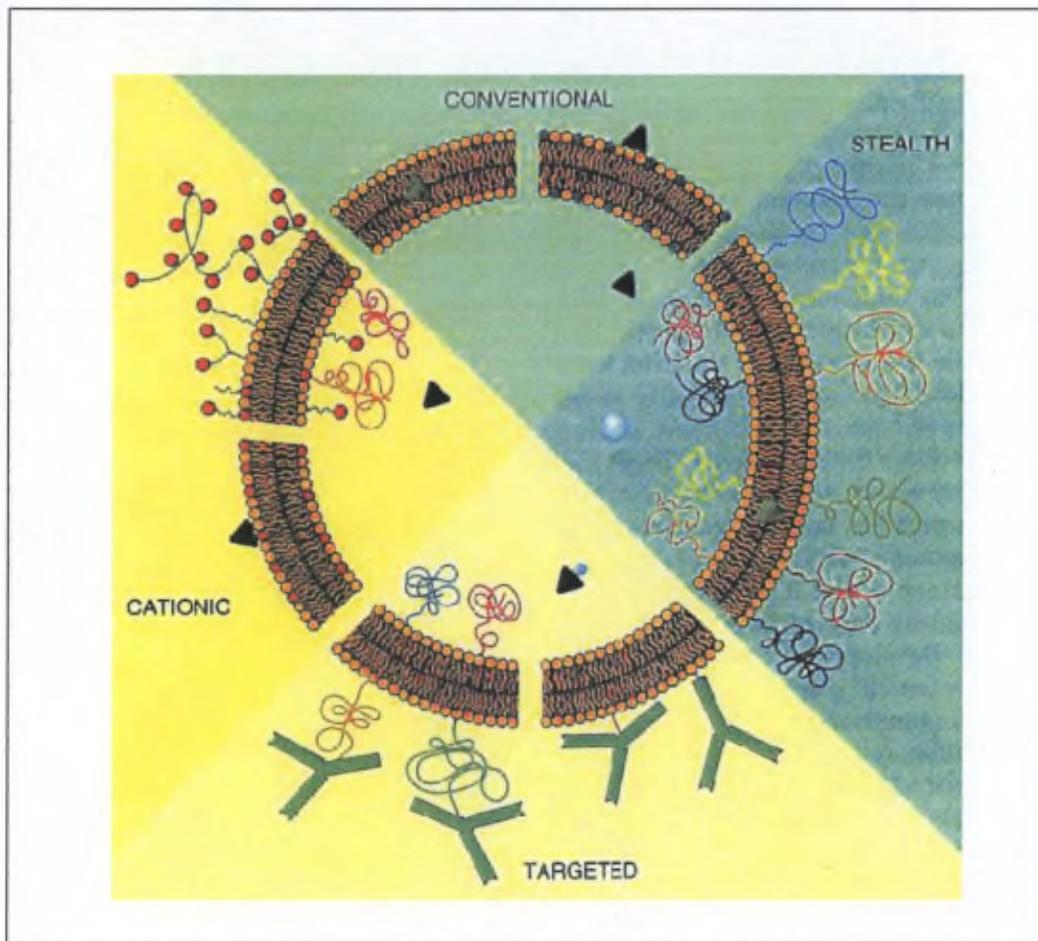
Le potentiel de vectorisation médicamenteuse des liposomes est énorme. Il est étudié depuis plus de deux décennies (**Tableau 1.1**). Dès les premiers essais, il a été démontré que l'incorporation de divers principes actifs dans des liposomes pouvait à la fois en augmenter l'efficacité et en diminuer les effets toxiques. C'était le cas de l'antimoine, une substance leishmanicide (*Alving et al., 1978 ; New et al., 1978*), et de la doxorubicine, un anticancéreux (*Forssen & Tokes, 1981*). C'est aussi le cas de l'association la plus connue, et la plus utilisée à l'heure actuelle, entre une substance thérapeutique et des lipides : celle de l'amphotéricine B (*Janoff et al., 1988*). Cette association peut d'ailleurs prendre différentes formes, qui ne sont pas toutes liposomales.

**Tableau I.1.** Relevé bibliographique de la mise au point de liposomes à visée thérapeutique.

Année	Auteurs / Editeurs	Titre
1978	Alving et al.	Therapy of leishmaniasis : superior efficacies of liposome-incorporated drugs. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> . 75:2959-2963.
1978	New et al.	Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. <i>Nature</i> . 272:55-57.
1978	Juliano & Stamp	Pharmacokinetics of liposome-encapsulated antitumor drugs. <i>Biochem. Pharmacol.</i> 27:21-27.
1981	Forssen & Tokes	Use of anionic liposomes for the reduction of chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> . 78:1873-1877.
1984	Gregoriadis	Liposome Technology (vol. 2) : Incorporation of Drugs, Proteins, and Genetic Material. CRC Press, Boca Raton.
1984	Gregoriadis	Liposome Technology (vol. 3) : Targeted Drug Delivery and Biological Interaction. CRC Press, Boca Raton.
1985	Puisieux & Delattre	Les Liposomes : Applications Thérapeutiques. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
1986	Mayer et al.	Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. <i>Chem. Phys. Lipids</i> 40:335-345.
1987	Ostro	Liposomes : From Biophysics to Therapeutics. Marcel Dekker, New York.
1987	Felgner et al.	Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> . 84:7413-7417.
1988	Janoff et al.	Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of amphotericin B. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> . 85:6122-6126.
1988	Gregoriadis	Liposomes as Drug Carriers. John Wiley & Sons, London.
1988	Lopez-Berenstein & Fidler	Liposomes in the Therapy of Infections, Diseases and Cancer. Alan Liss, New York.
1989	Cullis et al.	Generating and loading of liposomal systems for drug-delivery applications. <i>Adv Drug Deliv Rev.</i> 3 :267-282.
1989	Ostro & Cullis	Use of liposomes as injectable drug delivery systems. <i>Am J Hosp Pharm.</i> 46:1576-1587.
1989	Martin	Pharmaceutical manufacturing of liposomes. In : Specialized Drug Delivery Systems. Tyle P., Ed. Marcel Dekker, New York, pp. 267-316.
1990	Madden et al.	The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient : a survey. <i>Chem Phys Lipids.</i> 53:37-46.
1990	Leserman et al.	Targeted liposomes and intracellular delivery of macromolecules. <i>Prog Clin Biol Res.</i> 343:95-102.
1990	Egbaria et al.	Liposomes as topical drug delivery system. <i>Adv Drug Deliv Res.</i> 5:287-300.
1992	Brown-Falco et al.	Liposome Dermatics. Springer-Verlag, Berlin.
1992	Talsma & Crommelin	Liposomes as Drug Delivery Systems (Parts I to III). <i>Pharm. Technol.</i> 16:52-58 ; 16:96-106 ; 17:48-59.
1993	Gregoriadis	Liposome Technology, 2 <sup>nd</sup> Edition. CRC Press, Boca Raton.
1993	Delattre et al.	Les Liposomes : Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques. Tec & Doc Lavoisier, Paris.
1995	Martin & Lasic	Stealth Liposomes. CRC Press, Boca Raton.
1997	Sharma & Sharma	Liposomes in drug delivery : progress and limitations. <i>Int J Pharm.</i> 154:123-140.
1997	Lasic	Liposomes in Gene Delivery. CRC Press, Boca Raton.
1998	Lasic & Papahadjopoulos	Medical Applications of Liposomes. Elsevier, Amsterdam.
2000	Gregoriadis & McCormack	Targeting of Drugs : Strategies for Gene Constructs and Delivery. IOS Press, Amsterdam.

Les mécanismes par lesquels les liposomes augmentent le rapport bénéfice/sécurité de certains principes actifs ne sont généralement pas bien connus. Dans l'organisme, on peut concevoir que les liposomes servent à la fois de protection, de réservoir, de vectorisation et de voie d'entrée intracellulaire contrôlée à des dizaines de principes actifs, d'antigènes (vaccination), d'acides nucléiques (thérapie génique), voire d'hémoglobine. De plus, les voies d'administration potentielles des liposomes sont variées : orale, parentérale, intra-articulaire, pulmonaire, nasale, oculaire ou dermique.

Ces potentialités sont augmentées par la possibilité de modifier pratiquement à l'infini la structure et les caractéristiques physico-chimiques des liposomes, ce qui a conduit au développement de nouvelles formes liposomales, schématisées dans la **Fig. 1.1**.



**Fig. 1.1.** Différents types de liposomes à visée thérapeutique : conventionnels, à longue durée de circulation [« stealth »], immunoliposomes [« targeted »], ou cationiques. Molécules hydrophiles, molécules lipophiles, D'après : Storm & Crommelin, 1998.

Ces nouvelles formes, qui s'ajoutent aux liposomes conventionnels, peuvent être résumées comme suit :

1. Les **liposomes furtifs** ou « stealth liposomes » (*Allen & Hansen, 1991*) ont une longue durée de circulation : ils échappent au système réticulo-endothélial grâce à une couverture de polymères hydrophiles, le plus souvent le polyéthylène glycol, et à une taille appropriée, 70 à 200 nm (*Allen, 1994 ; Litzinger et al., 1994 ; Woodle, 1998*).
2. Les **immunoliposomes** (*Huang et al., 1983*) portent des anticorps ou des fragments d'anticorps spécifiques et sont généralement dirigés vers des tumeurs (*Mastrobattista et al., 1999*).
3. Les **liposomes sensibles au pH** (*Yatvin et al., 1980*) peuvent délivrer leur contenu dans des conditions mieux contrôlées, mais leur intérêt clinique est loin d'avoir été démontré jusqu'à présent (*Drummond et al., 2000*).
4. Enfin, les **liposomes cationiques**, qui sont à la base du procédé de transfection d'ADN appelé « lipofection » (*Felgner et al., 1987*), soulèvent de grands espoirs pour l'apport cellulaire de matériel génétique (*Mahato et al., 1997*) ou d'oligonucléotides (*Couvreur et al., 2000*). Toutefois, les complexes lipides cationiques-ADN utilisés dans ce but ne sont pas toujours des liposomes au sens vésiculaire du terme (*Safinya, 2001*).

Malgré la multiplicité des voies d'approche évoquées ci-dessus, il était cependant évident, au moment où débutait ce travail (et cela reste vrai à l'heure actuelle), que le potentiel médicamenteux des liposomes restait sous-exploité. Ainsi, si l'on considère les médicaments liposomaux qui sont actuellement commercialisés (**Tableau 1.2**), on constate qu'ils sont peu nombreux, et qu'ils sont tous destinés à la voie systémique. Plusieurs se présentent sous forme « furtive ».

**Tableau 1.2.** Les principaux médicaments liposomaux actifs par voie systémique et actuellement commercialisés.

Nom	Principe actif	Type de liposome	Indication	Fabricant
AmBisome	Amphotéricine B	Charges négatives	Mycose systémique	NeXstar Pharm. – Gilead
Abelcet	Amphotéricine B	( <i>complexe lipidique</i> )	Mycose systémique	The Liposome Co. – Elan
Amphocil	Amphotéricine B	( <i>complexe lipidique</i> )	Mycose systémique	Sequus Pharm.
Doxil – Caelyx	Doxorubicine	Stealth (pegylé)	Sarcome de Kaposi	Sequus Pharm. – Alza Corp.
DaunoXome	Doxorubicine	Lipides à haut Tc	Sarcome de Kaposi	NeXstar Pharm. – Gilead
Myocet	Doxorubicine	Stealth	Cancer du sein avec métastases	The Liposome Co. – Elan
Epaxal Berna	vaccin	« virosome » = phospholipides + protéines virales	Hépatite A	Swiss Serum & Vaccine Inst.
Visudyne	Verteporfine	Stealth	Dégénérescence maculaire	Novartis Ophthalm. – QLT
Liposom Forte	(lipides seulement)	Phospholipides de l'hypothalamus	« Altérations métaboliques cérébrales »	Fidia (Italie)

Ainsi, un concept qui reste largement inexploité est celui de l'administration locale de liposomes dans une cavité fermée de l'organisme, où ils pourraient cibler les cellules phagocytaires et/ou inflammatoires et s'y associer de façon prolongée, réalisant ainsi une forme « dépôt » d'un grand intérêt. C'est ainsi qu'a germé la première idée de ce travail : réaliser une forme liposomale d'un puissant glucocorticoïde qui pourrait servir d'anti-inflammatoire-dépôt dans des cavités fermées. Nous pensons en particulier à l'arbre pulmonaire, atteint par voie d'aérosol. En effet, contrairement aux cavités articulaires par exemple, le poumon est un système où les formes à libération prolongée locales n'ont pas encore fait leurs preuves. Pourtant, comme allons le discuter dans les paragraphes suivants, l'intérêt d'un anti-inflammatoire intra-pulmonaire à libération prolongée ne fait pas de doute.

En réfléchissant ensuite au problème de l'incorporation liposomale de principes actifs, il est apparu que les substances lipophiles possédaient un avantage indéniable, en terme de pourcentage d'incorporation, de rétention et de stabilité chimique. Comme le discutait le professeur Ruisschaert dès 1984, cet avantage est maximal pour les molécules qui forment des complexes stables avec les lipides membranaires (*Defrise-Quertain et al., 1984*). D'ailleurs, le concept de réaliser des prodrugs lipophiles afin d'améliorer leur formulation liposomale était défendu par Knight il y a près de vingt ans (*Knight, 1981*). C'est en suivant cette logique que s'est développée l'idée de modifier une molécule de glucocorticoïde afin de la rendre non seulement plus lipophile mais également mieux insérable dans la membrane liposomale.

Il faut noter que, ces dernières années, bien après le début de ce travail, le thème de l'encapsulation d'une prodrogue lipophile dans des liposomes à visée thérapeutique s'est considérablement étoffé (*Sampedro et al., 1994 ; Williams et al., 1995 ; Crosasso et al., 1997 ; Gulati et al., 1998*). Certaines de ces formulations, en particulier celles qui contiennent des dérivés de l'ara-C et du muramyl dipeptide, sont parvenues au stade d'essais cliniques (*Keller-Lucae et al., 1999 ; Worth et al., 1999*).

Examinons maintenant plus en détail ces deux aspects : l'administration intrapulmonaire de liposomes à visée thérapeutique, et l'incorporation liposomale de dérivés glucocorticoïdes.

### **1.1.2 Des liposomes à visée pulmonaire**

L'idée de développer des médicaments liposomaux à visée pulmonaire est logique. Elle découle de l'intérêt bien établi de la thérapie par les aérosols, qui est un moyen efficace de délivrer des doses relativement faibles de principes actifs directement au niveau de leur site d'action, le poumon, tout en maintenant des concentrations plasmatiques limitées (*Gonda, 1990 ; Witek, 2000*). Une des applications majeures de cette voie d'administration pulmonaire est la thérapie de l'asthme bronchique par les agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques et les glucocorticoïdes (*Taburet & Schmit, 1994 ; Barnes, 1995 ; British Thoracic Society, 1997 ; Georgitis, 1999*). Le traitement des infections pulmonaires bactériennes, virales, fongiques ou parasitaires représente une autre voie d'application prometteuse des aérosols médicamenteux, déjà exploitée dans la mucoviscidose (*O'Riordan & Faris, 1999*).<sup>1</sup>

Cependant, la réalisation de la thérapie par les aérosols reste imparfaite, et cela pour plusieurs raisons : difficultés techniques liées à une mauvaise solubilisation de certaines substances ou à leur caractère irritant, accès trop peu sélectif aux sites d'action, et absorption systémique trop rapide des principes actifs inhalés, ce qui peut entraîner l'apparition de pics plasmatiques élevés et d'effets indésirables (*Taburet & Schmit, 1994*). Une absorption rapide peut également restreindre la durée d'action locale des principes actifs inhalés, ce qui multiplie les prises et diminue la compliance.

---

<sup>1</sup> Nous n'envisagerons pas, dans ce travail, l'administration pulmonaire de substances à visée d'action systémique, comme les peptides, les protéines et les acides nucléiques (*Mallet et al., 1997*).

Une solution élégante à ces problèmes serait d'utiliser, à l'avenir, des systèmes à libération contrôlée applicables aux poumons. Les **liposomes** représentent un des systèmes à libération pulmonaire contrôlée les plus prometteurs (*Schreier, 1992 ; Schreier et al., 1993 ; Zeng et al., 1995 ; Klyashchitsky & Owen, 1999*). En effet :

1. Ils peuvent être aisément dispersés sous forme d'aérosols grâce à des nébuliseurs à air comprimé classiques (*Taylor et al., 1990b ; Niven & Schreier, 1990 ; Waldrep et al., 1994 ; Vidgren et al., 1995 ; Darwis & Kellaway, 2001*) ou être inhalés sous forme de poudre sèche (« DPI » ou « IPS » *Schreier et al., 1994 ; Beaulac et al., 1999 ; Joshi & Misra, 2001*). Les méthodes de préparation de liposomes à visée pulmonaire seront détaillées plus loin (cf. point 1.6 de l'INTRODUCTION).
2. Ils ne présentent aucune toxicité pulmonaire particulière (*Myers et al., 1993*). Les études de tolérance chez l'homme sont quasi unanimement favorables (*Thomas et al., 1991 ; Gilbert et al., 1997*), même en cas d'asthme sévère (*Saari et al., 1998*).
3. Ils se déposent de manière efficace dans les voies respiratoires où ils demeurent intacts durant de longues périodes et, de ce fait, constituent des micro-réservoirs médicamenteux avec une cinétique de libération assez lente. Généralement, des concentrations locales significatives de principe actif sont encore décelées après 24 ou 48 heures (*Jurima-Romet & Shek, 1991 ; Gilbert et al., 1993 ; Shek et al., 1994 ; Beaulac et al., 1996 ; Letsou et al., 1999*). Dans les études où elle a été mesurée, la demi-vie d'élimination pulmonaire du principe actif était beaucoup plus longue avec une forme liposomale : 57 h pour le cromoglycate sodique, contre 2 h pour le même composé en solution (*Taylor et al., 1989*), et plus de 20 jours pour une amphotéricine B liposomale en aérosol chez la souris (*Lambros et al., 1997*). Une des applications les plus rapidement envisageable des aérosols liposomaux est, assez logiquement, le traitement antibiotique des infections pulmonaires (*Gilbert, 1996*).
4. Ils facilitent la pénétration de principes actifs dans les macrophages alvéolaires et peut-être dans d'autres cellules impliquées dans les pathologies pulmonaires (*Forsgren et al., 1990 ; Gonzalez-Rothi et al., 1991 ; Myers et al., 1993 ; Goldbach et al., 1996*).
5. Ils pourraient être préparés à partir de matériaux qui sont des constituants naturels du surfactant pulmonaire (*Desai & Finlay, 2002*). Des liposomes à base de surfactants non ioniques, ou « niosomes », ont été développés comme vecteurs médicamenteux depuis quelques années (*Baillie et al., 1985 ; Uchegbu & Vyas, 1998*).

6. Mais l'intérêt principal des liposomes à visée pulmonaire pourrait être l'acheminement efficace des principes actifs hydrophobes, tels les glucocorticoïdes ou la cyclosporine A, vers l'ensemble de l'arbre respiratoire. Cette notion, qui a été soulignée dans un article de revue récent (*Klyashchitsky & Owen, 1999*), servait déjà de base théorique à notre travail.
7. Ces dernières années ont vu apparaître plusieurs tentatives de thérapie génique intrapulmonaire par voie liposomale, notamment pour le traitement de la mucoviscidose (*Schwarz et al., 1996*). Les premiers résultats ont été décevants, et un long chemin reste à faire afin d'optimiser cette voie d'approche (*Ruiz et al., 2001*).

Les avantages potentiels décrits ci-dessus ont conduit plusieurs équipes de recherches à mettre au point des préparations pharmaceutiques liposomales à visée pulmonaire, dont les principales seront décrites plus loin (cf. 1.6). Cependant, on peut s'étonner qu'à ce jour, aucune de ces préparations n'ait pu déboucher sur une utilisation commerciale. La raison de ce relatif insuccès est double :

1. l'efficacité de l'incorporation et la stabilité de l'association principe actif-liposome sont insuffisantes ;
2. la production industrielle de préparations liposomales à longue conservation en vue d'une administration pulmonaire n'est pas encore assurée.

C'est en gardant à l'esprit ces deux constatations (détaillées plus loin dans l'INTRODUCTION) que nous avons envisagé la constitution d'une forme liposomale de glucocorticoïde.

### **1.1.3 Une préparation liposomale d'un glucocorticoïde**

Parmi les substances qui pourraient bénéficier d'une formulation liposomale à visée pulmonaire, les dérivés glucocorticoïdes viennent immédiatement à l'esprit. En effet, leur administration en aérosol constitue, à l'heure actuelle, la base du traitement de l'asthme (*Barnes, 1995 ; British Thoracic Society, 1997 ; Georgitis, 1999*). L'intérêt des glucocorticoïdes inhalés pourrait s'étendre à d'autres maladies inflammatoires pulmonaires et aux allogreffes de poumons (*Klyashchitsky & Owen, 1999*), quoique cette modalité thérapeutique ne soit pas encore maîtrisée.

Bien qu'utilisés depuis de longues années, les glucocorticoïdes proposés en inhalation dans le traitement de l'asthme présentent encore un certain degré de passage systémique, et donc d'effets indésirables, et leur temps de résidence pulmonaire est souvent insuffisant (*Kamada et al., 1996 ; Committee on Safety of Medicines, 1998 ; Harding, 1999*). C'est pourquoi plusieurs tentatives de constitution et d'administration pulmonaire de préparations liposomales de glucocorticoïdes ont été réalisées au cours des dix dernières années, comme résumé dans le **Tableau 1.3**.

**Tableau 1.3.** Relevé bibliographique des principales préparations liposomales de glucocorticoïdes à visée pulmonaire.

Année	Premier auteur	Corticoïde utilisé	Espèce	Type d'administration	Observations
1990	Forsgren	« corticostéroïde » non précisé	Cochon	Aérosol	Prévient la défaillance respiratoire du choc endotoxinémique
1993	Tremblay	DXM	Souris	Instillation intranasale	Effet supérieur à celui de la DXM libre sur la pneumonie d'hypersensibilité
1996	Gonzalez-Rothi	triamcinolone acétonide phosphate	Rat	Instillation intratrachéale	Occupation prolongée des récepteurs pulmonaires aux GC
1997	DiMatteo	DXM	Rat	Instillation intratrachéale	Réduction de l'inflammation pulmonaire induite par la silice
1997, 1998	Waldrep, Saari	béclométhasone dipropionate	Homme	Aérosol	Bonne tolérance chez des volontaires humains et chez des asthmatiques
2000	Suntres	DXM	Rat	Instillation intratrachéale	Effet supérieur à celui de la DXM libre sur les lésions pulmonaires dues au LPS i.v.

Même si les résultats des expériences résumées dans le **Tableau 1.3** paraissent encourageants, aucune de ces préparations n'est proche d'une utilisation clinique. En fait, à l'examen de ces tentatives, il apparaît que le degré d'encapsulation des corticoïdes dans les liposomes est faible et variable d'une préparation à l'autre. Cela n'est pas surprenant vu la haute perméabilité membranaire de tous les dérivés stéroïdiens, y compris les glucocorticoïdes. Comme discuté précédemment, pour contourner ce problème, nous avons appliqué le principe d'une prodrogue lipophile à un glucocorticoïde, la dexaméthasone.

### **1.1.4 La préparation industrielle de liposomes à visée pulmonaire**

Après la mise au point de la préparation liposomale contenant un dérivé hydrophobe de la dexaméthasone s'est naturellement posée la question de son utilisation pharmaceutique. Comment la produire de façon industrielle et comment la conserver ? Il faut savoir que, parmi les nombreuses méthodes de fabrication de liposomes décrites au cours des trente dernières années et détaillées plus loin, seules un petit nombre se sont révélées adaptables à une production industrielle. En fait, il n'existe à présent aucune méthode de fabrication des liposomes qui soit totalement modulable depuis l'échelle du laboratoire jusqu'à l'échelle industrielle et qui permette de choisir le type (SUV, MLV), la taille (de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$ ) et le degré de purification des liposomes, tout en garantissant leur stérilité et leur apyrogénicité.

De même, le problème de la conservation des liposomes n'est pas tout à fait résolu. Il est bien connu, en effet, que les liposomes présentés sous forme de dispersions aqueuses sont relativement instables (*Lichtenberg & Barenholz, 1988*) et nécessitent des conditions de conservation contraignantes (à 4°C, à l'abri de la lumière, en présence d'antioxydants, etc.). La congélation des liposomes est une alternative intéressante mais relativement peu pratique, au contraire de leur lyophilisation, nettement plus prometteuse (*Shulkin et al., 1984*). Cependant, les aspects galéniques et pharmaceutiques de la lyophilisation des liposomes restent insuffisamment explorés.

Dans ce contexte, la deuxième partie de notre travail expérimental va consister à mettre au point une technique de production et de lyophilisation de liposomes SUV qui permette de maintenir leur structure en vue d'une administration pulmonaire. Cette deuxième partie a débouché sur le dépôt d'un brevet (*Benameur & Moës, 2001* : « *Liposome Preparation Method and Plant* », *US Patent # 6,217,899*).

## 1.2 Structure des liposomes

D'un point de vue historique, la première utilisation médicale de liposomes remonte à 1957 lorsque Friedman et ses collaborateurs ont injecté à des lapins souffrant d'athéromatose une dispersion aqueuse de phospholipides traités aux ultrasons (*Friedman et al., 1957*). Il a fallu attendre 1965 pour que Bangham caractérise des liposomes obtenus par agitation manuelle de phospholipides dans l'eau, cette étape étant généralement considérée comme la « date de naissance » des liposomes (*Bangham et al., 1965*). Depuis lors, l'étude des liposomes a suscité un intérêt croissant. Leur utilisation s'étend actuellement aux domaines biomédical, agro-alimentaire et biotechnologique, ainsi qu'à la chimie fine (*Storm & Crommelin, 1998*).

### 1.2.1 Définition

Le mot liposome est formé à partir de deux racines grecques : la première se réfère aux corps gras (lipides), l'autre à une structure (soma). Cette étymologie est exacte : les liposomes sont des vésicules, petites sphères creuses de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre, dont la membrane est constituée d'une double couche (ou bicouche) de phospholipides incluant un petit volume du solvant dans lequel elles ont été préparées (**Fig. 1.2**). Cette structure de bicouche lipidique constitue le squelette de toutes les membranes biologiques, ce qui fait des liposomes d'excellents modèles membranaires. Les matières premières constituant les liposomes comprennent un ou plusieurs phospholipides auxquels on peut ajouter du cholestérol pour en augmenter la stabilité dans les liquides biologiques.

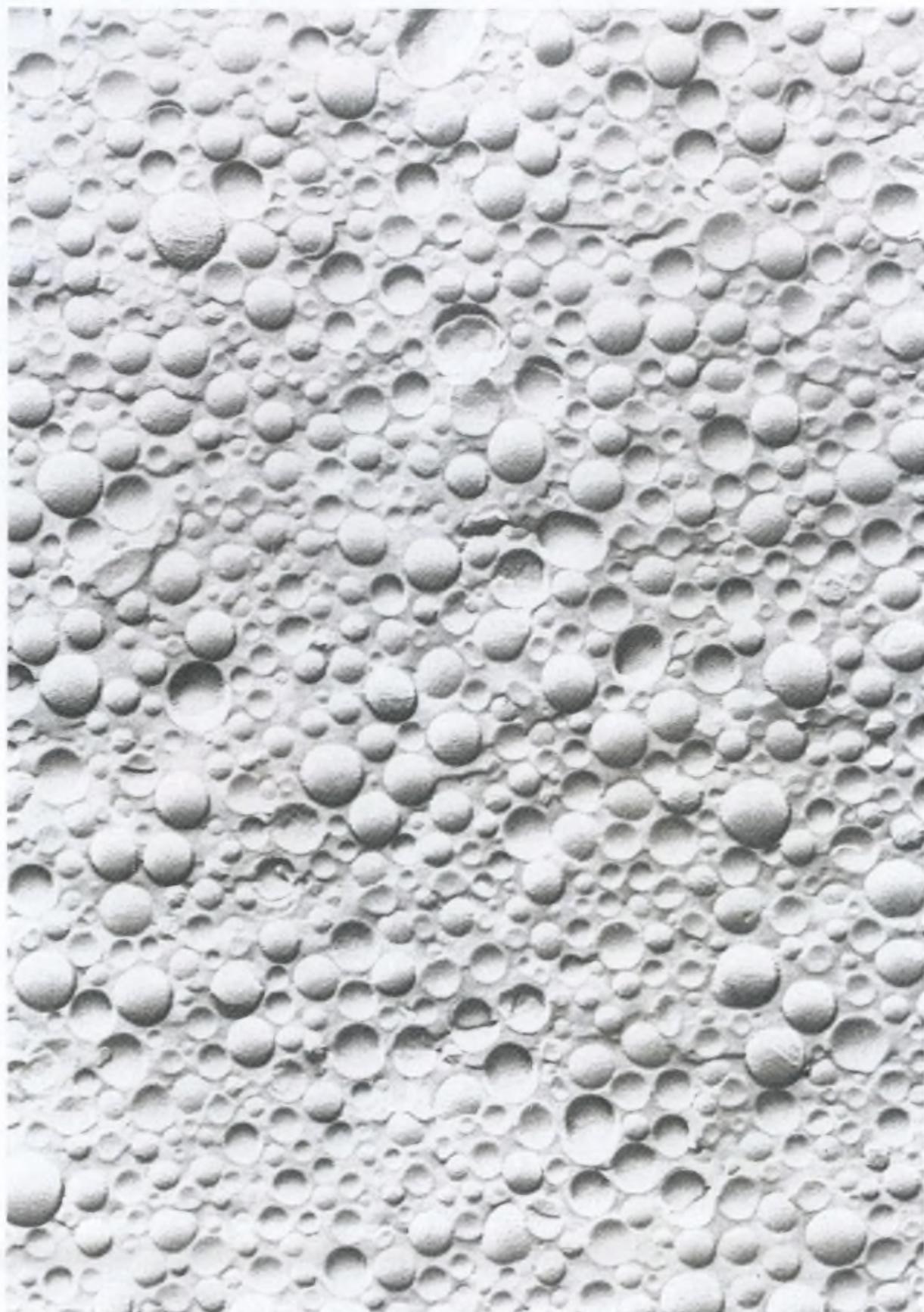


Fig. 1.2. Liposomes, vus en microscopie électronique après cryofracture (*Ostro, 1987*).

## 1.2.2 Composition

La membrane du liposome que nous avons utilisé est composée, exception faite du principe actif, de phosphatidylcholines provenant du jaune d'œuf ou de soja, et de cholestérol. Il existe de nombreuses autres compositions possibles de liposomes, mais nous ne les détaillerons pas.

### 1.2.2.1 Phospholipides

Les liposomes peuvent être constitués de très nombreux types de phospholipides naturels ou synthétiques. Les lécithines sont les phospholipides naturels les plus communs dans les membranes biologiques. Ils sont extraits, soit de graines oléagineuses, principalement soja et colza, soit de matières animales, essentiellement d'œuf. Le terme de lécithine est utilisé pour désigner des mélanges plus ou moins purs de phospholipides contenant des pourcentages variables de phosphatidylcholines (PC), mais aussi de phosphatidyléthanolamine (PE), de phosphatidylinositol (PI), et d'autres phospholipides. Selon leur origine et leur degré de pureté, les lécithines commerciales se présentent sous des formes physiques différentes : liquide, pâte, poudre ou grains. Pour la préparation de liposomes, il est préconisé d'utiliser des lécithines purifiées. Dans les différentes phases de notre travail n'ont été utilisées que des lécithines qui contenaient près de 100 % de PC (Phospholipon<sup>®</sup> 100 ou Lipoid E 100). La nature exacte de ces lécithines sera précisée dans la partie « MATÉRIELS ET MÉTHODES ». Dans la suite de l'introduction, nous utiliserons les termes de lécithine et de PC de façon interchangeable.

Les PC se composent d'une molécule de glycérol dont les trois fonctions alcool sont estérifiées, deux d'entre elles par une molécule d'acide gras à longue chaîne hydrocarbonée,  $[(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3]$ , où le nombre  $n$  d'atomes de carbone varie entre 14 et 20, et la troisième par une molécule d'acide phosphorique, elle-même liée à un amino-alcool, la choline (**Fig. 1.3**).

Les acides gras des PC comprennent un certain nombre de liaisons insaturées (**Tableau 1.4**).

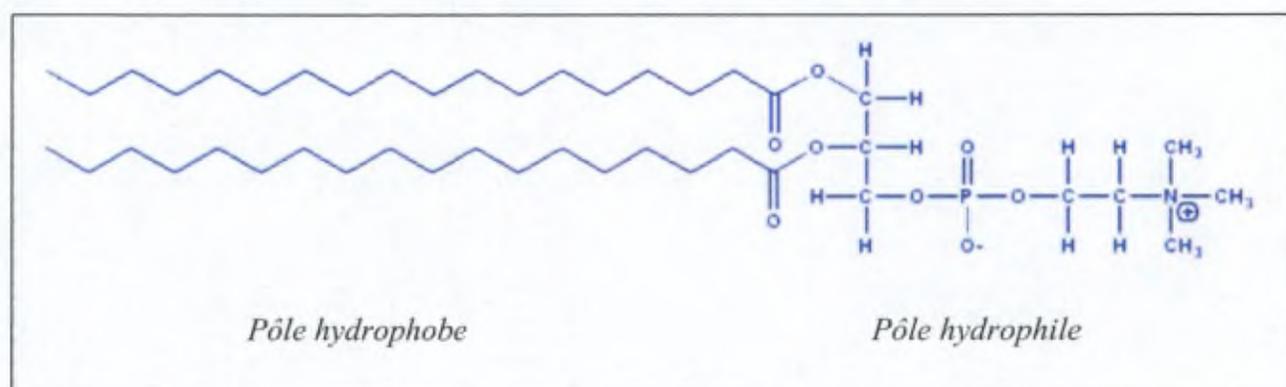


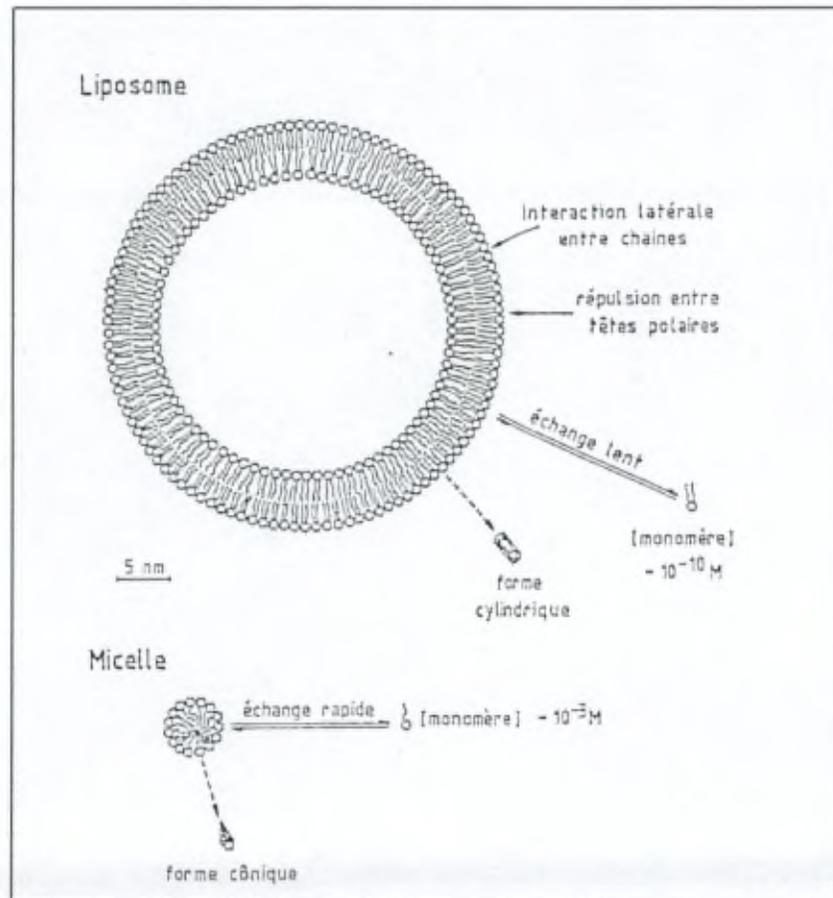
Fig. 1.3. Formule développée de la phosphatidylcholine (PC).

Tableau 1.4. Acides gras de la phosphatidylcholine de jaune d'œuf (d'après New 1990).

Abréviations	Nom systématique	Nom commun
C16 :0	hexadécanoïque	palmitique
C16 :1	cis-9-hexadécanoïque	palmitoléique
C18 :0	octadécanoïque	stéarique
C18 :1	cis-9-octadécénoïque	oléique
C18 :2	cis,cis-9,12-octadécadiénoïque	linoléique
C18 :2	cis,cis-6,9-octadécadiénoïque	
C18 :3	tous cis-9,12,15-octadécatriénoïques	à-linolénique
C18 :3	tous cis-6,9,12-octadécatriénoïques	â-linolénique
C20 :0	eicosanoïque	arachidique
C20 :1	cis-9-eicosanoïque	gadoléique
C20 :3	tous cis-8,11,14-eicosatriénoïques	
C20 :4	tous cis-5,8,11,14-eicosatétranoïques	arachidonique
C20 :5	tous cis-5,8,11,14,17-eicosapentanoïques	
C22 :0	docosanoïque	béhénique
C22 :5	tous cis-7,10,13,16,19-docosapentanoïques	
C22 :6	tous cis-4,7,10,13,16,19-docosahexanoïques	

Comme la plupart des phospholipides naturels, les lécithines sont des molécules amphiphiles dont les chaînes hydrocarbonées constituent la partie apolaire (hydrophobe) et le groupement phosphate modifié, la tête polaire (hydrophile). Les phospholipides se distinguent entre eux par la longueur des chaînes hydrocarbonées, par les insaturations éventuelles que comportent ces chaînes et par la structure du groupe polaire. En raison de contraintes thermodynamiques et structurales, les phospholipides, comme toute molécule amphiphile, ont tendance à s'associer au contact de l'eau pour former des édifices supramoléculaires protégeant la partie hydrophobe de la solution aqueuse environnante. Etant donné qu'il s'agit de lipides amphipathiques bicaténaires, ceux-ci forment généralement au contact de l'eau des agrégats de structure lamellaire, constitués d'un empilement de bicouches phospholipidiques séparées les unes des autres par le milieu aqueux (Fig. 1.4).

En revanche, les molécules amphiphiles ne possédant qu'une seule chaîne hydrocarbonée forment en solution des structures ordonnées appelées micelles (Fig. 1.4).



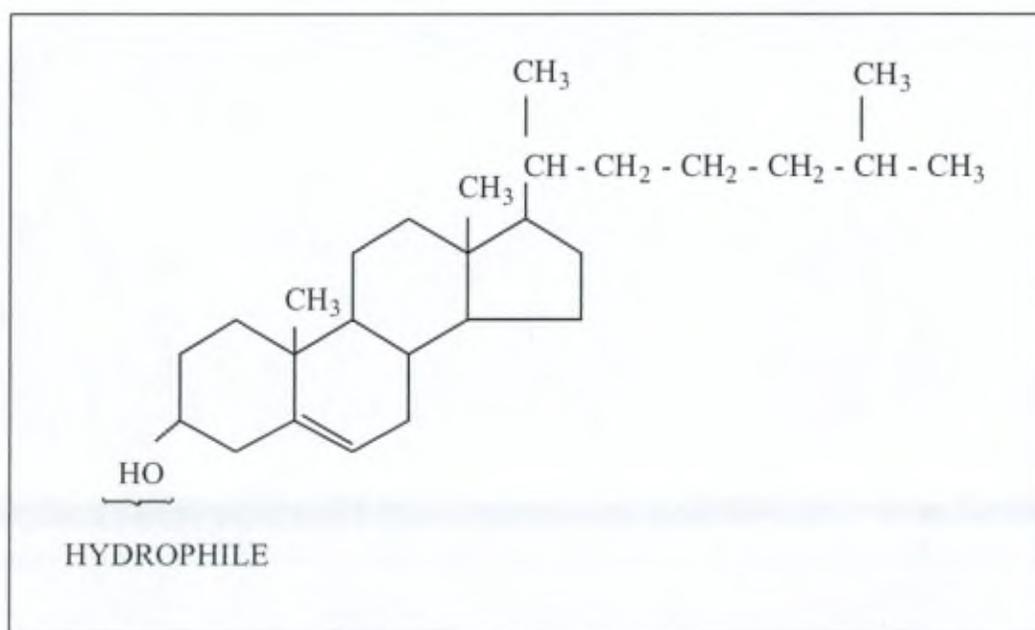
**Fig. 1.4.** Systèmes supramoléculaires organisés : Structures liposomale et micellaire (Faucon & Méléard, 1993).

### 1.2.2.2 Cholestérol

Le cholestérol (**Fig. 1.5**), autre composé essentiel de la membrane plasmique, n'est pas indispensable à la constitution des liposomes au départ de phospholipides, mais il en augmente la stabilité par une combinaison de deux actions ambivalentes (*Kirby & Gregoriadis, 1980*) :

- ♦ il abaisse le point de fusion du solvant phospholipidique et rend la membrane plus fluide,
- ♦ et il interfère avec les acides gras insaturés ; son système polycyclique rigide lui permet de s'adapter à l'encoignure des chaînes hydrocarbonées cis-insaturées, ce qui augmente les interactions Vander Waals et rend la membrane moins fluide.

En conséquence, la présence de cholestérol tend à stabiliser la fluidité de la membrane face aux variations de température et au degré d'insaturation des chaînes acyles. Cependant, à une concentration supérieure à 50 % (= rapport cholestérol/lécithine de 1:1), le cholestérol élimine la transition de phase des phospholipides et perturbe la constitution de liposomes (*Puisieux, 1985*).



**Fig. 1.5.** Formule développée du cholestérol.

### 1.2.2.3 Composants non structurels

D'autres composants lipophiles peuvent s'insérer dans la « mosaïque fluide » de la membrane liposomale par des interactions non covalentes et y atteindre des concentrations élevées, de l'ordre de 1 à 10 %, sans perturber de façon significative la structure liposomale de base. En revanche, la fluidité et la perméabilité membranaires peuvent être modifiées. Si le composant non structurel interagit de façon spécifique avec la bicouche lipidique, par exemple s'il s'agit d'un stérol ou d'un acide gras, des concentrations de plus de 10 % peuvent être atteintes. Cette propriété a été utilisée dans le présent travail pour l'incorporation d'un principe actif de structure stéroïdienne et acylée.

Nous ne discuterons pas la constitution des liposomes contenant des protéines, des anticorps ou d'autres modifications spéciales.

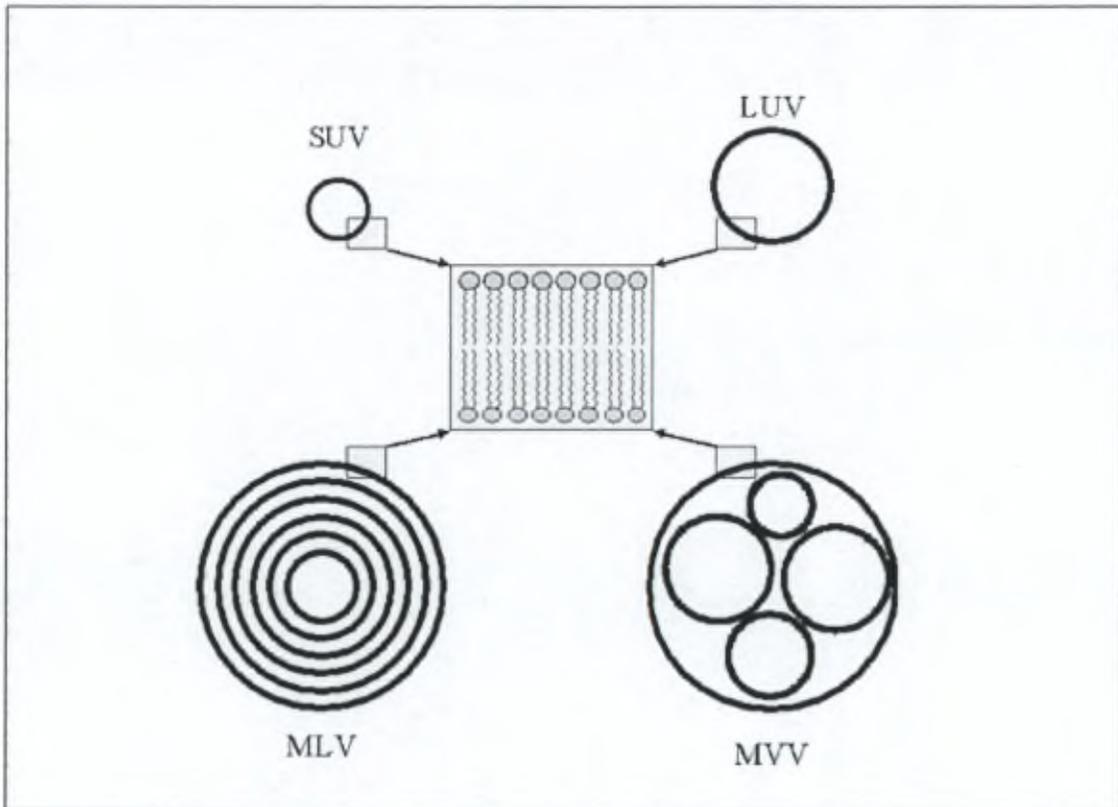
### 1.2.2.4 Classification des liposomes selon leur structure physique

En dehors d'une classification basée sur leurs constituants chimiques, les liposomes peuvent aussi être classifiés selon leur taille et leur structure membranaire (**Fig. 1.6**). Leur taille varie de la plus petite vésicule théoriquement réalisable au moyen d'une bicouche lipidique, d'un diamètre d'environ 25 nm, à des vésicules dépassant 1  $\mu\text{m}$ , visibles en microscopie optique. La membrane des liposomes peut être composée d'une, deux, trois ou plusieurs lamelles, chaque lamelle équivalente à une bicouche lipidique étant séparée de la suivante par une phase aqueuse. Ce type de structure est visible en microscopie électronique.

Selon ces critères, les liposomes sont généralement classés en 3 catégories :

1. des liposomes multilamellaires ou MLV (« multilamellar vesicles »).
2. de petits liposomes unilamellaires ou SUV (« small unilamellar vesicles »).
3. de grands liposomes unilamellaires ou LUV (« large unilamellar vesicles »).

On peut y ajouter les vésicules multivésiculaires ou MVV (**Fig. 1.6**).



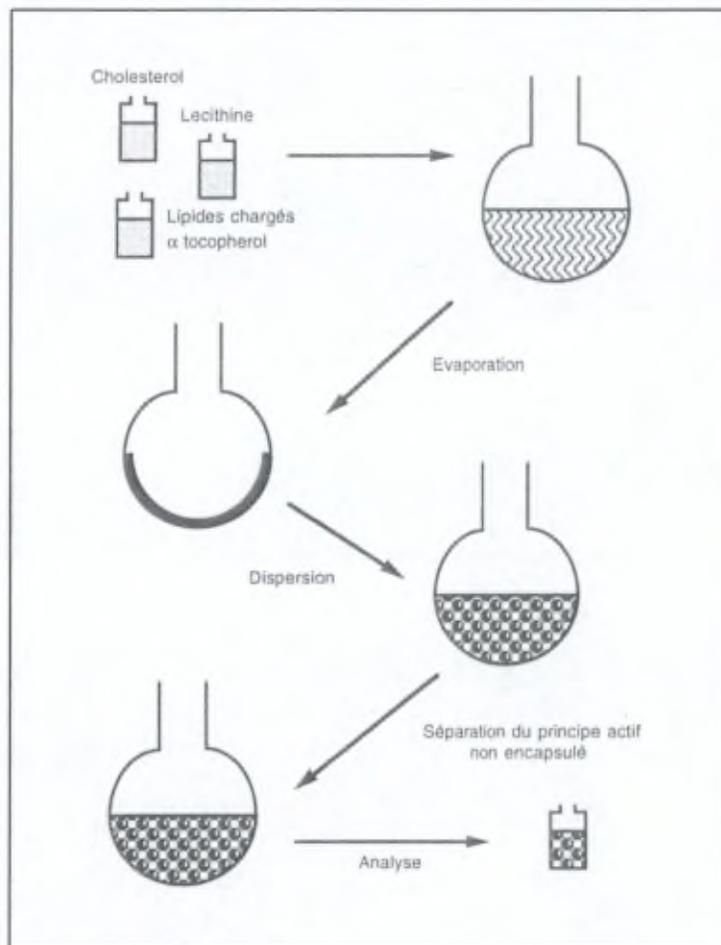
**Fig. 1.6.** Schémas des différents types de liposomes (d'après *Huber & Gabard, 1997*).  
Pour les abréviations, voir texte.

Les propriétés des types de liposomes diffèrent, comme nous le verrons plus loin. Bon nombre des différences existant entre les propriétés physico-chimiques des SUV et celles de MLV proviennent des contraintes d'assemblage des lipides dues au très petit rayon de courbure. Les constituants des SUV sont distribués de façon asymétrique entre les couches interne et externe. De plus, la production de SUV requiert une fourniture d'énergie pour la rupture mécanique des MLV, ce qui rend les SUV thermodynamiquement moins stables ; ils ont tendance à s'agréger au cours du temps.

## 1.3 Préparation des liposomes

### 1.3.1 Principe

Il existe une grande variété de méthodes de préparation des liposomes. Elles sont généralement basées sur le schéma suivant (**Fig. 1.7**) :



**Fig. 1.7.** Schéma général de préparation des liposomes (d'après New, 1990) :

1. dissolution des phospholipides, et éventuellement du cholestérol et du principe actif liposoluble, dans un solvant organique ou un mélange de solvants (chloroforme, méthanol, etc) ;
2. évaporation du solvant sous pression réduite et sous flux d'azote ;
3. hydratation du film lipidique et addition du principe actif hydrophile (tampon et pH définis) ;
4. agitation mécanique pour former des liposomes ;
5. calibrage à la taille (granulométrie) recherchée ;
6. purification des liposomes si un principe actif hydrosoluble est encapsulé.

En général, les méthodes de préparation des liposomes diffèrent par le mode de dispersion des phospholipides dans la solution aqueuse. La température de cette dernière doit être supérieure à la température de transition de phase « gel–cristal–liquide » ( $T_c$ ) du mélange des phospholipides utilisés dans la préparation (dans le cas contraire on n'obtient pas de liposomes).

### 1.3.2 Transition de phase des phospholipides

Les systèmes lipidiques en bicouches existent principalement sous deux états physiques : un état « rigide » où les chaînes hydrocarbonées sont relativement peu mobiles et bien ordonnées, et un état « fluide » où les chaînes hydrocarbonées sont mobiles et désordonnées (Lee, 1977). Chaque lipide, mis en dispersion aqueuse, passera d'un état à l'autre à une température caractéristique, dite température de transition de phase ( $T_c$ ). Cette transition s'accompagne d'un changement de la conformation du lipide et de sa mobilité (Fig. 1.8).

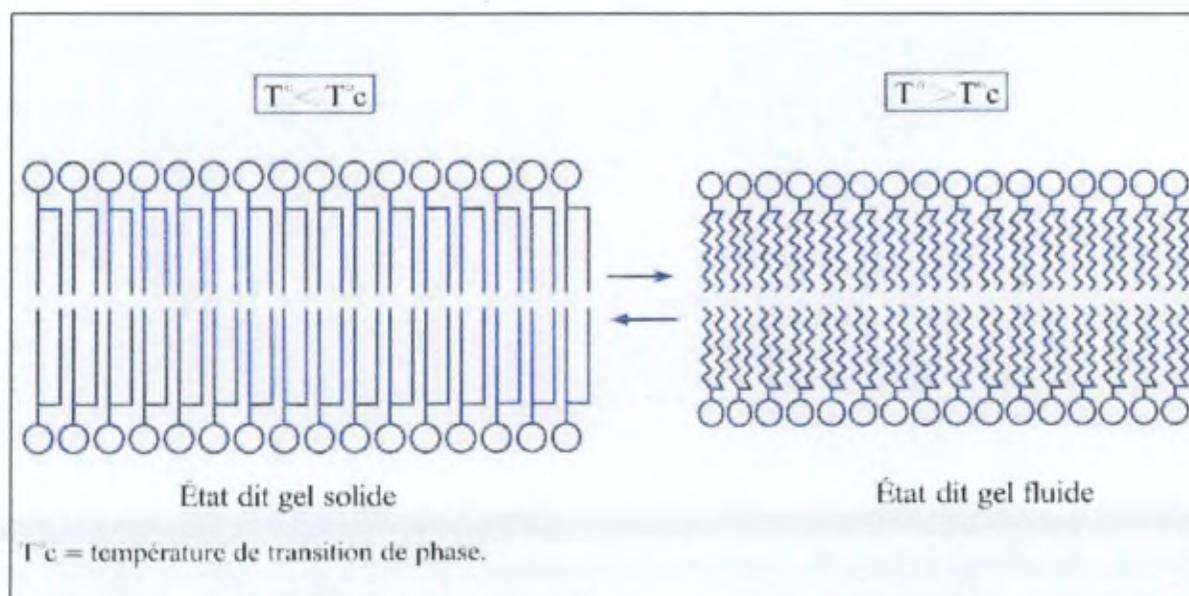


Fig. 1.8. Transition de phase des bicouches lipidiques (adapté de : Faucon, & Méléard, 1993).

$T_c$  augmente avec le nombre d'atomes de carbone constituant les chaînes acylées au sein d'une série homologue et diminue proportionnellement au nombre de liaisons insaturées. (Silvius *et al.*, 1979). En ce qui concerne la phosphatidylcholine de jaune d'œuf, dont la composition et la position des acides gras sont citées dans le **Tableau 1.5**,  $T_c$  varie de  $-15^\circ\text{C}$  à  $-7^\circ\text{C}$ .

**Tableau 1.5.** Position des différents acides gras dans la lécithine de jaune d'œuf (d'après New, 1990).

(1) et (2) : position sur le glycérol.

Acides Gras	(1) (%)	(2) (%)
16 :0	68.8	1.8
18 :0	25.8	1.2
18 :1	4.7	48.9
18 :2	0.2	11.1
18 :3	0.5	-
20 :4	-	2.1
20 :5	-	7.1
22 :5	-	2.6
22 :6	-	25.2

### **1.3.3 Caractéristiques des différentes méthodes de fabrication**

Lorsqu'on étudie une méthode de fabrication de liposomes, il faut avant tout connaître les principales caractéristiques des liposomes obtenus, c'est-à-dire :

- leur taille (diamètre moyen et distribution des tailles) ;
- le nombre de lamelles : liposomes uni-, bi-, tri- ou multi-lamellaires ;
- l'efficacité d'encapsulation des principes actifs (hydrophiles ou lipophiles) qui s'exprime par le taux d'encapsulation (terme quantitatif le plus utilisé) et/ou par la masse de substance encapsulée par unité de masse de lipide ( $\mu\text{g}/\mu\text{mole}$  ou mg de lipide) ou par le volume aqueux encapsulé par unité de masse de lipides ( $\mu\text{l}/\mu\text{mole}$  ou mg de lipide).

D'autres critères entrent également en jeu pour caractériser les méthodes de fabrication des liposomes :

- l'agressivité de la méthode vis-à-vis des substances à encapsuler ;
- sa simplicité et sa rapidité ;
- la stabilité physique et chimique des liposomes obtenus ;
- la possibilité de mise en œuvre à l'échelle industrielle (validation de la méthode de fabrication) ;
- la possibilité de stériliser la préparation obtenue.

Par commodité, les procédés de fabrication des liposomes, détaillés ci-après, seront classés en 3 catégories selon leur procédure de dispersion :

1. Dispersion mécanique telle que l'agitation à la main ou au vortex, la sonication et l'extrusion. L'homogénéisation à haute pression et la microfluidisation appartiennent aussi à cette catégorie.
2. Dispersion par détergent – solubilisation.
3. Dispersion par solvant telle que l'injection d'éthanol, la perfusion d'éther et l'évaporation en phase inverse.

### **1.3.4 Fabrication de liposomes par dispersion mécanique des phospholipides**

#### **1.3.4.1 Liposomes MLV obtenus par hydratation d'un film lipidique**

Il s'agit de la première méthode de fabrication des liposomes, décrite en 1965 (*Bangham et al., 1965*). Ce procédé très simple reste fort utilisé pour la préparation de liposomes MLV à l'échelle du laboratoire. Il comprend deux étapes :

1. Une solution organique de lipides est soumise à une évaporation sous vide (et/ou sous courant d'azote) afin que les phospholipides se déposent sous forme d'un mince film sur les parois d'un évaporateur rotatif (ex : Rotavapor™) ;
2. Ensuite, le film phospholipidique est hydraté à l'aide d'une solution aqueuse tamponnée dont la température est supérieure au Tc du mélange de lipides utilisés. L'hydratation est facilitée par une agitation intense (à la main ou à l'aide d'un vortex) et aboutit à la formation de liposomes MLV (*New, 1990*).

Les MLV obtenus par le procédé de Bangham se caractérisent comme suit :

1. Leur taille est très hétérogène, le diamètre moyen variant de 0,05  $\mu\text{m}$  à plusieurs  $\mu\text{m}$  (jusque 40  $\mu\text{m}$ ). Cette distribution de taille peut être rendue homogène par l'utilisation de différentes techniques telles que le traitement aux ultrasons, l'extrusion à travers des filtres de polycarbonate, l'homogénéisation à haute pression et la microfluidisation.
2. Le degré de lamellarité de ces MLV dépend essentiellement de 3 facteurs :
  - la composition lipidique initiale ;
  - la méthode d'hydratation des lipides ;
  - et le temps d'hydratation de ces lipides.

Mais, indépendamment de ces conditions opératoires, on peut estimer que les liposomes préparés par cette méthode se composent en moyenne de 10 lamelles, ou bicouches lipidiques (*Lichtenberg & Barenholz, 1988*).

3. Le volume aqueux encapsulé varie entre 0,5 et 4,1  $\mu\text{l}/\mu\text{mole}$  de phospholipides.
4. Le taux d'encapsulation reste relativement faible : 2 à 5 % (*Fattal et al., 1993*). Ce taux varie en fonction des conditions de préparation (conditions d'agitation, durée d'hydratation, etc.) et d'autres facteurs non spécifiques du procédé (nature et

concentration de la substance à encapsuler, nature et concentration en phospholipides, force ionique du milieu, présence de cholestérol et/ou de substances chargées).

En résumé, il s'agit d'un procédé simple et rapide destiné à la préparation de liposomes de taille hétérogène, multilamellaires et à faible taux d'encapsulation. Ce procédé peut s'effectuer à l'échelle du laboratoire, voire à l'échelle d'une fabrication pilote. Cependant, il est tout à fait inadapté à la production industrielle en raison des problèmes posés par les limitations de surface disponible pour effectuer la déposition d'une grande quantité de phospholipides sous forme d'un mince film lipidique uniforme (*Martin, 1990*).

Une solution à ce problème de surface réside dans l'utilisation de matériaux inertes, tels que le sorbitol, sur lesquels on effectue le séchage de lipides pour obtenir une poudre déshydratée appelée proliposome. L'addition d'eau permet alors une hydratation du film phospholipidique, tandis que le support pulvérulent se dissout rapidement. Cette technique permet la fabrication de liposomes MLV à une échelle industrielle (*Payne et al., 1986*).

Une autre solution est d'utiliser un séchage par nébulisation (atomisation). Cette méthode permet de produire de façon industrielle des liposomes MLV ayant les mêmes caractéristiques (taille moyenne, distribution des tailles, nombre de lamelles) que les liposomes obtenus par la méthode de Bangham (*Kikuchi et al., 1991*). Le produit desséché (poudre de phospholipides) obtenu par atomisation peut être conservé durant une longue période dans le réfrigérateur à 4°C. Pour obtenir des liposomes MLV, la poudre est hydratée par addition d'une solution tamponnée contenant éventuellement un principe actif hydrophile. La dispersion aqueuse obtenue est alors homogénéisée par agitation intense durant quelques minutes, à l'aide d'un mixeur.

La simplicité de cette méthode de préparation ne doit pas faire oublier les éléments suivants :

1. Les substances de charge utilisées, telles que mannitol, glucose, sucrose et dextran, doivent être exemptes de toxicité.
2. Les liposomes obtenus par ce procédé sont de tailles hétérogènes. Une homogénéisation par extrusion est obligatoire si on désire uniformiser leur taille.
3. La solubilisation des phospholipides nécessite un solvant organique tel que le chloroforme ou le dichlorométhane. Il faudra éliminer ces solvants organiques de la dispersion liposomale finale.

### 1.3.4.2 Liposomes SUV obtenus au moyen d'ultrasons

Le traitement aux ultrasons d'une dispersion de liposomes multilamellaires permet d'obtenir des liposomes unilamellaires dont le diamètre varie entre 20 et 50 nm. La taille des SUV obtenus dépend de la concentration en cholestérol et en phospholipides dans la dispersion liposomale de départ, de la durée d'exposition aux ultrasons et de l'appareillage utilisé : bain à ultrasons ou tête de sonication, aussi appelée sonde (Fig. 1.9).

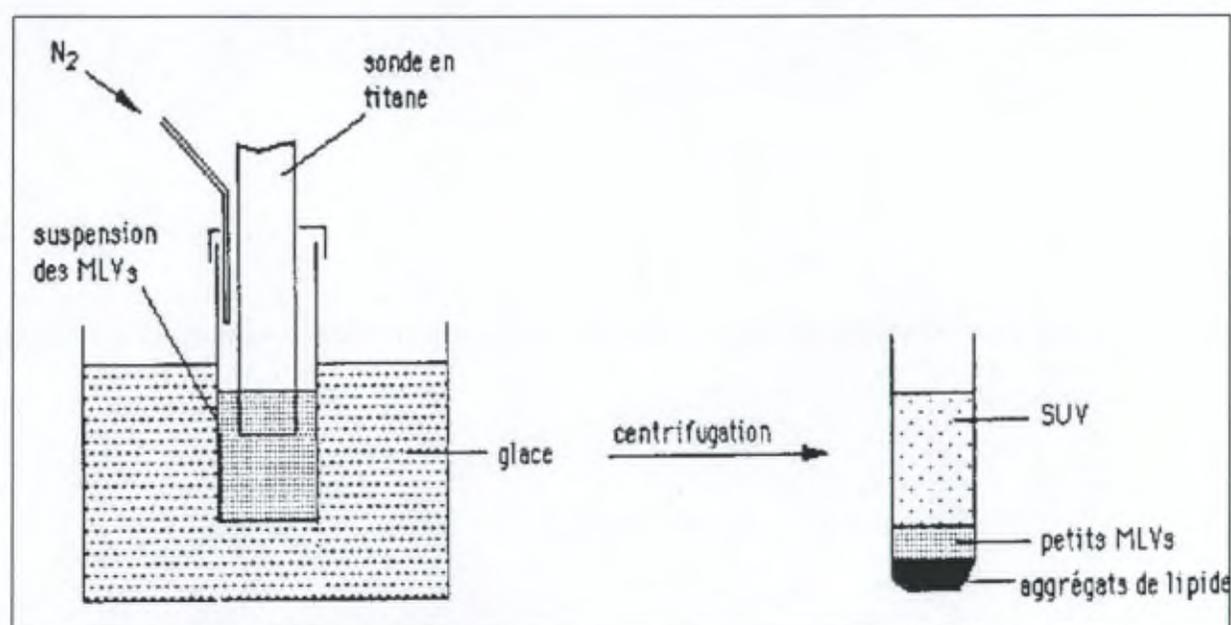


Fig. 1.9. Sonication des liposomes MLV en SUV (dessiné).

Les SUV obtenus par cette méthode ont un faible volume d'encapsulation (0,2 à 1,5  $\mu\text{l}/\mu\text{mole}$  de lipides) et un taux d'encapsulation très bas (0,1 à 1 %). De plus, les ultrasons peuvent provoquer une destruction de certains composés encapsulés et même une oxydation ou une hydrolyse des phospholipides (Fattal et al., 1993).

Le choix de l'appareil à ultrasons influence également les résultats. L'utilisation d'une sonde à ultrasons permet d'obtenir plus rapidement des liposomes SUV, mais elle peut exposer aux inconvénients suivants :

- oxydation des chaînes d'acides gras insaturés des phospholipides ;
- libération de particules métalliques (ex : titane) provenant de la sonde ;
- génération d'un aérosol pouvant être toxique pour le manipulateur ;
- production excessive de chaleur (pouvant altérer les phospholipides).

Ces inconvénients ne sont pas rencontrés lors de l'utilisation de bains à ultrasons, mais l'utilisation de ces derniers requiert plus de temps et s'avère moins reproductible, la taille des SUV obtenus variant d'une opération à l'autre.

Les bains et les sondes à ultrasons n'existent qu'à l'échelle du laboratoire. Ces deux instruments sont inadaptés à une production à grande échelle étant donné le problème de distribution d'énergie qu'on rencontrerait en travaillant avec de plus grands volumes. Le seul instrument à ultrasons pouvant être utilisé à l'échelle industrielle est l'appareil à sifflement de Pohlman (Tabibi, 1990). L'agressivité des ultrasons vis-à-vis des substances encapsulées et des phospholipides de la paroi liposomale constitue un inconvénient supplémentaire (Dousset & Douste-Blazy, 1985).

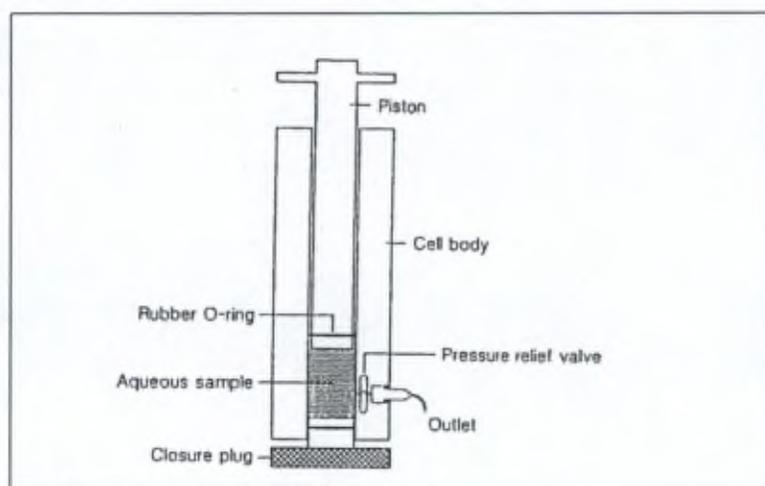
#### **1.3.4.3 Liposomes SUV obtenus par extrusion**

L'extrusion est une méthode rapide et pratique destinée à homogénéiser la taille des suspensions de MLV. Elle se pratique soit à la presse de French, soit sur des membranes de polycarbonate.

##### ***a) Extrusion à l'aide de la presse de French***

Une dispersion de liposomes MLV est introduite dans la cellule de French où un piston exerçant une pression qui peut atteindre 1400 bar, force les liposomes à traverser le petit orifice (diamètre <1 mm) situé à l'extrémité inférieure du réservoir cylindrique. L'action des forces de cisaillement provoque une fragmentation des liposomes qui se reforment spontanément en vésicules de plus petite taille (diamètre moyen ~40 nm) de type SUV (Martin, 1990). Avec cette technique, l'utilisation de concentrations élevées en

phospholipides permet d'atteindre des taux d'encapsulation relativement important : 5 à 25 %, contre 0,1 à 1 % pour les SUV obtenus par le traitement aux ultrasons (**Fig1.10**).



**Fig. 1.10.** Presse de French pour l'extrusion des liposomes (d'après *Purmann, 1993*).

La méthode à la presse de French est simple, parfaitement reproductible et surtout non destructive : l'extrusion de liposomes contenant des principes actifs fragiles tels qu'ADN ou ARN ne conduit pas à leur destruction. Cependant, l'utilisation du principe de la presse de French à l'échelle industrielle est difficilement concevable. Ceci est lié essentiellement à 3 facteurs :

1. Difficulté de remplissage de la cellule de French. Ce problème se pose surtout avec les dispersions liposomales trop visqueuses, avec une concentration élevée en phospholipides (>157 mg/ml) (*Purmann et al., 1993*).
2. Difficulté de contrôler la température dans la cellule. En effet, les fortes pressions exercées durant l'extrusion provoquent une importante hausse de température. Pour éviter une dégradation des phospholipides ou des principes actifs encapsulés, la cellule est

refroidie entre deux cycles d'extrusion (Martin, 1990). Le réchauffement local conduit aussi à une usure marquée des joints d'étanchéité ; il en résulte un risque de contamination de la dispersion liposomale par des particules de caoutchouc (Purmann et al., 1993).

3. Lenteur du procédé d'extrusion. Elle est liée au fait que l'on doit répéter 4 à 5 fois l'extrusion (Purmann et al., 1993).

#### ***b) Extrusion sur membranes de polycarbonate***

Ce procédé, utilisé pour la première fois par Olson et al. (1979), consiste à forcer des liposomes MLV à traverser des filtres de polycarbonate sous une certaine pression, afin d'obtenir une population homogène de liposomes dont la taille dépend du diamètre des pores (Hope et al., 1985). Cette technique s'apparente à l'épluchage d'un oignon, car lors de la traversée des pores, un certain nombre de lamelles se détachent des MLV sans qu'il n'y ait rupture de la structure vésiculaire. En pratique, il faut effectuer plusieurs extrusions à travers des filtres de même porosité pour obtenir des liposomes de taille identique. D'après plusieurs auteurs, après cinq passages de MLV à travers un filtre de 100 nm, on obtient des SUV. Le choix du diamètre des pores influence donc la taille finale des liposomes obtenus et par voie de conséquence, les caractéristiques finales de ces liposomes (Hope et al., 1985 & 1993 ; Mayer et al., 1986).

Hernandez et al. (1987) ont démontré que l'encapsulation augmente en fonction du diamètre des pores du filtre utilisé. En effet, l'extrusion à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 200 nm donne une population homogène de liposomes ayant une taille moyenne égale à 190 nm. Plus de 85 % de ces liposomes ont une taille variant de 170 à 210 nm. Parmi ceux-ci, on retrouve des LUV, des MLV bilamellaires et des MLV tri- ou multi-lamellaires. En comparaison à la population originale de MLV, l'extrusion permet de réduire à la fois la taille moyenne des vésicules et la polydispersité des tailles.

L'extrusion possède de nombreux avantages :

- C'est une technique rapide.
- Elle est applicable à des MLV de composition lipidique variée.
- Elle permet l'utilisation de concentrations élevées en phospholipides (400 mg/ml).

- Les filtres de polycarbonate, droits ou tortueux, ont l'avantage d'être fiables, inertes, durables (longue durée de vie avant colmatage) et faciles à disposer sur des supports.

Actuellement, l'extrusion sur filtre de polycarbonate peut s'effectuer de deux façons :

1. A l'aide d'une seringue manuelle, constituée d'un support de filtres de pores décroissants, au travers desquels une dispersion diluée de liposomes doit passer. Cette technique d'extrusion par filtration dans une seringue est surtout limitée par :
  - la contre-pression que peut tolérer la seringue et le support de filtre ;
  - la pression manuelle pouvant être appliquée par le manipulateur ;
  - la concentration phospholipidique qui ne peut dépasser 200 mg/ml ;
  - le diamètre qui ne peut être inférieur à 200 nm ;
  - le faible volume de la suspension liposomale pouvant être filtré.
2. A l'aide d'un « Extrudeur », ou support de filtre en acier inoxydable qui peut opérer à des pressions variant allant jusqu'à 400-450 bars. Cet appareil permet d'extruder en une étape des MLV à travers des filtres dont le diamètre des pores est très faible (30 à 50 nm). Les autres avantages des cellules de filtration de ce type sont :
  - le contrôle de la température ;
  - la capacité, en augmentant la pression, d'extruder des liposomes MLV composés de phospholipides ayant un  $T_c$  supérieur à la température ambiante ;
  - la facilité de stérilisation et dépyrogénéisation ;
  - l'utilisation dans un environnement stérile.

Par conséquent, ce procédé d'extrusion peut être facilement adapté à la fabrication de liposomes à l'échelle industrielle.

#### 1.3.4.4 *Liposomes obtenus par homogénéisation à haute pression*

Un homogénéiseur se compose principalement d'un système de valves entre lesquelles une dispersion est pompée sous haute pression, mais à faible vitesse, à l'aide d'une pompe à déplacement. L'augmentation de pression entre les valves induit une compression du ressort situé à l'arrière de la valve d'homogénéisation, qui s'écarte et permet au liquide de s'échapper à très grande vitesse. L'énergie accumulée par le liquide suite à la pression de départ est libérée de manière instantanée, provoquant des turbulences et des forces de cisaillement hydrauliques intenses (Tabibi, 1990 ; Rieger, 1986). Les homogénéiseurs étudiés pour la fabrication des liposomes utilisent des valves d'homogénéisation à bords tranchants (Bachmann et al., 1993).

A l'origine, les homogénéiseurs à haute pression étaient destinés à réduire la taille, l'hétérogénéité de taille, et la lamellarité de liposomes MLV fabriqués par la méthode de Bangham (hydratation d'un film lipidique). Dans ce cas, la qualité de l'homogénéisation des MLV dépend de 3 paramètres (Brandl et al., 1990 & 1993) :

- la composition initiale des MLV ;
- la pression d'homogénéisation (~700 bars) ;
- et le nombre de passages.

Cependant, il est aussi possible de fabriquer des liposomes SUV par homogénéisation à haute pression en une seule étape. Pour cela, on part d'un mélange de phospholipides secs auquel on a ajouté un solvant aqueux contenant éventuellement le principe actif hydrophile. Ensuite, on effectue l'homogénéisation de ce mélange par simple passage à travers un homogénéiseur à haute pression. Ceci permet d'obtenir des liposomes SUV, car, durant le processus d'homogénéisation, les particules solides (ou les cristaux) de lipides sont tout d'abord broyées, puis elles subissent une hydratation instantanée qui conduit à leur autoagrégation en liposomes SUV.

Cette méthode de fabrication de SUV en une seule étape offre de nombreux avantages :

- elle évite l'usage de solvants organiques et de tensioactifs ;
- le choix des lipides est très large et l'utilisation de concentrations élevées en phospholipides est possible ;
- elle permet d'obtenir une distribution homogène d'un mélange binaire de lipides sans dissolution préalable dans des solvants organiques ;
- les protéines et les peptides sont encapsulés sans perte significative de leur activité biologique ;
- à leur sortie de l'homogénéiseur, les liposomes peuvent être stérilisés par filtration à l'aide d'un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  ;
- les liposomes ainsi formés conservent leur stabilité physico-chimique durant plus de 5 mois (*Brandl et al., 1993*) ;
- et la méthode est facilement transposable à l'échelle industrielle.

Cependant, l'homogénéisation à haute pression présente quelques inconvénients :

- Une production de chaleur, qui est directement liée à la pression exercée (ex.: 2,6 Kelvin/100 bars lors de l'homogénéisation d'une dispersion de lipides à 20 % [m/m]). Par conséquent, il faut prévoir un système de refroidissement du produit après un cycle d'homogénéisation (*Brandl et al., 1993*).
- Une abrasion de certaines parties des valves d'homogénéisation. La formation de biseaux et d'excavations augmente le risque de contamination de la dispersion liposomale par des particules inertes (*Brandl et al., 1993*).

### 1.3.4.5 *Liposomes obtenus par microfluidisation*

La microfluidisation est une technique relativement récente, initialement utilisée pour l'homogénéisation d'émulsions. Par la suite, son utilisation s'est élargie à l'homogénéisation d'autres systèmes dispersés tels que les dispersions de liposomes MLV.

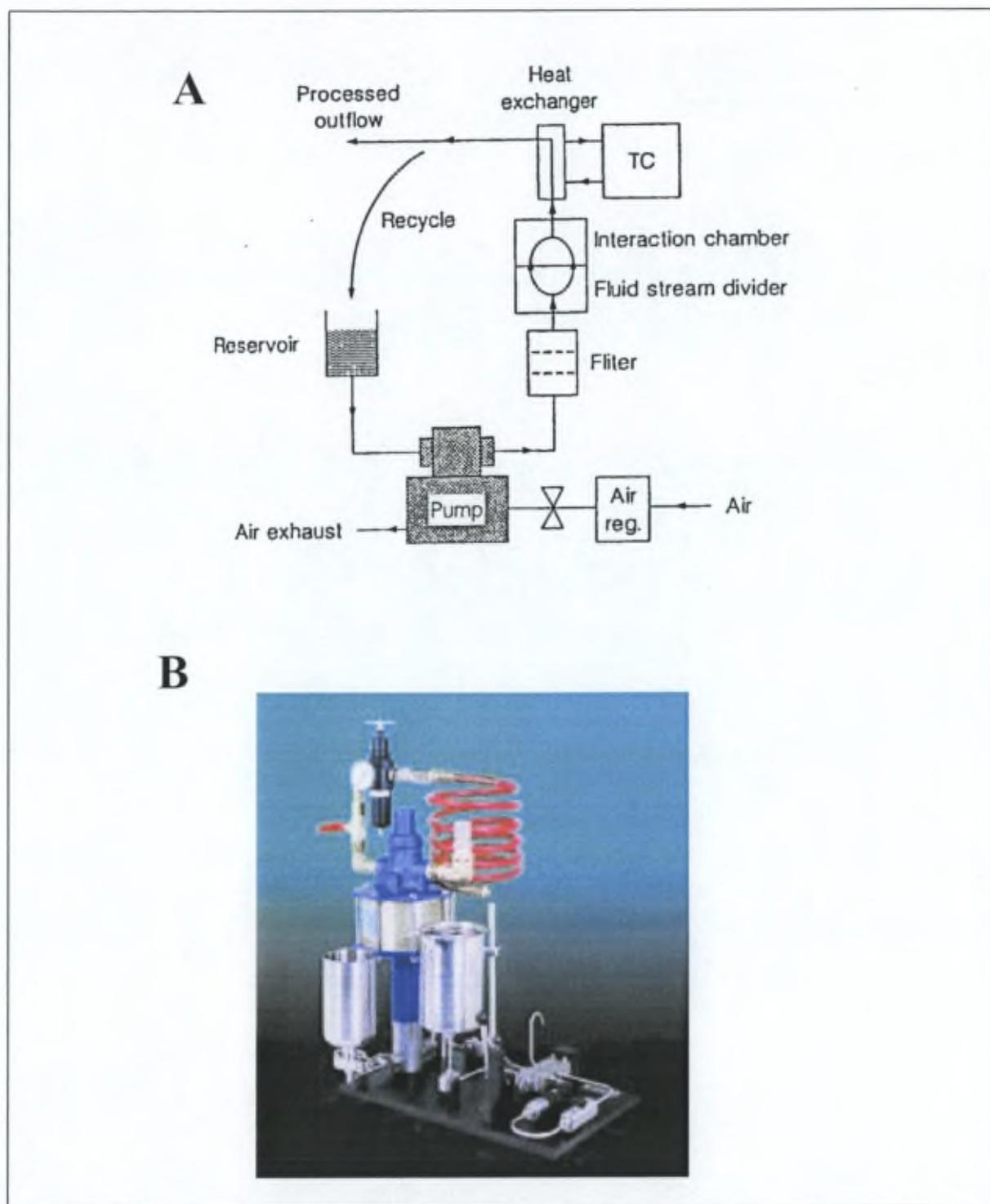
On procède comme suit. La dispersion liposomale de départ est conservée dans un réservoir. Par l'intermédiaire d'une pompe pneumatique, la suspension est amenée sous une forte pression (2100 bar) à travers un filtre de 9 mm de diamètre, puis dans la chambre d'interaction. A ce niveau, la dispersion est séparée en deux courants qui se rejoignent plus loin à très haute vitesse. Les collisions entre les liposomes aboutissent à la formation de vésicules de tailles plus petites et plus homogènes. La chaleur émise dans la chambre d'interaction peut être éliminée par un échangeur de chaleur à contre-courant, qui est lui même relié à un bain thermostatique. La suspension liposomale peut être réintroduite dans le réservoir initial afin de subir un nouveau cycle de microfluidisation. Par conséquent, après un certain nombre de passages dans la chambre d'interaction, la microfluidisation permet d'obtenir des liposomes ayant un diamètre assez faible, de l'ordre de 90 à 200 nm (*Mayhew et al., 1984 ; Vermuri et al., 1990 ; Talsma et al., 1989*). On retrouvera essentiellement des liposomes SUV et des liposomes MLV bilamellaires de petite taille.

En fait, plusieurs facteurs influencent la taille et l'uniformité de taille des liposomes obtenus par microfluidisation :

- la pression et la température de travail ;
- le nombre de passage à travers la chambre d'interaction ;
- la configuration et la taille de la chambre d'interaction.

La microfluidisation est une technique reproductible, pratique et facile, destinée à homogénéiser la taille de grandes quantités de liposomes. Elle est facilement applicable à grande échelle. Il existe plusieurs modèles de microfluidiseur. Citons le M-110, modèle de laboratoire, le M-210, modèle à l'échelle pilote, et le M-610, modèle à l'échelle industrielle, tous fabriqués par *Microfluidics* (**Fig. 1.11**).

Par conséquent, l'extrusion, l'homogénéisation classique et la microfluidisation sont trois techniques intéressantes, puisqu'elles permettent l'utilisation de concentrations élevées en phospholipides grâce auxquelles on peut obtenir des liposomes de petite taille dont le taux d'encapsulation est élevé.



**Fig. 1.11.** Microfluidisation. A) Principe (selon *Mayhew et al., 1984*).  
 B) Microfluidisateur M-110 (d'après Microfluidics :  
[\[http://www.micorfluidics.com\]](http://www.micorfluidics.com))

### **1.3.5 Fabrication de liposomes par dispersion d'une solution organique de phospholipides**

#### **1.3.5.1 Injection d'une solution éthanolique de phospholipides**

L'injection d'une solution éthanolique de phospholipides dans une solution aqueuse soumise à l'agitation et portée à une température supérieure au  $T_c$  du mélange de phospholipides conduit à la formation spontanée de liposomes de petite taille (30 à 120 nm) et unilamellaires (Batzri & Korn, 1973 ; Lichtenberg & Barenholz, 1988).

Quatre facteurs influencent particulièrement la taille des liposomes obtenus par ce procédé :

- la vitesse d'injection de la solution éthanolique ;
- la vitesse d'agitation de la solution aqueuse au cours de l'injection ;
- la concentration en phospholipides dans la solution éthanolique ;
- et la nature des phospholipides utilisés.

Par conséquent, à condition de maîtriser ces paramètres, on peut produire par cette méthode des liposomes SUV, LUV ou MLV caractérisés par une population homogène. Ces liposomes ont néanmoins une faible capacité d'encapsulation : de 0,4 à 1,5  $\mu\text{l}/\mu\text{mole}$  de lipides (Aarts *et al.*, 1977). Ce sont les substances solubles dans l'éthanol qui sont le mieux encapsulées, au contraire des substances dissoutes dans le tampon aqueux (Pons *et al.*, 1993). Cette méthode présente quelques inconvénients :

- la solubilité des phospholipides dans l'éthanol est limitée (par exemple, 40 mM pour la phosphatidylcholine de jaune d'œuf) ;
- le volume d'éthanol qui peut être ajouté au milieu est restreint : la teneur finale en éthanol dans la suspension liposomale ne peut dépasser 10 % (v/v) sous peine de ne pas former des SUV ;
- certaines macromolécules biologiquement actives sont inactivées par de faibles concentrations d'éthanol ;
- et le taux d'encapsulation est assez faible.

Néanmoins, ce procédé ne nécessite pas d'appareillage coûteux et il est facilement adaptable à une production industrielle. A ce propos, la compagnie CILAG a mis au point, en

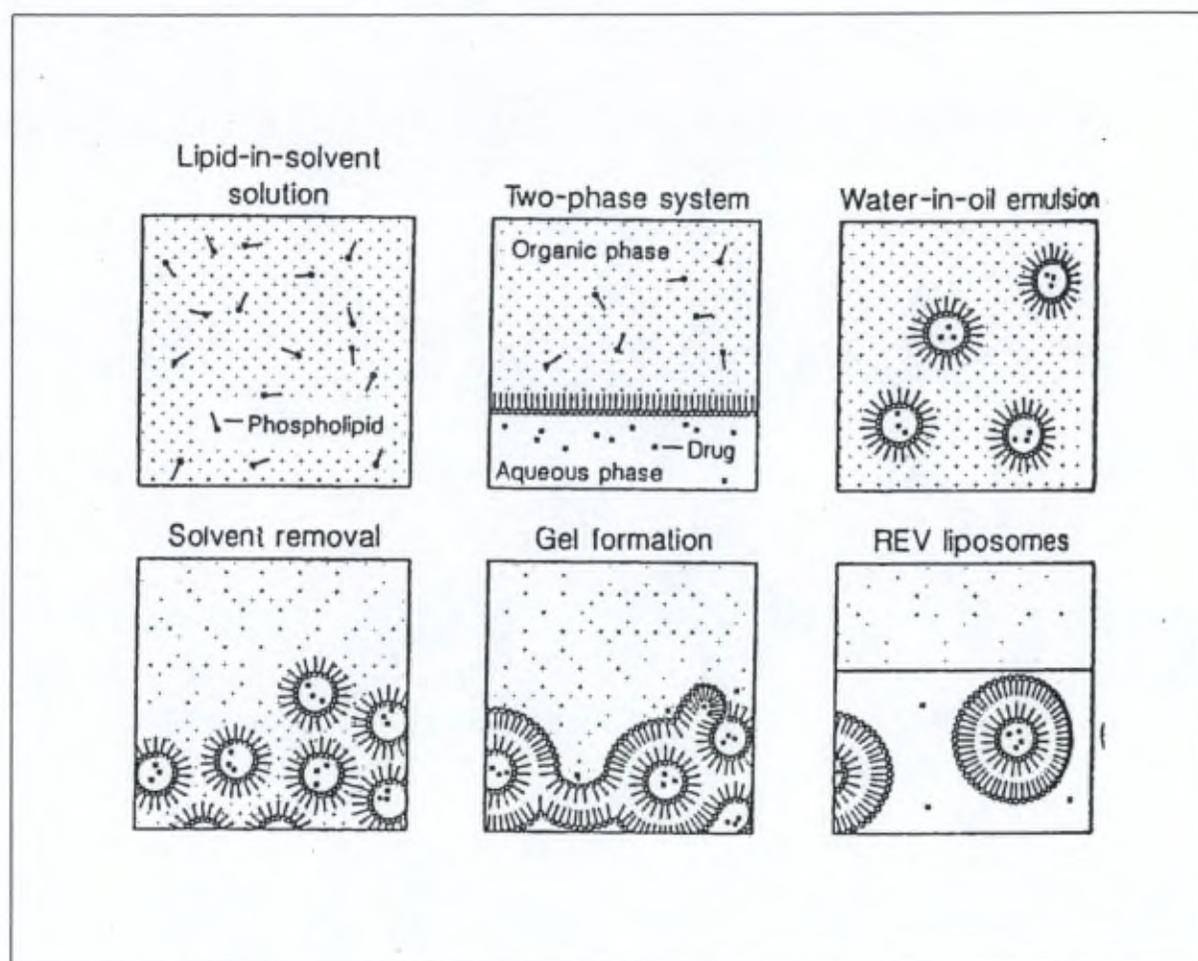
1984, un procédé de fabrication industrielle d'une dispersion liposomale contenant de l'éconazole, pour le traitement des mycoses cutanées, en se basant sur cette technique de préparation par injection d'éthanol (*Krifner, 1992*). Notons que le procédé par injection a également été étudié pour d'autres types de solvants miscibles à l'eau tels que le glycérol, le propylène glycol et les esters de glycérol.

### 1.3.5.2 *Evaporation en phase inversée (« REV-liposomes »)*

Afin d'augmenter l'efficacité d'encapsulation des liposomes, *Szoka et Papahadjopoulos (1978)* ont développé une méthode de préparation par évaporation en phase inversée, qu'on peut résumer comme suit.

Dans la première phase, les phospholipides sont dissous dans un solvant organique tels que l'éther éthylique ou l'éther propylique ou un mélange de solvants organiques comme l'éther propylique et le chloroforme (1:1). Dans une deuxième phase, on ajoute directement à la solution organique de phospholipides la phase aqueuse contenant éventuellement le principe actif hydrophile. A ce stade, les phospholipides se placent à l'interface des deux phases non miscibles. Dans la troisième étape, les deux phases sont émulsifiées par un traitement aux ultrasons sous une atmosphère d'azote à 0°C. On obtient une émulsion eau/huile dans laquelle les phospholipides s'organisent sous forme de micelles inverses. Dans la quatrième phase, le solvant organique est éliminé par évaporation sous pression réduite dans un évaporateur rotatif. Les micelles inverses se rapprochent et finissent par former un gel visqueux dans la cinquième phase.

L'évaporation des dernières traces de solvant organique est suivie, dans la sixième et dernière phase, de la formation spontanée d'une suspension de liposomes unilamellaires de grande taille (diamètre moyen ~500 nm) appelés REV-liposomes, abréviation de « reverse-phase evaporation vesicles » (*Pidgeon et al., 1987 ; Martin, 1990 ; Pidgeon, 1993*) (**Fig. 1.12**). Pour obtenir des liposomes unilamellaires de taille plus petite et plus homogène, il est nécessaire d'effectuer une homogénéisation par filtration sur membrane de polycarbonate de diamètre de pores décroissant.



**Fig. 1.12.** Evaporation en phase inversée « REV-Liposomes » (d'après *Martin, 1990*).

Le taux d'encapsulation des REV-liposomes non extrudés est très élevé : il varie de 20 à 90 % suivant la force ionique du tampon aqueux initial et de la composition phospholipidique de départ. En utilisant des phospholipides « fluides à température ordinaire » ( $T_c < \text{température locale}$ ), tels la phosphatidylcholine de jaune d'œuf, le taux d'encapsulation peut atteindre 90 %, alors qu'il sera de 30 à 60 % pour des phospholipides solides à température ordinaire tels la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC).

Le même procédé peut aussi servir à fabriquer des liposomes multilamellaires (REV-MLV), en utilisant une surface d'évaporation très élevée ou en augmentant la concentration en phospholipides dans la phase aqueuse.

Une modification de la méthode de Szoka et Papahadjopoulos a été apportée par Gruner *et al.* (1985). Durant l'émulsification par traitement aux ultrasons, on fait passer sur le mélange un courant d'azote qui évapore totalement le solvant organique. On obtient des MLV appelés « stable plurilamellar vesicles » (SPLV) car ils sont capables de maintenir leur taux d'encapsulation initial durant une période supérieure à 15 mois et, contrairement à ce que l'on observe avec les MLV classiques, la répartition du principe actif dans les liposomes SPLV est homogène. La taille des SPLV est comparable à celle des MLV obtenus par la méthode de Bangham.

En étudiant de manière plus approfondie la structure réelle des liposomes SPLV et MLV-REV, Talsma a émis l'hypothèse que ces liposomes seraient multivésiculaires plutôt que multilamellaires (Talsma *et al.*, 1987). Il s'agirait donc de grandes vésicules contenant des vésicules de plus petite taille. Ceci expliquerait pourquoi les liposomes SPLV et MLV-REV possèdent un pouvoir d'encapsulation beaucoup plus élevé que les liposomes MLV. Cependant, les résultats contradictoires obtenus avec différentes méthodes (RMN, diffraction aux rayons X) utilisées pour déterminer la structure réelle des liposomes SPLV et MLV-REV ne permettent pas de confirmer cette hypothèse.

Le procédé de fabrication de liposomes par évaporation en phase inversée, avec ou sans modification, possède un certain nombre de désavantages :

- il est limité par la solubilité des phospholipides dans la phase organique ;
- il expose les principes actifs à encapsuler aux ultrasons et aux solvants organiques, ce qui peut conduire à la dénaturation de certaines protéines ou à la rupture du matériel génétique (ADN et ARN) ;
- vu sa complexité, il est inadapté à la production industrielle.

### 1.3.5.3 Infusion d'éther

Il est possible de préparer facilement de grands liposomes unilamellaires (LUV) en dissolvant les phospholipides dans l'éther éthylique ou dans un mélange éther/méthanol, puis en injectant lentement cette solution, à l'aide d'une pompe à infusion, dans une solution aqueuse préalablement portée à une température de 30 à 65 °C (Fig. 1.13). Au contact de l'eau, l'éther s'évapore et il se forme des LUV dont la taille varie entre 150 et 250 nm. Cette taille reste toutefois fort hétérogène (Deamer & Bangham, 1976).

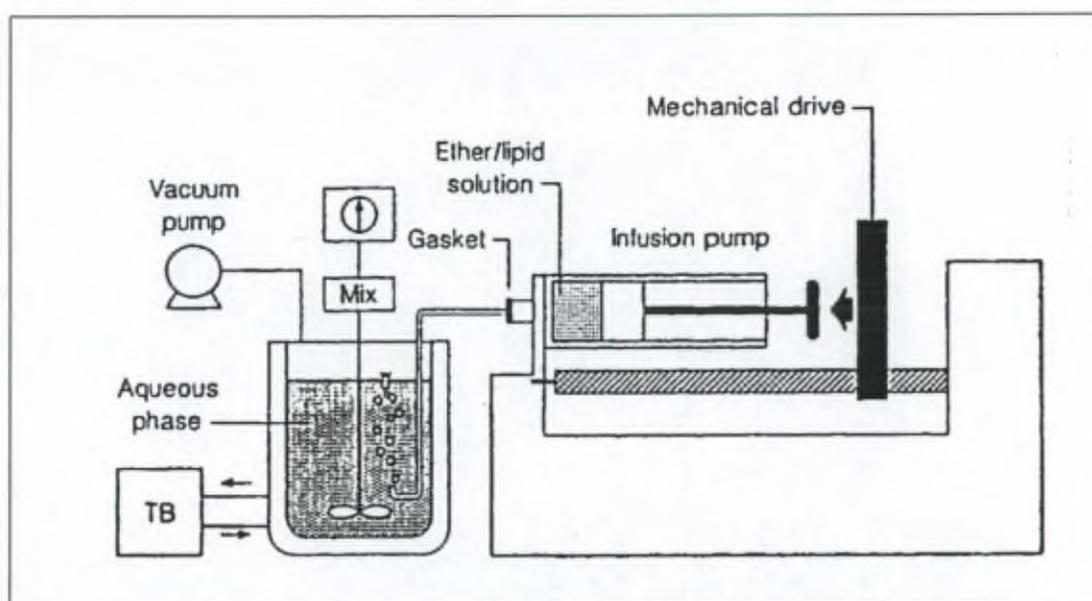


Fig. 1.13. Méthode par infusion d'éther (selon Deamer & Bangham, 1976).

De plus, cette technique par infusion d'éther présente deux inconvénients majeurs :

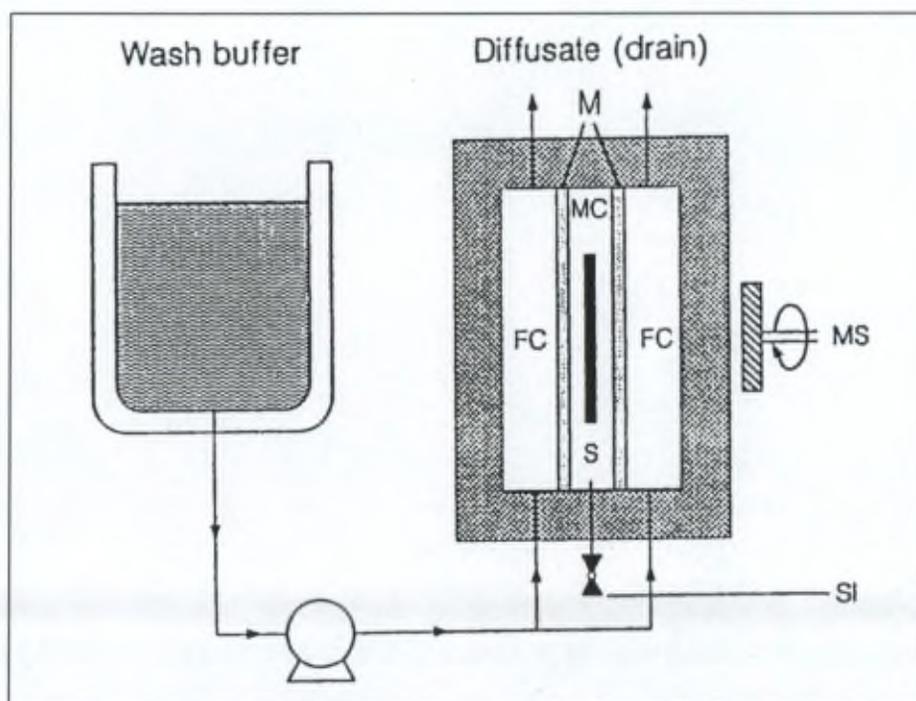
1. La présence possible de peroxydes dans l'éther éthylique peut provoquer ultérieurement la peroxydation des lipides liposomaux ;
2. Le faible taux d'encapsulation (1 à 2 %) des liposomes produits par cette méthode est lié à la faible solubilité des phospholipides dans l'éther éthylique.

Pour éviter le risque de peroxydation lipidique, on peut remplacer l'éther éthylique par l'éther de pétrole, ce qui ne résout pas le problème de la solubilité des phospholipides dans la phase organique. A cette fin, on a préconisé l'utilisation des solvants fluorocarbonés tels le Fréon 21. L'utilisation de ce solvant permet la formation de LUV à haut pouvoir d'encapsulation (~70 %), mais la directive européenne interdisant l'utilisation des solvants fluorocarbonés compromet l'utilisation industrielle de cette méthode.

Par conséquent, la technique par infusion d'éther a peu d'avenir.

### 1.3.6 Méthodes basées sur l'élimination d'un détergent

Dans ces méthodes, les phospholipides sont solubilisés à l'aide de détergents dans un milieu aqueux tamponné. Il se forme des micelles mixtes détergent/phospholipides. L'élimination du détergent se fait de manière telle que les micelles s'enrichissent en phospholipides et forment par coalescence des vésicules unilamellaires (*Brunner et al., 1976*). La taille de ces vésicules dépend de la nature du détergent et de sa vitesse d'élimination. S'il s'agit d'un détergent non ionique tel le Triton 100, on obtient des vésicules plus grandes qu'avec un détergent ionique tel le cholate de Na. De plus, la taille des liposomes décroît lorsque la vitesse d'élimination des détergents est augmentée, mais la méthode d'élimination classique du détergent par dialyse dure plusieurs heures. *Milsmann et al. (1978)* ont remédié à ce problème en mettant au point une cellule de dialyse qui fonctionne en continu et qui existe sur le marché sous les noms déposés de Lipoprep™ et Liposomat II™ (**Fig. 1.14**). Le détergent peut aussi être éliminé par chromatographie de filtration sur gel Sephadex, qui provoque l'adsorption du détergent sur des billes hydrophobes (Bio Beads™ ou Amberlite™).



**Fig. 1.14.** Cellules à dialyse continu du type Lipoprep™ (d'après *Milsmann et al., 1978*)

Ce procédé de préparation à base de détergent possède un certain nombre d'inconvénients :

- une perte de principe actif durant la formation des liposomes et, en général, un taux d'encapsulation relativement bas ;
- un coût élevé et une certaine lenteur ;
- une perte de phospholipides par internalisation dans le volume interne des billes ;
- une perte de liposomes par adsorption sur les billes.

### **1.3.7 Autres méthodes d'encapsulation en liposomes**

#### **1.3.7.1 Méthodes basées sur une augmentation de taille des liposomes**

##### **a) Déshydratation – réhydratation**

On ajoute à une dispersion de SUV ou de MLV une solution aqueuse d'un principe actif à encapsuler. Ensuite, on déshydrate le mélange, soit par lyophilisation (*Ohsawa et al., 1985*), soit par séchage à 37 °C sous un courant d'azote (*Shew & Deamer, 1985*), soit par séchage dans un évaporateur rotatif (*Gregoriadis et al., 1990*). Le produit desséché est réhydraté par addition d'un certain volume de tampon aqueux. Cette hydratation conduit à des liposomes MLV ayant une capacité d'encapsulation élevée (40 à 50 %). On les appelle DRV, abréviation de « dried-reconstituted vesicles ». L'intérêt majeur de cette technique de préparation réside dans le fait qu'on peut fabriquer des DRV avec un haut rapport de masse principe actif / phospholipides. Ceci réduit le coût de la formulation des phospholipides administrés par voie parentérale.

Néanmoins, les DRV préparés de cette façon sont de grande taille (diamètre ~1 µm) et de distribution particulière fort hétérogène. Par conséquent, il est impératif d'homogénéiser ces liposomes par extrusion, ce qui a pour inconvénient de faire chuter le taux d'encapsulation initial d'environ 10 %. Plus récemment, *Gregoriadis & Florence (1993)* ont décrit une méthode de microfluidisation qui permet de réduire la taille des DRV tout en conservant leur capacité d'encapsulation.

Le procédé de déshydratation/réhydratation est facilement applicable à la production industrielle car il peut s'effectuer dans un lyophilisateur. Les liposomes lyophilisés possèdent une grande stabilité et peuvent être conservés durant une longue période dans des conditions déterminées de température et d'humidité. En fait, le seul inconvénient de ce procédé réside dans la nécessité de devoir effectuer une homogénéisation des tailles, avec les risques inhérents de perte en principe actif.

### ***b) Congélation – décongélation***

*Kasahara & Hinckle (1977)* ont été les premiers à mettre au point une technique de congélation-décongélation afin de reconstituer une protéine membranaire. Par la suite, il s'est avéré que cette technique pouvait aussi être utilisée pour incorporer des substances actives dans des SUV, ou pour améliorer le taux d'encapsulation dans des MLV.

La préparation de liposomes SUV par congélation-décongélation s'effectue en 4 étapes :

1. dispersion des phospholipides dans le tampon aqueux par sonication prolongée (environ 20 min), conduisant à la formation de liposomes SUV ;
2. addition du principe actif à encapsuler ;
3. congélation rapide dans un bain de glace-éthanol, suivie d'une décongélation à la température ambiante durant 5 min ;
4. sonication brève (20 à 30 s) dans un bain à ultrasons.

Les liposomes obtenus par cette technique sont des SUV de taille variant entre 20 et 200 nm. Néanmoins, cette technique possède de nombreux inconvénients :

- il faut au préalable préparer des SUV (par exemple par sonication) ;
- la présence d'électrolytes diminue le pouvoir d'encapsulation des liposomes ;
- la présence de cryoprotecteurs inhibe le phénomène de fusion des SUV ;
- l'intensité du mélange après congélation influence le pouvoir d'encapsulation ;
- la présence de phospholipides chargés ou de composés anioniques est nécessaire pour la formation des liposomes.

La technique de congélation-décongélation peut aussi servir à l'incorporation de substances actives dans des MLV. En effet, les MLV préparés par hydratation d'un film lipidique ont généralement un taux d'encapsulation assez faible (5 à 10 %) à cause d'un déséquilibre de distribution des solutés à encapsuler entre l'extérieur et l'intérieur des membranes liposomales. En fait, la concentration en solutés dans le compartiment aqueux des MLV classiques est inférieure à la concentration dans le milieu extraliposomal. Ce déséquilibre osmotique provoque un stress permanent sur les bicouches lipidiques, responsable d'une déformation des MLV et d'une modification des interactions entre liposomes et cellules vivantes (Mayer *et al.*, 1985 ; Gruner *et al.*, 1985).

En revanche, la méthode de préparation par congélation-décongélation permet d'homogénéiser la concentration en solutés de part et d'autre de la membrane des MLV. Pour cela, une dispersion de MLV obtenus par la méthode de Bangham est congelée dans de l'azote liquide et décongelée dans un bain d'eau à 40 °C. Cette opération est répétée un certain nombre de fois (5 cycles semblent suffisants). Les liposomes obtenus sont toujours des MLV, que l'on nomme FAT-MLV (abréviation de « frozen and thawed » MLV). Néanmoins, ces FAT-MLV ont une taille élevée et sont hétérogènes. C'est pourquoi il est nécessaire de les extruder par filtration sur membranes de polycarbonate.

### **1.3.7.2 Méthode basée sur une microencapsulation**

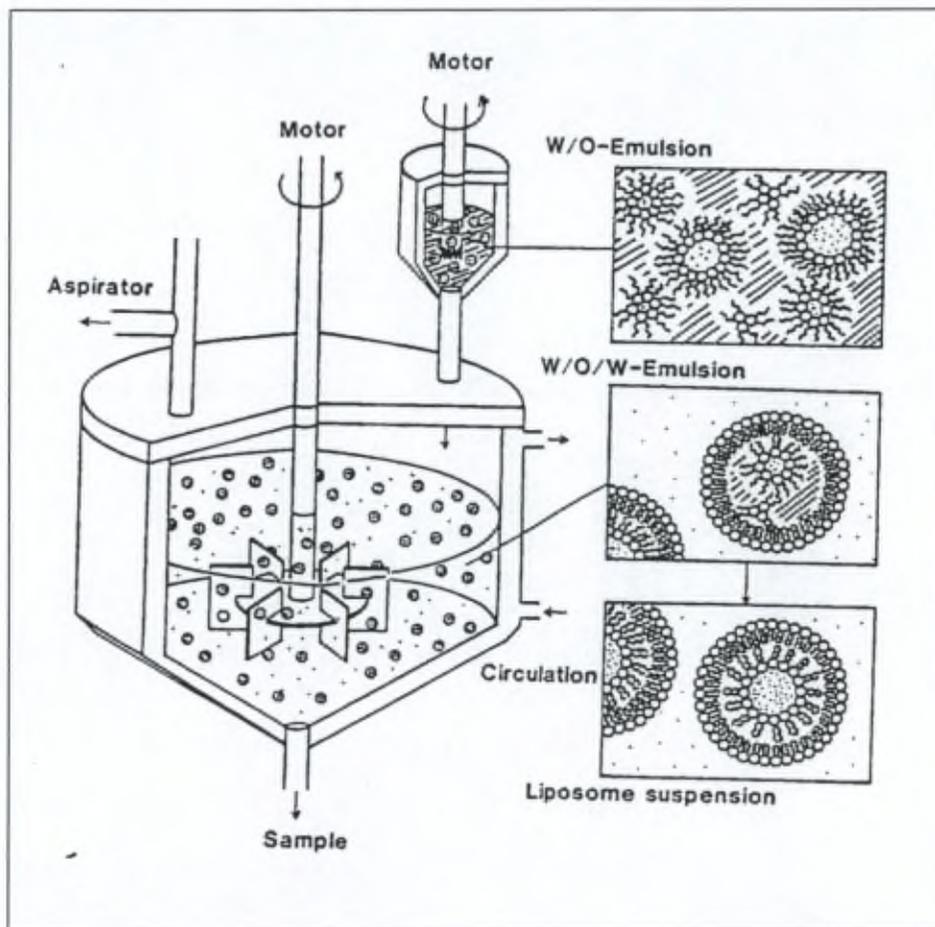
Cette méthode permet de préparer des liposomes du type LUV ayant une efficacité d'encapsulation > 60 %. La préparation de tels liposomes peut être subdivisée en 4 étapes :

1. dissolution des PL dans le solvant organique ;
2. ajout de la phase aqueuse à la solution organique de PL, puis émulsification eau/huile (E/H) de ces deux phases à l'aide d'un agitateur classique (10 min, 7.000 tpm) ;
3. mélange par un agitateur à palettes, menant à la formation d'une émulsion E/H/E complexe ;
4. évaporation du solvant organique par agitation durant 1 h sous courant d'azote.

L'évaporation totale du solvant organique forme des liposomes unilamellaires de grande taille appelés MCV pour « microencapsulation vesicles ». La taille des MCV dépend essentiellement de la nature du solvant organique (plus son point d'ébullition est élevé, plus

petite sera la taille des liposomes) et de la viscosité de l'émulsion E/H : la taille des MCV augmente linéairement avec l'augmentation de la viscosité de l'émulsion.

La méthode par microencapsulation est très reproductible. Elle est également adaptable à l'échelle industrielle, car elle utilise des agitateurs classiques utilisés pour le traitement des émulsions fluides (**Fig. 1.15**).



**Fig. 1.15.** Préparation des liposomes par microencapsulation (selon *Martin, 1990*).

### 1.3.8 Résumé des procédés de préparation des liposomes

#### 1.3.8.1 Caractéristiques

Elles sont résumées dans le **Tableau 1.6**.

**Tableau 1.6.** Caractéristiques des procédés de préparation de liposomes. Tableau repris de *Fattal et al., 1993*.

<i>Procédés de préparation</i>	<i>Type</i>	<i>Diamètre (µm)</i>	<i>Volume encapsulé (µl/µmole de lipides)</i>	<i>% d'encapsul.</i>	<i>Référence</i>
Film d'hydratation	MLV	0,05 - 30 0,4 - 5 1	0,5 3 4,1 1,4 - 1,8	1,8 - 8,5 6 5 - 15 9 - 27	Kirby & Gregoriadis, 1984 Cullis et al., 1987 Lichtenberg & Barenholz, 1988 Olson et al., 1979 Mayhew et al., 1984
Ultrasonication de MLV	SUV	0,02 - 0,05	0,2 - 1,5	0,1 - 1,0	Szoka & Papahadjopoulos, 1980
Extrusion de MLV par presse de French	SUV	0,02 - 0,08	0,2 - 1,5	5 - 25	Lelkes, 1984
Membr. de polycarbonate Extrusion de MLV					
0,1 µm	SUV	0,06 - 1	1 - 3	5 - 30	Hope et al., 1985
1 - 0,2 µm	MLV	0,05 - 2	1,8 - 3,7	15 - 60	Olson et al., 1979
Microfluidisation	SUV	< 0,1	0,7 - 1,8	5 - 78	Mayhew et al., 1984
Injection d'éthanol	SUV	0,03 0,12	0,4 - 1,5	0,5	Batzri & Korn, 1973 Kremer et al., 1977
Evaporation en phase inverse	LUV	0,1 - 1,0	7 - 11	30 - 68	Szoka & Papahadjopoulos, 1978
Perfusion d'éther	LUV	0,05 - 0,25	13 - 25	2	Deamer & Bangham, 1976
Lyophilisation/hydratation	MLV	0,02 - 0,2		26 - 72	Kirby & Gregoriadis, 1984
Congélation/décongélation (SUV)	LUV	0,09		25 - 30	Pick, 1981
Congélation/décongélation (MLV)	MLV		2 - 5	31 - 89	Mayer et al., 1985
Elimination de détergent	LUV	0,6 0,1 0,04 - 0,18 0,2 - 0,3	2,4 1,75 - 2,4 6 - 7,4	12 12	Kagawa & Racker, 1971 Enoch & Strittmatter, 1979 Zumbühl & Weder, 1981 Mimms et al., 1981
	SUV	0,037	0,47	22	Brunner et al., 1976

### 1.3.8.2 Avantages et inconvénients

Ils sont énumérés dans le **Tableau 1.7**.

**Tableau 1.7.** Avantages et inconvénients des procédés de préparation de liposomes.  
Tableau repris de *Fattal et al.*, 1993.

<i>Procédés de préparation</i>	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
Hydratation par film lipidique mince par agitation mécanique (MLV)	Simple, rapide	Mauvaise efficacité de l'encapsulation Dispersion hétérogène de MLV Aucune possibilité d'augmenter à l'échelle
Irradiation ultrasonique (SUV)	Petits liposomes (20 nm de diamètre) Homogénéité	Mauvaise efficacité d'encapsulation Contamination par des particules de titane Production d'aérosols Possibilité de réchauffement et de dégradation de lipides Aucune possibilité d'augmenter à l'échelle
Extrusion par French Press	Simple, reproductible, non agressif Forte concentration de lipides possible Forte efficacité d'encapsulation Augmentation à l'échelle	Non économique Nécessite la préparation de MLV Mauvaise efficacité d'encapsulation
Extrusion sur des membranes de polycarbonate	Rapide et reproductible Homogénéité Forte concentration de lipides possible Forte efficacité d'encapsulation	Nécessite la préparation de MLV On ne peut utiliser que de faibles volumes
Microfluidisation	Forte efficacité d'encapsulation Augmentation à l'échelle	Nécessite la préparation de MLV Non économique
Remplacement de solvants organiques Injection d'éthanol	Homogénéité, simplicité, rapidité Augmentation à l'échelle	Mauvaise efficacité d'encapsulation
Evaporation en phase inverse	Forte efficacité d'encapsulation	Lipides exposés aux ultrasons et aux solvants Technique compliquée Faible solubilité dans les solvants organiques Aucune possibilité d'augmenter à l'échelle
Perfusion par l'éther	Forte efficacité d'encapsulation Augmentation à l'échelle	Mauvaise efficacité d'encapsulation Lipides exposés à une forte température et aux solvants Hétérogénéité
Lyophilisation/réhydratation	Forte efficacité d'encapsulation Augmentation à l'échelle Stabilité de la préparation	Hétérogénéité Nécessité de préparation de SUV
Congélation/décongélation (MLV)	Forte efficacité d'encapsulation Rapidité	Nécessité de préparation de SUV
Congélation/décongélation (SUV)	Procédé simple et rapide	Nécessité de préparation de SUV Difficile à préparer en présence de phospholipides neutres, de sucre et de forte concentration d'ions divalents
Élimination de détergents	Homogénéité Condition douce	Faible efficacité d'encapsulation Procédé long Difficulté d'éliminer le détergeant

## **1.4 Stabilité et conservation des liposomes**

La stabilité physico-chimique des liposomes constitue un objectif majeur à partir du moment où ceux-ci sont destinés à un usage thérapeutique : les liposomes chargés en principes actifs doivent pouvoir être conservés intacts durant un an au moins dans des conditions bien définies (Mayer *et al.*, 1986). Cette exigence n'est pas facile à remplir, étant donné la relative instabilité des structures liposomales. Cette instabilité peut être de nature chimique ou physique.

### **1.4.1 Stabilité chimique des liposomes**

Elle est compromise par les phénomènes de peroxydation et d'hydrolyse des phospholipides.

#### **1.4.1.1 Peroxydation lipidique**

Le phénomène de peroxydation concerne les liposomes composés de phospholipides à acide gras insaturés, qu'ils soient d'origine naturelle (ex.: phosphatidylcholine) ou synthétiques (ex.: dioléoylphosphatidylcholine). La peroxydation lipidique peut être induite par une autooxydation ou une photooxydation des acides gras insaturés. Elle aboutit à la formation de substances chimiques de natures très diverses telles que les hydroperoxydes et des dérivés aldéhydiques comme la malonaldéhyde.

Sachant que la peroxydation lipidique est accélérée par les métaux (Cu, Fe), la lumière, l'oxygène de l'air, la chaleur et les irradiations, on peut en diminuer le risque par des mesures préventives et/ou protectrices. Les mesures protectrices comprennent l'utilisation d'agents complexants (ex.: EDTA) ainsi que la conservation à l'abri de la lumière, dans des tubes scellés sous courant d'azote, au froid à 8 °C (ou mieux encore à 4 °C), et à l'abri de toute irradiation  $\gamma$  ou U.V. Les mesures préventives consistent à ajouter des antioxydants lipophiles. Les plus utilisés sont : l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), le galate de propyle ou d'octyle, et les dérivés lipophiles de l'acide ascorbique (palmitate ou stéarate d'ascorbyle).

Ajoutons que la présence de cholestérol dans la paroi liposomale augmente l'activité antioxydante de l' $\alpha$ -tocophérol. Ceci est lié au fait que le cholestérol augmente la rigidité de

la paroi de sorte que la propagation des radicaux libres issus de la peroxydation lipidique est fortement diminuée (*Pajean & Herbage, 1993*).

#### **1.4.1.2 Hydrolyse des phospholipides**

L'hydrolyse des glycérophospholipides conduit à la formation de lysophospholipides et d'acides gras libres. Dans le cas de la phosphatidylcholine, on obtient de la lysophosphatidylcholine et de l'acide phosphatidique. La structure des bicouches lipidiques en est affectée ; la perméabilité de la paroi liposomale est altérée, ce qui induit une perte de composé encapsulé (*Grift et al., 1993*). Les paramètres qui influencent l'hydrolyse des phospholipides sont le traitement aux ultrasons, la nature et la concentration du tampon de dispersion aqueuse et le degré de saturation des acides gras. Il faut recourir à des mesures préventives et protectrices. Les premières sont basées sur une adaptation du pH et de la température, car :

- L'hydrolyse des glycérophospholipides est catalysée en milieu basique et/ou acide. Dans le cas de la phosphatidylcholine naturelle, la cinétique d'hydrolyse est minimale pour un pH de 6,5.
- La cinétique d'hydrolyse peut être décrite par l'équation d'Arrhénius. L'hydrolyse est négligeable à faibles températures (*Grift et al., 1993*).

#### **1.4.2 Stabilité physique des liposomes**

La stabilité physique des liposomes peut être étudiée sous différents aspects :

1. le maintien des dimensions des vésicules avec examen de l'agrégation ou de la fusion ;
2. la perte de composants de la bicouche suite à une désorption ;
3. la perte de composés encapsulés.

### **1.4.2.1 Agrégation et fusion**

L'agrégation des liposomes survient essentiellement lorsque ceux-ci sont composés de phospholipides neutres. L'inclusion dans les liposomes de phospholipides chargés ou d'autres composants chargés permet de ralentir, voire même d'éviter, ces phénomènes d'agrégation.

La fusion survient toujours après l'agrégation des liposomes. Elle concerne essentiellement les SUV, dont le stress membranaire est élevé en raison de la courbure de leur bicouche (*Fattal et al., 1993*).

### **1.4.2.2 Perte en principe actif encapsulé**

Il s'agit d'une diffusion passive du composé encapsulé à travers la membrane liposomale. Cette diffusion est fonction de plusieurs paramètres :

- La nature du principe actif : les composés lipophiles et amphiphiles sont enchâssés dans la bicouche lipidique et ils sont moins susceptibles d'être libérés par les liposomes que les composés hydrophiles.
- La composition et le  $T_c$  des phospholipides : les membranes liposomales à l'état fluide (cristal liquide) sont plus perméables aux composés encapsulés que lorsqu'elles sont à l'état semi-solide (gel).
- Le type de liposomes : la rétention est maximale avec les MLV et minimale avec les SUV.
- La présence de cholestérol : son addition à raison de 25 à 50 moles % dans la composition des liposomes permet de réduire de manière significative la perte des composés encapsulés.
- La présence d' $\alpha$ -tocophérol : par son effet stabilisant, cet antioxydant réduit aussi la perte des composés encapsulés.

### **1.4.3 Conservation des liposomes à l'état congelé ou desséché**

Les liposomes présentés sous forme de dispersion aqueuse posent énormément de problèmes de conservation et leur instabilité physique et chimique limite considérablement leur intérêt thérapeutique. Dès lors, il est important de s'intéresser aux méthodes de conservation des liposomes sous forme non aqueuse, soit à l'état congelé, soit à l'état sec après lyophilisation ou après séchage dans un atomiseur.

#### **1.4.3.1 Congélation**

La congélation des liposomes peut s'effectuer dans de l'azote liquide, un bain de glace-éthanol, un surgélateur (-20 à -50 °C) ou un congélateur (-10 à -20 °C) (*Fransen et al., 1986 ; McDonald & McDonald, 1993 ; Talsma et al., 1991*). En fait, la température de congélation ne modifie pas de façon majeure la stabilité physique des liposomes traités pour autant que leur congélation soit totale (*Higgins et al., 1986*).

La congélation des liposomes assure une conservation de longue durée, mais toute rupture dans la chaîne du froid condamne irrémédiablement le produit. De plus, les phases de congélation-décongélation peuvent endommager la paroi liposomale et entraîner une instabilité physique qui se traduit par des phénomènes d'agrégation et/ou de fusion et par la perte de composés encapsulés. Ces dommages membranaires résultent essentiellement de la formation intra- ou extra-liposomale de cristaux de glace durant la congélation et d'effets osmotiques intenses au niveau de la membrane. Pour minimiser ces dommages, on utilise des cryoprotecteurs tels que des saccharides (saccharose 10-15%, tréhalose 5%), de la bétaine et de l'alanine 3%, diméthylsulfoxyde 3%, glycérol 5-10%, ou mannitol 10% (*Harrigan et al., 1990*). Parmi les saccharides, le tréhalose est considéré comme le meilleur cryoprotecteur. Il agit à une faible concentration. Toutefois, pour une protection maximale, *Ozer et al. (1988)* ont démontré que le cryoprotecteur doit être présent à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes.

D'autres facteurs influencent la stabilité des liposomes traités :

- la vitesse de congélation, qui ne peut être ni trop rapide (>20°C/min) ni trop lente (<2°C/min) ;

- le fait que la température de congélation dépasse le point eutectique du mélange afin d'éviter des dommages excessifs ;
- le temps de congélation, l'osmolarité du milieu, etc.

On peut en conclure que la congélation des liposomes doit s'effectuer en présence de cryoprotecteurs et dans des conditions bien précises qui minimisent les risques d'instabilité physique des liposomes.

#### 1.4.3.2 **Lyophilisation et atomisation**

Si la conservation des liposomes à l'état congelé est inappropriée dans de nombreuses situations, à l'inverse, leur conservation à l'état desséché permet une manipulation plus aisée en vue d'un usage thérapeutique. De plus, l'addition de la phase aqueuse permet de reconstituer facilement la dispersion liposomale initiale. Il existe deux techniques de dessiccation : la lyophilisation et le séchage par atomisation. Examinons d'abord la première.

Les travaux portant sur la **lyophilisation** des liposomes, bien qu'ils aient débuté dans les années 1980, restent limités. Certains ont été effectués par des biologistes ou des biochimistes (*Crowe et al., 1985 & 1986 ; Crowe & Crowe, 1988 ; Harrigan et al., 1990*) ; d'autres ont exploré l'aspect galénique et pharmaceutique (*Talsma et al., 1991a, 1991b & 1992*). La lyophilisation est une technique de dessiccation par sublimation qui se divise en trois étapes :

1. Congélation rapide du produit à dessécher : la température de congélation doit être inférieure au point eutectique du mélange.
2. Sublimation de la glace formée en vapeur d'eau, qui est éliminée au fur et à mesure de sa production grâce à l'existence d'un gradient de tension de vapeur entre la chambre et le condenseur du lyophilisateur. La grande majorité de l'eau (eau libre) est ainsi extirpée.
3. Dessiccation secondaire, destinée à éliminer les dernières traces d'eau de surface restée accrochée au produit (eau liée).

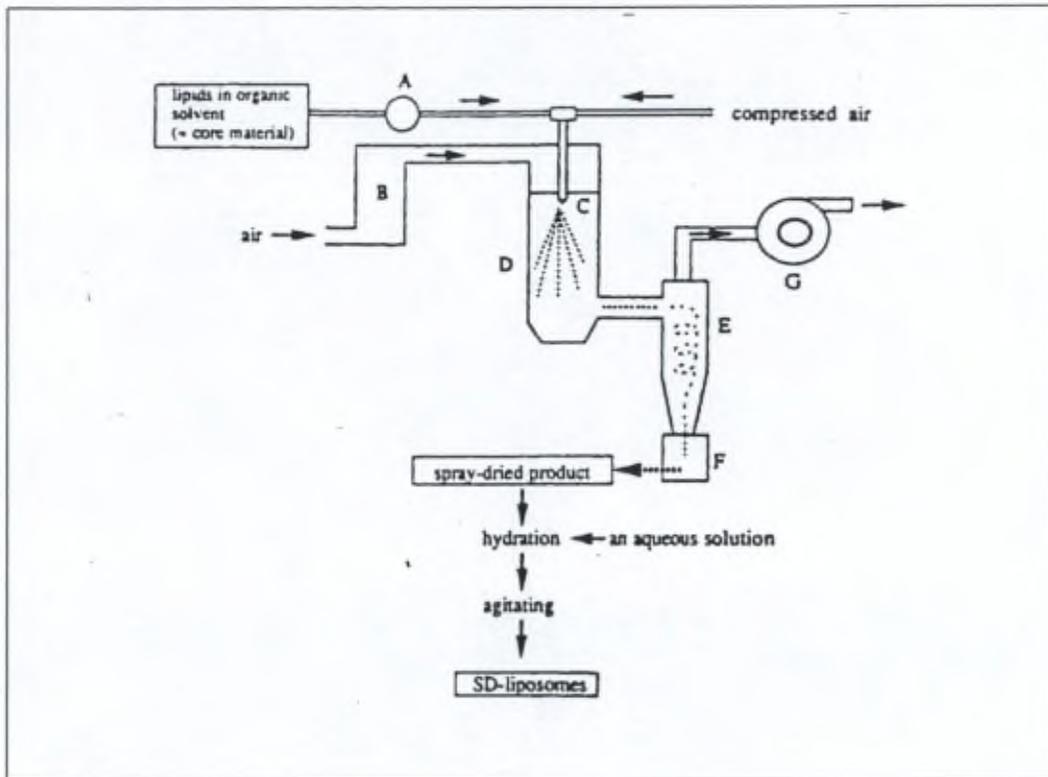
Comme pour la congélation, la lyophilisation des liposomes doit se faire en présence de cryoprotecteurs (*Crowe et al., 1985 ; Sun et al., 1996*). En l'absence de ces agents, les

liposomes lyophilisés présentent une instabilité physique au moment de leur reconstitution. Seuls les dissaccharides possèdent un effet cryoprotecteur suffisant vis-à-vis de liposomes lyophilisés : le tréhalose, le maltose et le saccharose sont les plus efficaces. Cet effet protecteur des sucres lors de la dessiccation des liposomes serait lié au fait qu'ils remplacent l'eau d'hydratation et forment des liens hydrogènes avec les groupements phosphates des phospholipides (*Ozaki & Hayashi, 1997*). Ces liens stabiliseraient la structure des liposomes à l'état desséché. Lors de la réhydratation, les molécules d'eau remplaceraient à leur tour les sucres et la dispersion liposomale initiale serait restituée sans perte de composés encapsulés. L'effet cryoprotecteur des dissaccharides est maximal pour des liposomes de taille comprise entre 50 et 200 nm (*Crowe & Crowe, 1988*). Le groupe de Crowe a récemment proposé l'utilisation d'autres polysaccharides comme l'inuline (*Hincha et al., 2000*).

Néanmoins, la quantité optimale de cryoprotecteurs à ajouter à la dispersion liposomale n'est pas connue avec certitude. Les biologistes (*Crowe et al., 1986*) préconisent un rapport de masse 3/1 entre le tréhalose et les lipides, tandis que pour les pharmaciens galénistes (*Talsma et al., 1991a*), une concentration de 5 % (m/m) serait suffisante. De plus, la composition en phospholipides des liposomes ne manque pas d'influencer la rétention des principes actifs lors de la lyophilisation (*Komatsu et al., 2001*).

Par conséquent, avant de définir les concentrations idéales en cryoprotecteurs, il faudrait étudier plus en détails les paramètres physico-chimiques de la lyophilisation, étape par étape, afin de déterminer d'abord les conditions optimales de la lyophilisation des liposomes, comme l'équipe de Crommelin le soutient depuis plusieurs années (*Talsma et al., 1991a, 1991b & 1992 ; van Winden et al., 1998*). La vitesse de lyophilisation semble notamment être un paramètre crucial (*van Winden et al., 1997*).

La technique de séchage par nébulisation (**atomisation** – **Fig. 1.16**) est une alternative au problème de surface. Cette méthode permet d'effectuer une production industrielle de liposomes MLV ayant les mêmes caractéristiques (tailles, distribution de la taille, nombres de lamelles) que les liposomes obtenus par le procédé de Bangham (*Kikuchi et al., 1991b*).



**Fig. 1.16.** Diagramme schématique de la méthode de préparation des liposomes par atomisation (« SD », pour *spray-drying*), selon Kikuchi *et al.*, 1991.

A : pompe à membrane ; B : chambre de chauffage ; C : gicleur ; D : chambre de séchage ; E : cyclone ; F : réservoir ; G : aspirateur.

Comme le montre la **Fig. 1.16**, lors de l'atomisation, la solution organique (chloroformique) de lipides est vaporisée dans la chambre de séchage à l'aide d'une pompe à membranes et d'un gicleur. Cette dispersion aboutit à la formation de fines gouttelettes de solution organique qui entrent en contact, dans la chambre de séchage, avec un courant d'air chaud (par ex : débit = 9 ml/min ; température =  $55 \pm 15$  °C). Celui-ci transforme instantanément les gouttelettes en poudre, qui sont recueillies par un séparateur, dans ce cas un cyclone. Grâce à ce système, on peut recueillir la poudre dans un réservoir situé en dessous du cyclone (séparateur). Le produit desséché peut être conservé durant une longue période à 4°C.

La méthode par atomisation possède les avantages suivants :

1. Elle est plus opérationnelle.
2. Elle donne, de façon reproductible, des liposomes plus uniformes du point de vue qualité.

3. Elle est constituée d'une bien plus grande surface « pratique » pour la déposition du film lipidique. Cette surface peut encore augmenter par l'ajout d'une substance de charge (mannitol) dans la solution organique de lipides. Ainsi, lors du séchage, le film lipidique se déposera autour des particules de mannitol. A ce moment, la surface disponible pour le film phospholipidique est pratiquement égale à la surface totale des particules de mannitol.
4. Elle augmente la vitesse d'hydratation des lipides, à condition d'utiliser des substances de charges.
5. Elle augmente la stabilité, car le produit est sous forme de poudre desséchée de préférence à l'état amorphe.
6. Elle augmente l'efficacité d'encapsulation. Celle-ci peut dépasser 50 % .
7. Elle produit en grande quantité des liposomes multilamellaires qui s'apparentent aux MLV de Bangham.

## **1.5 Préparation industrielle de liposomes**

### **1.5.1 Introduction**

Il existe encore peu de publications scientifiques en rapport avec la production industrielle de liposomes. Bien qu'un certain nombre de brevets aient été déposés en rapport avec leur production à grande échelle, les informations sur les protocoles détaillés de fabrication sont rares, étant donné le secret imposé par les sociétés pharmaceutiques. En effet, la plupart des formulations liposomales sont en cours d'essais cliniques.

Néanmoins, un certain nombre d'exigences doivent être remplies lorsqu'on désire passer à la production industrielle de liposomes (= « scaling-up »), notamment la qualité des matières premières et l'apyrogénicité et la stérilité des liposomes destinés à l'usage parentéral.

### **1.5.2 Qualité des matières premières**

La plupart des matières premières utilisées dans la production de liposomes sont de nature lipidique, qu'il s'agisse des phospholipides (naturels ou synthétiques), du cholestérol, des antioxydants lipophiles (ex.:  $\alpha$ -tocophérol, BHT, BHA), ou des composés lipophiles

chargés (ex.: stéarylamine). Contrairement au passé, les matières premières lipidiques disponibles actuellement sur le marché sont d'une grande pureté (supérieure à 99 % dans les cas de phospholipides) et très bien caractérisées (*Storm & Crommelin, 1998*). Les méthodes de purification et de caractérisation se sont améliorées et des techniques analytiques validées sont apparues (*Zuidam et al., 1996*).

Le coût (et la disponibilité) des matières premières est bien entendu un élément déterminant pour l'industriel. Alors que les phospholipides synthétiques ont un coût très élevé, la lécithine de jaune d'œuf ou de soja est beaucoup plus abordable. Comme cette lécithine contient un certain nombre de liaisons insaturées dans les chaînes acyles, il faut rappeler que l'hydrogénation totale de ces phospholipides d'origine naturelle permet d'éviter les phénomènes de peroxydation lipidique (*Lichtenberg & Barenholz, 1988*).

### 1.5.3 Apyrogénicité

Pour produire des liposomes apyrogènes, il faut remplir trois conditions :

1. Partir de matières premières ayant une faible contamination pyrogénique initiale. Les phospholipides actuellement disponibles sur le marché répondent à cette exigence.
2. Effectuer une dépyrogénisation des matières premières. Pour cela, les matières premières lipophiles (phospholipides, antioxydants lipophiles, cholestérol, principe actif lipophile) sont dissoutes dans un solvant organique et la solution obtenue subit une ultrafiltration sur une membrane d'un PM limite de 10 000 Daltons. Etant donné que les lipopolysaccharides pyrogènes sont à l'état agrégé dans les solvants organiques, ils ont un poids moléculaire variant entre 30 000 et 1 million de Dalton, ce qui les empêche de traverser la membrane d'ultrafiltration. Quant aux matières premières hydrophiles, qui se limitent généralement au composé hydrophile à encapsuler, elles sont dissoutes dans un solvant aqueux dépyrogénisé par distillation ou par osmose inverse (*Martin, 1990*).
3. Dépyrogéniser l'appareillage (extrudeur, homogénéisateur) utilisé pour la fabrication des liposome (*Martin, 1990*). Cette dépyrogénisation se fait soit par exposition à la chaleur sèche (250 °C pendant 30 minutes) ou humide (121 °C + 1 bar pendant 2 heures à l'autoclave), soit par traitement chimique (hydrolyse acide ou basique, oxydation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou alkylation par oxyde d'éthylène).

### 1.5.4 Stérilité

Trois techniques de stérilisation des liposomes ont été étudiées :

1. Le **traitement à la chaleur**. Il comporte des risques élevés d'hydrolyse ou de peroxydation des phospholipides, ainsi que de destruction des principes actifs encapsulés (*Zuidam et al., 1993*). Néanmoins, *Kikuchi et al. (1991)* ont stérilisé avec succès des liposomes par autoclavage à 121 °C + 1 bar durant 20 minutes. Cette stérilisation n'a pas affecté l'intégrité physique des liposomes (absence d'altération membranaire visible, absence d'oxygénation et/ou de fusion, fuite en principe actif négligeable), à condition toutefois que :
  - les phospholipides utilisés soient saturés ou qu'ils aient un indice peroxyde très faible ;
  - les liposomes soient dispersés dans une solution aqueuse isotonique de glucose ou de polyol (propylène glycol, glycérol) ;
  - une interaction électrostatique soit présente entre la paroi chargée et le composé encapsulé ;
  - le composé encapsulé soit thermorésistant.

Cependant, des études plus poussées devraient être menées pour préciser les risques éventuels de destruction des liposomes lors d'un traitement à la chaleur.
2. **L'irradiation  $\gamma$**  des liposomes. Elle est à proscrire totalement en raison d'une peroxydation et d'une hydrolyse des phospholipides, d'un accroissement de la perméabilité des liposomes, et de changements de viscosité de la bicouche phospholipidique (*Albertini & Rustichelli, 1993 ; Zuidam et al., 1995* )
3. **La filtration stérilisante**. Elle se pratique à travers un filtre en polycarbonate de 0,22  $\mu\text{m}$ . C'est à l'heure actuelle la seule technique de stérilisation qui ait été adoptée pour les liposomes. Elle procède comme suit.

La préparation de la dispersion liposomale se fait en classe 10. Ensuite, elle est stérilisée par passage à travers un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  (NB. pour éviter que le filtre stérilisant ne soit colmaté par des particules en suspension, il est recommandé d'effectuer une préfiltration à l'aide d'un filtre en profondeur de 0,45  $\mu\text{m}$ ). Le conditionnement des liposomes stérilisés doit évidemment se faire aseptiquement en enceintes stériles (classe 100). Si on le désire, on peut également lyophiliser la dispersion liposomiale dans des conditions stériles et effectuer aseptiquement le conditionnement du produit lyophilisé.

Le principal inconvénient de la filtration stérilisante réside dans le fait qu'elle ne peut pas s'appliquer à la stérilisation de liposomes de taille  $> 0,22 \mu\text{m}$ . En effet, ceux-ci subissent, lors de la filtration, une réduction importante de leur taille accompagnée d'une perte notable de phospholipides (jusque 20 %) et de composés encapsulés. Par conséquent, il est préférable d'effectuer, avant la filtration stérilisante, une extrusion de ces liposomes par passage sur filtre de polycarbonate ou sur filtre de céramique.

En résumé, la filtration stérilisante est une très bonne technique de stérilisation des liposomes à conditions que ceux-ci possèdent une taille (avant ou après extrusion)  $< 0,22 \mu\text{m}$  (*Martin, 1990*).

Toutefois, il est parfois nécessaire d'obtenir des liposomes stériles de grande taille. Ainsi, l'administration intramusculaire se fait généralement avec des MLV, qui séjournent plus longtemps au niveau du site d'injection que les petits liposomes (*Mayer et al., 1986*). Dans ce cas, il est impossible de stériliser les liposomes MLV par filtration stérilisante, et la meilleure solution à l'heure actuelle est de réaliser une stérilisation séparée des différentes matières premières puis d'effectuer la préparation et le conditionnement des liposomes de façon aseptique. Ceci implique que l'appareillage destiné à la préparation de liposomes soit au préalable stérilisé, ce qui n'est généralement pas simple. De plus, la complexité des procédés de préparation de liposomes et le nombre élevé d'opérations différentes rendent la stérilisation délicate (*Martin, 1990*).

Par conséquent, le problème lié à la stérilisation de liposomes de grande taille reste encore posé. Dans tous les cas, des tests de stérilité et d'apyrogénicité bien validés doivent être utilisés.

### 1.5.5 Autres exigences

Le procédé de fabrication doit être **reproductible**, par exemple en termes de distribution de tailles des liposomes produits, d'efficacité d'encapsulation et de libération du composé encapsulé.

La **teneur résiduelle** en solvants organiques et en détergent doit être la plus basse possible en raison de l'effet déstabilisant de ces produits sur la paroi liposomale et de leur toxicité dans la formulation finale. A ce propos, les spécifications de la teneur résiduelle en solvants seront beaucoup moins strictes lorsqu'il s'agit d'un usage topique que d'un usage par voie pulmonaire. Les spécifications les plus sévères seront d'application pour un usage parentéral. Par mesure de précaution, il est préférable d'éviter les solvants carcinogènes ou tératogènes, même s'ils peuvent être facilement éliminés durant le processus de fabrication.

L'**efficacité d'encapsulation** doit être suffisante. Un degré d'encapsulation trop faible risque d'augmenter exagérément le coût de la préparation. Dans certains cas, des stratégies de chargement actif ont été développées en vue d'augmenter l'efficacité d'encapsulation, qui peut alors atteindre 100 % (*Cullis et al., 1997*). La technique utilisée est généralement basée sur un gradient de pH. Par exemple, la doxorubicine peut être entièrement chargée dans des liposomes en présence d'un gradient de sulfate d'ammonium (*Haran et al., 1993*). Ceci suggère qu'une préparation de liposomes vides pourrait être chargée en principe actif au lit du malade, une option intéressante pour des principe actifs labiles.

La préparation de liposomes doit atteindre une **durée de conservation** (« shelf-life ») pharmaceutiquement raisonnable. Parmi les techniques de conservation qui ont été décrites au § 1.4, la lyophilisation des liposomes comme mode de conservation sera étudiée.

Le **rapport bénéfice/coût** de la formulation doit être évalué.

### 1.5.6 Transposition à l'échelle industrielle

La plupart des méthodes de fabrication décrites dans la littérature scientifique ont été étudiées à l'échelle des laboratoires de recherche (échelle 1). Il est évidemment difficile d'extrapoler les résultats obtenus compte tenu de la différence d'échelle avec la production industrielle (échelle 100 à 1000). Néanmoins, des études ont été menées sur la faisabilité de certains procédés de fabrication à **l'échelle pilote** (suivant la législation de la C.E., la taille

des lots pilotes doit correspondre au minimum à 10 % du futur lot industriel). Sur base de ces résultats, on peut savoir si le procédé de fabrication mis au point dans les laboratoires de recherche est réalisable à l'échelle industrielle (Reynier, 1994).

Le **Tableau 1.8** fait le point sur la faisabilité à l'échelle industrielle des différentes méthodes de fabrication que nous avons décrites.

**Tableau 1.8.** Faisabilité à l'échelle industrielle des différentes méthodes de préparation de liposomes décrites dans l'INTRODUCTION.

<i>Méthode de préparation</i>	<i>Faisabilité à l'échelle industrielle ?</i>
Hydratation d'un film phospholipidique (MLV)	Inadapté
Traitement aux ultrasons (SUV)	Inadapté
Extrusion à la presse de French	Difficilement adaptable
Spray-drying	Adapté
Extrusion sur filtre de polycarbonate, de céramique ou d'acier inoxydable (SUV, LUV, MLV)	Très facilement adaptable
Microfluidisation et homogénéisation à haute pression (SUV)	Très facilement adaptable
Injection d'un solvant miscible à l'eau (éthanol, alcool isopropylique, propylène glycol, éthylène glycol)–SUV	Adapté
Injection d'un solvant non miscible à l'eau (diéthyléther, éther de pétrole, dérivés fluorocarbonés)–LUV	Difficilement adaptable (sauf pour les fluorocarbonés)
Élimination de détergent à partir de micelles mixtes (SUV, LUV)	Difficilement adaptable (sauf détergent éliminé par dialyse en continu)
Fusion induite par le Ca <sup>2+</sup> (LUV)	Difficilement adaptable (sauf détergent éliminé par dialyse en continu)
Lyophilisation–réhydratation (MLV)	Adapté
Proliposomes	Adapté
Microencapsulation	Adapté
Congélation–décongélation	?

### 1.5.7 Système de contrôle de qualité des formulations liposomales

Le **Tableau 1.9**, inspiré de *Barenholz & Crommelin (1994)* présente les différents paramètres qui doivent être pris en compte lors de la mise au point d'un système de contrôle de qualité des formulations liposomales.

**Tableau 1.9.** Paramètres utiles dans la mise au point d'un système de contrôle de qualité des formulations liposomales (adapté de *Barenholz & Crommelin, 1994*).

1. <i>Essais de pureté des matières premières</i>	4. <i>Essais de stabilité physique des liposomes</i>
2. <i>Caractérisation de la formulation liposomale</i>	Taille et distribution de taille des liposomes
Aspect, pH	Degré de lamellarité
Osmolarité	Pourcentage de composés non encapsulés
Composition en phospholipides	Rapport principe actif / phospholipide
Concentration en phospholipides	Stabilité liposomale lors de la dilution
Concentration en cholestérol	5. <i>Essais biologiques :</i>
Concentration en principe actif encapsulé	Stabilité dans les fluides biologiques
Concentration en antioxydant	Stérilité
3. <i>Essais de stabilité chimique des liposomes</i>	Pyrogénicité
pH	Toxicité animale
Peroxydation phospholipidique	
Hydrolyse phospholipidique	
Auto oxydation du cholestérol	
Stabilité des antioxydants	
Solvant organique ou détergent résiduel	

## 1.6 Méthodes de caractérisation des liposomes

Le comportement des liposomes dans les systèmes physiques et biologiques, ainsi que l'efficacité des préparations liposomales thérapeutiques, sont conditionnés dans une large mesure par leurs caractéristiques telles que la taille, la composition chimique, la perméabilité membranaire, la qualité et la pureté des matières premières utilisées, ainsi que la nature des principes actifs encapsulés. Afin d'évaluer au mieux ces paramètres, les préparations liposomales devraient être de taille homogène et débarrassées des molécules non encapsulées.

Les techniques utilisées pour caractériser les préparations liposomales sont détaillées dans les ouvrages classiques (par exemple : *Lichtenberger & Barenholz, 1988 ; New, 1990 ; Vidal, 1993*). Celles qui ont été utilisées lors de ce travail sont précisées dans le chapitre MATERIEL ET METHODES. On peut relever ici les aspects généraux suivants:

1. La composition lipidique des liposomes conditionne nombre de leurs propriétés, comme l'efficacité d'encapsulation, la perméabilité du composé encapsulé, la stabilité des vésicules dans les liquides biologiques, et les interactions des liposomes avec les cellules. Il convient donc de choisir avec soin les lipides constituant la membrane liposomale, et de vérifier leur pureté avant et après la constitution des vésicules. Il faut rechercher en particulier les phénomènes de dégradation et d'oxydation des lipides (*Grift et al., 1993*). Ceci peut être effectué par les techniques habituelles d'**analyse des lipides** : chromatographie en couche mince (qui permet également de quantifier la présence de lysolécithines), chromatographie en phase gazeuse, chromatographie liquide en haute pression (HPLC), etc. La quantité de phospholipides peut être mesurée par la méthode de Bartlett (*Bartlett, 1959*) ou celle de Stewart (*Stewart, 1980*). L'oxydation des lipides s'évalue par le spectre UV, par la réaction des endoperoxydes avec l'acide thiobarbiturique, ou par la chromatographie en phase gazeuse.
2. Le **pourcentage d'encapsulation** d'une molécule dépend en premier lieu de ses caractéristiques physico-chimiques (taille, charge, hydrophobicité...). Pour mesurer le degré d'encapsulation, il convient de se débarrasser aussi complètement que possible des molécules non encapsulées, par exemple au moyen de la technique simple de centrifugation en minicolonnes (*Fry et al., 1978*) qui sera utilisée dans ce travail, et de rapporter l'encapsulation à la quantité de lipides (*Vidal, 1993*). La méthode la plus simple est d'utiliser un analogue radiomarqué de la molécule étudiée, et d'effectuer un comptage de la radioactivité et un dosage des phospholipides d'un échantillon pour obtenir l'encapsulation pondérée. S'il n'est pas possible de disposer d'un analogue radiomarqué, une autre possibilité est de mesurer une caractéristique spécifique de la molécule (activité biologique, absorbance) après son relargage suite à la lyse des vésicules par un détergent ou un solvant.

3. La mesure du **volume aqueux interne**, qui est classiquement effectuée après l'incorporation d'un marqueur fluorescent, soit la carboxyfluorescéine (*Weinstein et al., 1977*), soit la calcéine (*Vidal et al., 1984*), ou d'un marqueur radioactif, le  $^{14}\text{C}$ -glucose, est intéressante si l'on examine l'encapsulation d'une petite molécule hydrosoluble. Ces techniques permettent aussi d'évaluer le pourcentage de relargage des substances hydrosolubles au cours du temps. La quantité d'eau peut aussi être mesurée directement par résonance magnétique nucléaire, après avoir remplacé le milieu externe par un fluide inerte du point de vue spectroscopique (*Pidgeon et al., 1987 ; New, 1990*).
  
4. La **taille des vésicules** est une caractéristique cruciale d'une préparation liposomale. Il faut non seulement mesurer la taille moyenne, mais surtout la distribution de cette taille, car certaines propriétés de la préparation pourraient ne provenir que d'une sous-population des vésicules. La distribution des tailles permet aussi d'évaluer les phénomènes d'agrégation ou de fusion des vésicules. Les techniques qui permettent de mesurer les tailles des liposomes sont nombreuses. Les principales sont la microscopie électronique, principalement en cryofracture (mais qui n'est pas toujours facilement disponible) ; la diffusion de la lumière mesurée de façon dynamique (DLS = dynamic light scattering, ou QELS = quasi-elastic light scattering, ou PCS = photon correlation spectroscopy [*Payne et al., 1986*]) ; et la chromatographie d'exclusion sur Séphacryl S1000. Ces trois techniques donnent généralement des résultats semblables (*Schurtenberger & Hauser, 1984*). L'HPLC est également une méthode fiable pour mesurer les tailles des liposomes (*Ollivon et al., 1986 ; Walter et al., 1993*), et la turbidimétrie, une méthode facile (*Lesieur et al., 1991*).

## 1.7 Administration de liposomes sous forme d'aérosols

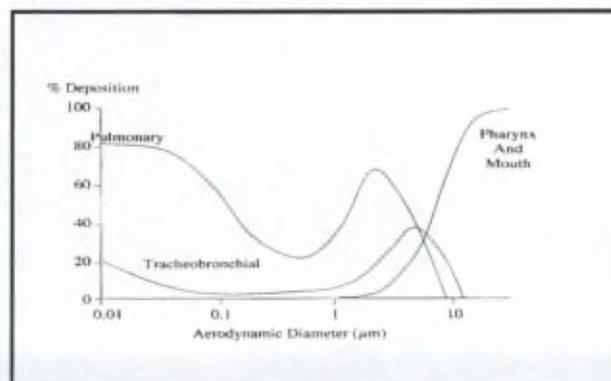
### 1.7.1 Introduction

L'administration de liposomes par voie d'inhalation est une idée intéressante qui est explorée depuis une quinzaine d'années, comme le rappelle le **Tableau 1.10**.

Plusieurs caractéristiques potentiellement avantageuses des liposomes à visée pulmonaire ont été mentionnées précédemment (cf. 1.1.3 et *Zeng et al., 1995*) : dispersion aisée en aérosol, non-toxicité, longue rémanence pulmonaire, et pénétration dans les macrophages alvéolaires. Il est évident que la taille des liposomes constitue un paramètre essentiel pour leur administration pulmonaire. En effet, selon leur taille, les liposomes peuvent atteindre différents sites de l'appareil respiratoire. Ces sites peuvent être évalués par analogie avec le dépôt intrapulmonaire de particules inhalées de tailles différentes (**Tableau 1.11**).

**Tableau 1.11.** Relation entre la taille des particules inhalées et leur dépôt intrapulmonaire (inspiré de : *Schreier, 1992* et : *Schreier et al., 1993*).

Diamètre aérodynamique moyen de particules ( $\mu\text{m}$ )	Dépôt
> 10	Cavité nasale
> 5	Trachée, bronche
> 1	Alvéole
> 0,1	Particules stables – faible dépôt
< 0,1	Important dépôt



**Tableau 1.10.** Relevé bibliographique de quelques essais d'administration de liposomes en inhalation et/ou en aérosols à visée d'action intrapulmonaire

Année	Premier auteur	Espèce	Drogue encapsulée	Commentaires
<i>Premiers essais</i>				
1987	Debs	rat	Pentamidine	Même distribution et efficacité que la drogue libre
1988	Wyde	souris	Enviroxime	Drogue hydrophobe ; n'atteint les bronchioles que sous forme liposomale
1989	Taylor	humain	Cromoglycate sodique	Absorption lente modifiant la pharmacocinétique plasmatique
1990	Forsgren	cochon	Aucune	Dépôts dans les bronchioles terminales et les alvéoles ; interaction avec les macrophages alvéolaires
1991	Thomas	humain	Aucune	Les liposomes ne produisent aucune modification des fonctions pulmonaires
1993	Myers	souris	Aucune	Aucun effet toxique d'une administration chronique (4 semaines)
1994	Waldrep	humain	Béclométhasone dipropionate	Comparaison de plusieurs nébuliseurs commerciaux
<i>Amphotéricine B</i>				
1992	Gilbert	souris	Amphotéricine B	Efficacité $\geq$ à la forme i.v. contre cryptococcose pulmonaire
1997	Lambros	souris	Amphotéricine B	Cinétique d'élimination pulmonaire biexponentielle
<i>Cyclosporine A</i>				
1993	Gilbert	souris	Cyclosporine A	Une inhalation de 15 min produit une rétention pulmonaire prolongée (4 j.)
1997	Gilbert	humain	Cyclosporine A	Bonne tolérance
1999	Letsou	chien	Cyclosporine A	Rétention dans les poumons durant 120 min
<i>Thérapie génique</i>				
1992	Stribling	souris	Gène CAT	Taux d'expression pulmonaire élevé durant au moins 21 jours
1994	Canonico	lapin	Gène $\alpha_1$ -antitrypsine	Pas de toxicité (NB : liposomes cationiques)
1996	McLachlan	souris	Gène CFTR (mucoviscidose)	Conditions animales favorables pour un essai de Phase I chez l'homme
2001	Ruiz	humain (n=8)	Gène CFTR (mucoviscidose)	50 % des patients ont développé un fort syndrome inflammatoire (dû à une synergie ADN-lipides)
<i>Quelques essais récents</i>				
1996	Beaulac	rat	Tobramycine	Efficacité d'une poudre sèche $\geq$ à la forme libre
1997	Khanna	chien	interleukine-2	Distribution intrapulmonaire homogène
<i>Articles de revue (titres)</i>				
1992	Schreier	Liposome aerosols		
1993	Schreier	Pulmonary delivery of liposomes		
1994	Shek	Liposomes in pulmonary applications : physicochemical considerations, pulmonary distribution and antioxidant delivery		
1996	Gilbert	Liposomal aerosols in the management of pulmonary infections		
1999	Klyashchitsky	Nebulizer-compatible liquid formulations for aerosol pulmonary delivery of hydrophobic drugs : glucocorticoids and cyclosporin		

D'un point de vue technologique, différentes méthodes ont été décrites dans la littérature pour délivrer des liposomes aérosolisés directement dans les voies aériennes (Taylor *et al.* 1990 ; Schreier *et al.*, 1993). La **nébulisation** semble être le procédé le plus simple pour disperser des suspensions liposomales sous formes d'aérosols (Taylor *et al.*, 1990 ; Niven *et al.*, 1991 & 1992 ; Desai & Finlay, 2002), alors que le développement de systèmes pressurisés ou **d'inhalateurs de poudre** se heurte à des problèmes de formulation plus importants (Farr *et al.*, 1987 ; Schreier *et al.*, 1994). Cependant, la disparition obligatoire des gaz propulseurs à base de CFC a suscité de nouvelles recherches dans les techniques d'inhalation de principes actifs basées sur des gaz propulseurs plus performants (ex.: le HFA 134 et 227), des appareils à débit contrôlé (« MDI, ou *metered-dose inhalers* ») et des inhalateurs de poudres sèches (IPS, ou « DPI, pour *dry powder inhalers* ») (Leach, 1998 ; Keller, 1999). Pour l'administration de liposomes, le développement d'IPS n'utilisant pas de gaz propulseurs fluorocarbonés présenterait un avantage certain sur les deux autres techniques. En effet, une formulation sèche procurerait un gain non négligeable de stabilité des liposomes, ainsi qu'une meilleure compliance du patient.

### 1.7.2 Nébulisation

Niven *et al.* ont largement étudié le procédé de nébulisation des liposomes en utilisant la carboxyfluorescéine (CF) comme marqueur du compartiment aqueux des vésicules (Niven & Schreier, 1990 ; Niven *et al.*, 1991 & 1992). La fuite du matériel encapsulé a été suivie sur une période d'aérosolisation de 80 min. Les résultats indiquent que la libération de CF vers le milieu environnant varie de 13 à 16 % en fonction de la composition lipidique des vésicules. De son côté, le cholestérol déstabilise les liposomes lorsqu'il est utilisé à 10 % (en moles), alors qu'une concentration de 30 % a un effet inverse. En outre, la quantité de substance libérée ne semble pas être influencée par la concentration en phospholipides, pour des valeurs comprises entre 0,5 et 50 mg/ml. L'effet de la taille des vésicules sur la rétention de CF encapsulée a également été mis en évidence. En fait, la perte en CF atteint un plateau lorsque le diamètre moyen des liposomes approche la taille des gouttelettes de l'aérosol (<5 µm) et reste minimale lorsque les vésicules sont dix fois plus petites (<0,5 µm). L'influence d'autres paramètres tels que la pression de nébulisation, la température, la tonicité et le pH du milieu de dilution a également été étudiée pour des liposomes HSPC/DPPG (9:1). D'autres auteurs ont dans l'ensemble confirmé ces résultats ; certains ont insisté sur l'intérêt d'utiliser des

phospholipides à haut  $T_m$  comme le dipalmitoylphosphatidylcholine ou DPPC (Darwis & Kellaway, 2001). Il est possible de lyophiliser au préalable les liposomes à nébuliser (Bridges & Taylor, 2001).

Waldrep *et al.* (1994) ont comparé les performances de 18 nébuliseurs commerciaux dans l'aérosolisation de liposomes constitués de dilaurylphosphatidylcholine (DLPC) et de dipropionate de bécloéthasone. Les aérosols générés par différents types d'appareils ont été caractérisés en terme de Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) et de débit. Bien que la majorité des nébuliseurs testés présente des performances acceptables, certains appareils sont mieux adaptés pour délivrer les liposomes de bécloéthasone vers la région périphérique du poumon. D'autres appareils produisent un dépôt plus important dans la bouche et la gorge. On peut également relever que d'autres types de nébuliseurs, par exemple de type ultrasoniques, pourraient délivrer des aérosols liposomaux d'environ 5  $\mu\text{m}$ , à condition de stabiliser les structures liposomales par une quantité optimale de cholestérol (Leung *et al.*, 1996).

### **1.7.3 Inhalation de liposomes sous forme de particules séchées**

Cette technique, déjà explorée il y a quelques années (Forsgren *et al.*, 1990), a laissé apparaître plus récemment de grandes possibilités (Beaulac *et al.*, 1999 ; Joshi & Misra, 2001).

Un brevet enregistré en 1987 (Axelsson *et al.*, 1987) décrit un système d'administration pulmonaire des liposomes dans lequel les vésicules sont déshydratées sous forme d'une poudre finement divisée. Une quantité déterminée de cette poudre pourra être inhalée grâce à un dispositif approprié et être réhydratée in situ dans le poumon, formant ou restituant spontanément des liposomes. La suspension liposomale à partir de laquelle la forme sèche est obtenue peut être préparée selon l'une des nombreuses méthodes existantes étudiées dans le chapitre précédent. Elle est ensuite déshydratée par lyophilisation ou séchée par atomisation en utilisant un cryoprotecteur (tréhalose) pour éviter l'agglomération du produit déshydraté. Le résidu sec doit être constitué de particules suffisamment petites (diamètre < 5  $\mu\text{m}$ ) pour atteindre les alvéoles pulmonaires. La poudre sèche peut également être constituée de proliposomes, c'est-à-dire d'une préparation à base de phospholipides formant spontanément des liposomes lorsqu'elle est mise en contact avec un milieu aqueux à une température supérieure au  $T_c$  des lipides utilisés.

Deux systèmes semblent particulièrement adaptés pour l'administration de poudres finement divisées par voie pulmonaire. Dans le premier, la préparation liposomale séchée est conditionnée dans des gélules qui sont placées dans un inhalateur à poudre. Lorsque le patient inspire dans le dispositif, le contenu de la gélule est inhalé sous forme d'un aérosol. Le deuxième système est constitué d'un flacon pressurisé contenant les particules en suspension dans un mélange de gaz propulseurs. Dans ce cas, il est particulièrement important que les constituants de la préparation liposomale soient insolubles dans les gaz propulseurs utilisés afin d'éviter la déstabilisation des structures vésiculaires.

*Edwards et al. (1999)* ont également proposé un système d'administration de liposomes par inhalation de petites particules (qui peuvent aussi être des particules faites d'un matériau biodégradable comme l'acide polyglycolique). Dans ce brevet, une suspension liposomale est déshydratée par atomisation afin de produire des fines particules séchées dont le diamètre est  $< 5 \mu\text{m}$ . La poudre obtenue est mise en suspension dans un mélange de gaz propulseurs HFA 137 & 227. Un système pressurisé à valve doseuse pourra être utilisé pour délivrer une quantité déterminée de cette poudre dans le poumon afin de reconstituer des liposomes au contact des parois humides des voies respiratoires.

## **1.8 L'utilisation thérapeutique des glucocorticoïdes**

### **1.8.1 Généralités**

Les glucocorticoïdes (GC) sont les principes actifs anti-inflammatoires les plus puissants dont on dispose à l'heure actuelle (*Parfitt, 1999*). Ils permettent de contrôler l'évolution de nombreuses maladies graves de type allergique (asthme), inflammatoire (polyarthrite rhumatoïde), immunologique (pathologie auto-immunitaire, greffe d'organe) ou cancéreuses (leucémies, lymphomes). Leur utilisation n'est limitée que par leurs effets indésirables. Les GC sont administrés par inhalation dans le traitement de l'asthme, qui est la plus fréquente des maladies contrôlées par ces principes actifs.

Les GC sont dérivés d'hormones endogènes fabriquées dans les glandes endocrines corticosurrénales sous l'influence de l'ACTH hypophysaire, elle-même contrôlée par une hormone hypothalamique, la CRH. On parle collectivement de l'axe hypothalamo-

hypophyso-surrénalien. Les corticosurrénales sécrètent en majorité deux types d'hormones stéroïdiennes à 21 atomes de carbone groupées sous le terme de **corticostéroïdes** :

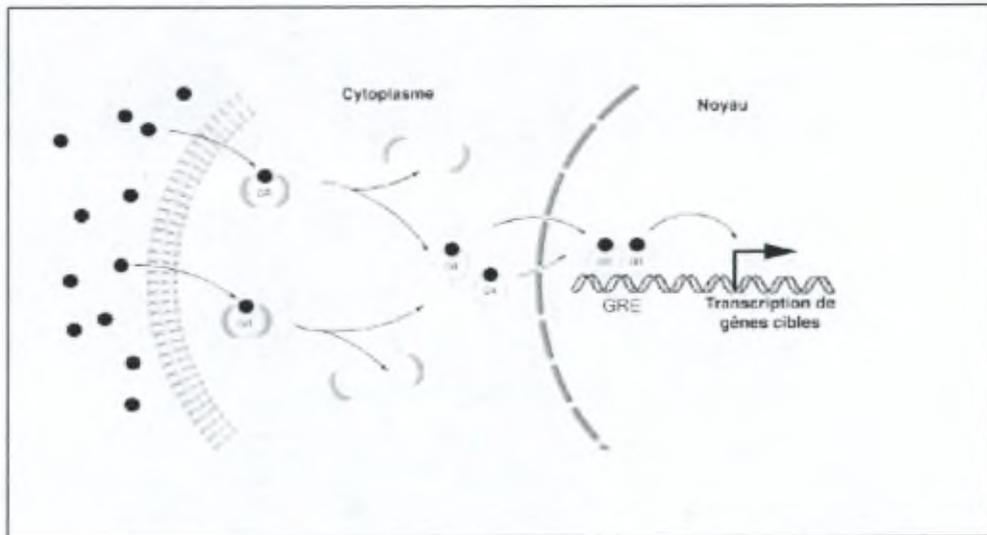
- Celles qui interviennent dans le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides ainsi que dans les phénomènes inflammatoires. On les appelle hormones **glucocorticoïdes**. Les GC naturels sont, chez l'homme, la cortisone et l'hydrocortisone (ou cortisol).
- Celles qui interviennent dans l'équilibre hydrosodé et potassique des liquides corporels. On désigne ces hormones sous le terme de **minéralocorticoïdes**. La principale hormone minéralocorticoïde naturelle est l'aldostérone.

La corticosurrénale sécrète aussi de petites quantités d'androgènes, hormones stéroïdiennes à 19 atomes de carbone.

## **1.8.2 Mécanismes d'action**

### **1.8.2.1 Principes généraux d'action**

Contrairement aux hormones peptidiques et aux neuromédiateurs, qui possèdent des récepteurs membranaires, les GC diffusent librement à travers la membrane plasmique et, dans leurs cellules-cibles, se lient de façon réversible à un **récepteur** cytosolique. Il n'existe qu'un seul type connu de récepteur actif pour les GC, et son affinité semble identique dans tous les tissus. Il appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires, qui comprend ceux des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, des rétinoïdes et de la vitamine D. L'activation de ces récepteurs provoque leur migration dans le noyau et leur liaison à des zones spécifiques de l'ADN appelées HRE (hormone-responsive elements). Pour les GC, ces éléments sont appelés **GRE** (glucocorticoid-responsive elements) (**Fig. 1.17**). Les GRE sont situés sur le promoteur des gènes placés sous contrôle glucocorticoïde. Ces gènes, appelés CRG (corticosteroid-responsive genes) sont au nombre d'une centaine par cellule (*Beato, 1989*).

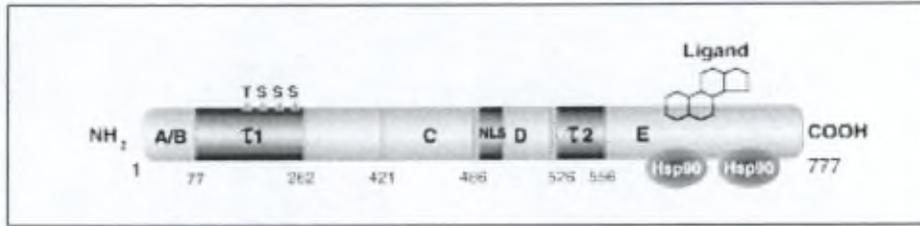


**Fig. 1.17.** Activation du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) par son ligand (●), puis migration dans le noyau et liaison aux séquences GRE de l'ADN (d'après Biola & Pallardy, 2002).

Cependant, il est devenu évident, au cours de ces dernières années, que de très nombreux effets des GC, en particulier leurs effets antiinflammatoires, dépendent d'un autre mécanisme, par lequel le récepteur aux GC interagit structurellement et fonctionnellement, non plus avec l'ADN, mais avec des protéines qui sont des **facteurs de transcription** (Barnes, 1998 ; Biola & Pallardy, 2000). Ceci sera détaillé plus loin. Pour être complet, mentionnons le fait qu'à fortes doses, les GC agissent aussi directement sur la membrane plasmique (Falkenstein *et al.*, 2000), déclenchant, entre autres, une apoptose de lymphocytes T. De tels effets sont obtenus en clinique lors de la « pulse therapy » intraveineuse aux GC, qui est utilisée dans des maladies comme le syndrome de Guillain-Barré, la sclérose en plaques, des vasculites, ainsi que lors de certaines chimiothérapies anticancéreuses (Gold *et al.*, 2001).

### 1.8.2.2 Structure et fonction du récepteur aux glucocorticoïdes

La structure primaire du récepteur humain aux GC a été élucidée (Müller & Renkawitz, 1991) ; elle est schématisée dans la **Fig. 1.18**.

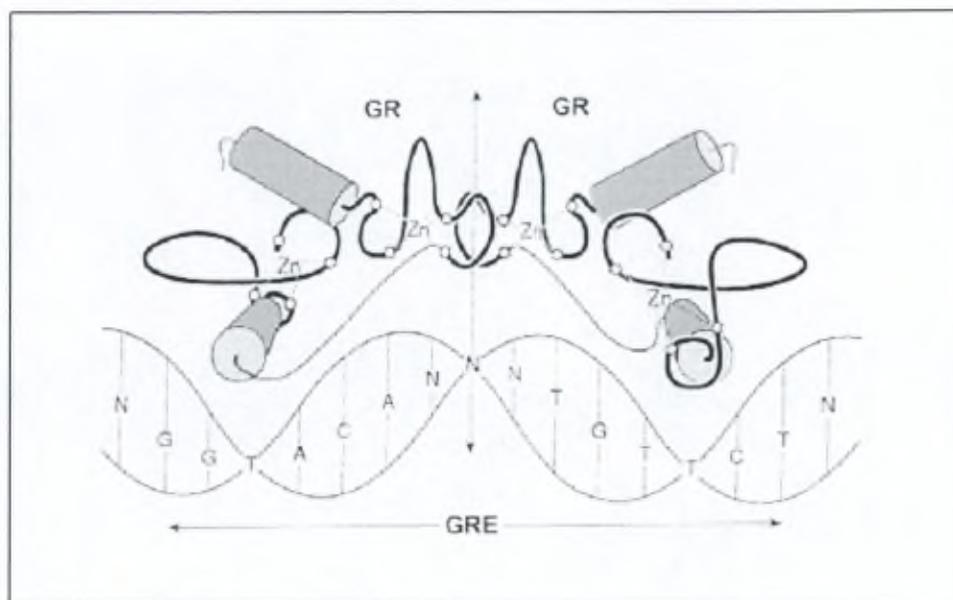


**Fig. 1.18.** Structure schématisée du récepteur humain aux glucocorticoïdes (GC), selon *Biola & Pallardy, 2000*.

Le récepteur, d'un poids moléculaire prédit de 90 kDalton, contient 777 acides aminés et présente, selon les schémas, 4 ou 5 domaines bien définis :

1. Le domaine E (C-terminal, résidus 558 à 777) contient le site spécifique de liaison à l'hormone stéroïdienne ainsi qu'un site de liaison pour la protéine-chaperon HSP90 (heat shock protein de 90 kDalton). Dans sa forme inactive, le récepteur est lié par son domaine E à un complexe protéique d'environ 300 kDalton qui comprend deux molécules de HSP90, une molécule d'immunophiline et d'autres protéines inhibitrices. Lorsque le GC se lie au récepteur, les molécules-chaperons s'en détachent, ce qui conduit à son activation (*Zhang et al., 1996*).
2. Le domaine transactivateur tau2, ou  $\tau_2$  (résidus 526 à 558) est indispensable à l'activation transcriptionnelle de gènes par le récepteur.
3. Le domaine D ou région-charnière (résidus 486 à 526) est impliqué dans la translocation du récepteur, grâce à la présence d'une séquence de localisation nucléaire ou NLS, dont l'activité est réprimée tant que le domaine E n'a pas fixé le ligand.
4. Le domaine C (résidus 421 à 486) est le domaine de liaison à l'ADN. Il présente de nombreuses homologies de séquences avec celui des autres récepteurs stéroïdiens. Il permet la liaison spécifique, sous forme d'un homodimère, du complexe récepteur-ligand aux GRE. Ceux-ci ont pour consensus la séquence suivante : 5'-GGTACAnnnTGTTCT. Le domaine C contient 9 atomes de cystéine dont 8 se coordonnent aux atomes de zinc, formant ce qu'on appelle deux « doigts à zinc » (*Freedman et al., 1988*). Ceux-ci maintiennent la configuration requise pour la liaison spécifique du récepteur à l'ADN (**Fig. 1.19**).

5. Le domaine A/B (N-terminal, résidus 1 à 420) contient la région tau1 indispensable à la transactivation transcriptionnelle des CRG. Le domaine A/B semble aussi lier des facteurs régulateurs de la transcription (cf. ci-dessous).



**Fig. 1.19.** Interaction entre les doigts de zinc du récepteur aux GC (en haut) et la zone GRE de l'ADN (selon Biola & Pallardy, 2000).

Le récepteur aux GC est phosphorylé dans sa région N-terminale ; la modulation de cette phosphorylation par les kinases dépendant des cyclines (cdk) et par les MAP-kinases (mitogen-activated protein kinase) pourrait réguler son activité transcriptionnelle (Krstic et al., 1997). De plus, il existe une isoforme légèrement plus courte du récepteur aux GC, appelée hGR $\beta$ , qui provient d'un splicing alternatif. Cette forme, qui ne lie pas les GC et n'induit pas de signal, pourrait servir d'élément de régulation ou de résistance aux GC (Vottero & Chrousos, 1999 ; Strickland et al., 2001), bien que cette opinion soit controversée (Carlstedt-Duke, 1999).

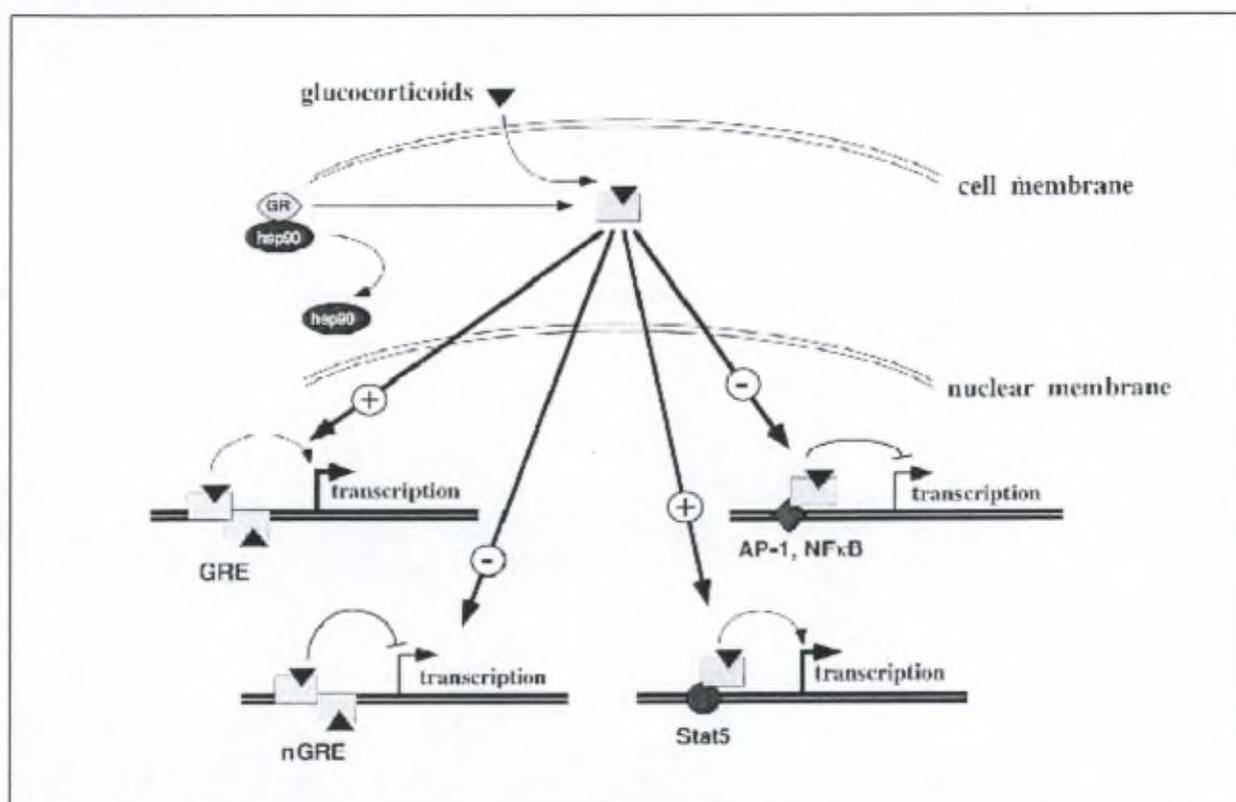
### 1.8.2.3 Points d'impact cellulaires des glucocorticoïdes

Dans leurs cellules-cibles, les GC modulent la transcription de CRG en les induisant ou en les réprimant. Il est important de signaler que la régulation de la transcription de gènes par le récepteur aux GC peut être dépendante ou indépendante d'une fixation sur l'ADN, et

que dans le premier cas elle peut être positive (induction) ou négative (répression, grâce à des « GREn »). Il est probable que le récepteur s'attache aussi à d'autres régions de l'ADN moins bien définies et/ou que la présence de certains facteurs transcriptionnels détermine la réponse génomique enclenché par la fixation du récepteur.

Les GC inhibent aussi la synthèse de certaines protéines en diminuant la stabilité de leur ARN messenger via l'expression de ribonucléases spécifiques (*Peppel et al., 1991*), comme démontré pour leur action répressive sur la cyclooxygénase-2 (*Ristimaki et al., 1996*).

Mais, dans de nombreux cas, la régulation de l'expression de gènes par les GC est due à une interaction directe du récepteur avec d'autres facteurs de transcription. Ce mécanisme (**Fig. 1.20**), décrit en 1990 (*Yang-Yen et al., 1990 ; Schüle et al., 1990 ; Jonat et al., 1990*), pourrait être d'une très grande importance dans l'action antiinflammatoire des GC (*Barnes & Adcock, 1993*).



**Fig. 1.20.** Différents modes d'action du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) après liaison à son ligand (▼). Sur la partie gauche du schéma, la transcription de gènes est activée directement par un GRE où se lie un dimère de GR, ou réprimée par un GRE négatif (nGRE). Sur la partie droite, le GR interagit avec des facteurs de transcription, en les bloquant (ex.: AP-1 et NFκB), ou en agissant de façon synergique avec eux (ex.: Stat5). [Selon *Barnes & Adcock, 1993*].

Ainsi, l'induction de la transcription du gène de la collagénase par le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) et les phorbol esters est fortement inhibée par les GC. Cette inhibition passe par une interaction protéine-protéine entre le facteur de transcription AP-1 (activator protein-1), plus précisément sa sous-unité c-jun, responsable de l'induction, et le récepteur aux GC (Adcock, 2001). D'autres facteurs de transcription inhibés par les GC sont le NF $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B), le NF-AT (facteur nucléaire des lymphocytes T activés) et le CREB (cyclic AMP-responsive element binding protein) (Barnes, 1998). Dans le cas du NF $\kappa$ B, son activité est aussi inhibée par les GC via l'induction de l'expression de I $\kappa$ B, un inhibiteur spécifique de NF $\kappa$ B (Auphan et al., 1995). Parfois, le récepteur aux GC interagit de façon synergique avec des facteurs de transcription, comme démontré pour certains STATs (signal transducers and activators of transcription). Enfin, les récepteurs aux GC seraient capables de modifier la structure de la chromatine en inhibant l'activité des enzymes HAT (histone acetyltransferases) et en activant celle des désacétylases des histones (Adcock, 2001). A l'heure actuelle, tous ces phénomènes sont l'objet d'intenses recherches.

Puisque la plupart des effets indésirables des GC dépendent de leur liaison à l'ADN, il devrait être possible de mettre au point des molécules qui conservent les effets anti-inflammatoires majeurs des corticostéroïdes, dus à l'inhibition des facteurs de transcription, sans provoquer de liaison récepteur-ADN. Plusieurs molécules de ce type, surnommées « corticostéroïdes dissociés », ont été synthétisées récemment (Vayssière et al., 1997 ; Vanden Berghe et al., 1999 ; Belvisi et al., 2001) et sont en voie d'évaluation *in vivo*.

### **1.8.3 Effets généraux des glucocorticoïdes**

Ils sont nombreux et peuvent être résumés comme suit :

1. Diminution de l'utilisation du glucose dans le tissu adipeux, la peau, les fibroblastes, le tissu lymphoïde ; augmentation de la glycémie.
2. Stimulation de la lipolyse et inhibition de la lipogenèse, avec augmentation de la concentration en acides gras et en glycérol dans le sang.
3. Stimulation du catabolisme protéique et élévation de l'acidoémie, facteur favorisant la néoglucogenèse hépatique (celle-ci est également stimulée de façon directe par les GC).
4. Les effets 2 et 3 additionnés produisent une diminution de la masse musculaire.

5. Stimulation de la synthèse de glycogène hépatique par activation de la glycogène-synthase et inhibition de la glycogène-phosphorylase.
6. Diminution de la synthèse de la matrice organique osseuse par effet direct, auquel s'ajoute une diminution de l'absorption intestinale de calcium et une augmentation de son excrétion rénale ; le tout aboutit à une réduction des stocks de calcium.
7. Atténuation de la sécrétion de l'hormone de croissance et de ses effets, entraînant un retard de croissance chez l'enfant.

### 1.8.4 Effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes

Les GC contrôlent l'inflammation à différents niveaux, soit en augmentant la transcription de gènes anti-inflammatoires, soit en réprimant la transcription de gènes inflammatoires (**Tableau 1.12**). Parmi ces derniers, on relève ceux de cytokines, de récepteurs pour des médiateurs de l'inflammation, d'enzymes inflammatoires et de molécules d'adhésion. Les cellules-cibles des GC sont donc, non seulement les lymphocytes, granulocytes et macrophages (comme détaillé plus loin), mais aussi des cellules épithéliales, endothéliales, etc.

**Tableau 1.12.** Effet des glucocorticoïdes sur la transcription de gènes liés à l'inflammation (selon *Barnes, 1998*).

<i>Gènes induits</i>	<i>Gènes réprimés</i>
Lipocortine-1	Multiplés cytokines (IL-1 à IL-6, IL-11 à IL-13, TNF $\alpha$ , GMCSF, SCF...)
Récepteurs $\beta$ -adrénergiques	Multiplés chémokines (IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 à -4, éotaxine...)
SLIP (secretory leukocyte inhibitory protein)	iNOS (NO synthase inductible)
CC10 (Clara-cell protein of 10 kD)	COX-2 (cyclooxygénase inductible)
I $\kappa$ B- $\alpha$	Phospholipase A <sub>2</sub> cytoplasmique
Antagoniste du récepteur de l'IL-1	ET-1 (endothéline-1)
Récepteur-leurre « IL-1 R2 »	Récepteur à NK1 et à NK2
	Molécules d'adhésion (ICAM-1, sélectine E)

#### **1.8.4.1 Protéines antinflammatoires activées**

La lipocortine-1, qui inhibe la production de plusieurs médiateurs lipidiques au départ de la membrane plasmique, est une des premières protéines dont l'induction par les GC ait été démontrée (*Flower & Rothwell, 1994*), mais son rôle n'est probablement pas majeur.

Dans les voies respiratoires, les GC augmentent la synthèse de SLIP (secretory leukocyte inhibitory protein), qui est l'antiprotéase majeure des voies aériennes. Les GC stimulent aussi la production d'une protéine appelée CC10 (Clara-cell protein of 10 kD) et de l'endopeptidase neutre qui dégrade la substance P, la bradykinine et l'endothéline-1, trois substances-clés de la pathologie asthmatique (*Sont et al., 1997*).

De plus, les GC augmentent la production de molécules qui contrecarrent l'effet des cytokines, en particulier l'effet des interleukines (IL). Parmi ces molécules inhibitrices se trouve l'antagoniste du récepteur à l'IL-1, cet antagoniste étant lui-même une cytokine, et le récepteur-leurre à l'IL-1, aussi appelé IL1-R2. Ce dernier lie l'IL-1 sans générer de signal intracellulaire et réduit donc l'activité fonctionnelle de cette importante interleukine (*Colotta et al., 1993*).

#### **1.8.4.2 Protéines inflammatoires réprimées**

L'effet antiinflammatoire principal des GC, y compris dans les voies aériennes, passe par la modulation des cytokines, dont la plupart sont réprimées au niveau transcriptionnel par les GC. Dès la phase précoce de l'inflammation, les GC inhibent ainsi la production de plusieurs interleukines (IL-1, IL-6, etc.), du TNF $\alpha$  et de facteurs chimiotactiques, ce qui réduit l'afflux de macrophages et de granulocytes au site d'inflammation. De plus, les GC diminuent la sécrétion de substances vasoactives telles que la sérotonine, l'histamine et le NO, qui augmentent la perméabilité capillaire. D'autres protéines réprimées par les GC lors de l'inflammation sont les molécules d'adhésion (ex.: ICAM-1), la NO-synthase inductible, une forme cytosolique de phospholipase A<sub>2</sub>, et la cyclooxygénase-2 inductible dans les monocytes. La production de la plupart des eicosanoïdes médiateurs de l'inflammation (prostaglandines, thromboxane, leucotriènes, PAF [platelet-activating factor]) est réduite.

### 1.8.5 Effets des glucocorticoïdes sur le système immunitaire

Les effets immunosuppresseurs des GC (Cupps & Fauci, 1982) sont exploités dans le traitement des maladies auto-immunitaires telles que le lupus érythémateux disséminé ou la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que dans la prévention du rejet des greffes d'organes.

Plusieurs étapes de l'activation du système immunitaire sont la cible des GC. Voici les trois principales :

1. Les GC perturbent le phénomène de présentation des antigènes aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes en diminuant, à leur surface, l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité MHC de classe II, ainsi que leur synthèse d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6.
2. Les GC inhibent la prolifération lymphocytaire en diminuant la production d'IL-2.
3. Les GC diminuent l'activité du promoteur de l'interféron- $\gamma$ , une des plus importantes cytokines lymphocytaires qui est elle-même impliquée dans l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Cippitelli et al., 1995).

Rappelons qu'à fortes doses, les GC induisent l'apoptose (mort programmée) des lymphocytes T *in vitro* et *in vivo* (Owens et al., 1991), par des mécanismes à la fois génomiques et non génomiques (Gold et al., 2001).

Par les mécanismes ci-dessus, les GC inhibent la réaction d'hypersensibilité immédiate et la réaction retardée cellulaire. Ils réduisent rapidement le nombre de lymphocytes circulants, ainsi que des polymorphonucléaires éosinophiles et basophiles, et réduisent plus progressivement la masse de tissu lymphoïde et du thymus.

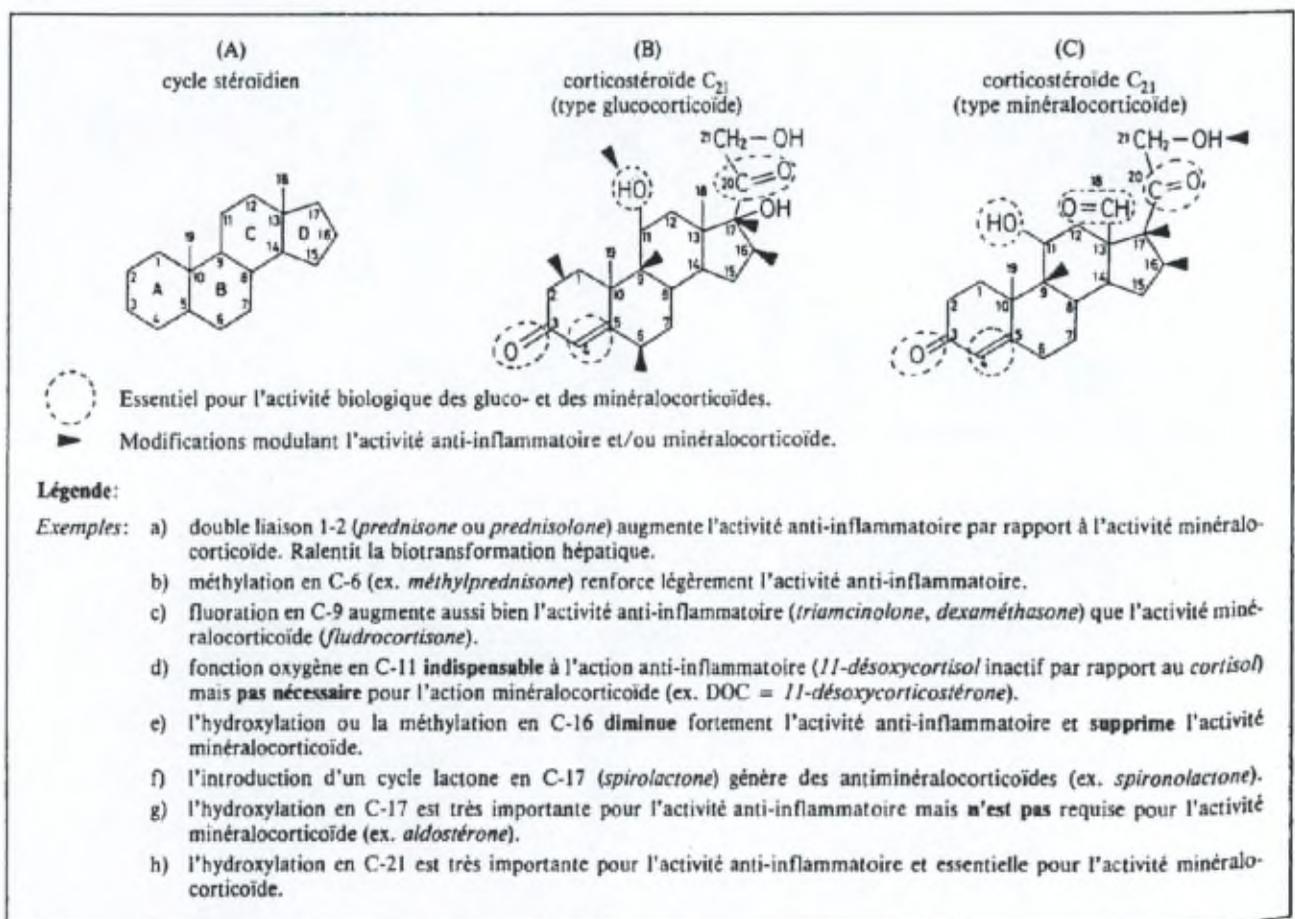
Par leurs effets antiinflammatoires et immunomodulateurs, les GC possèdent de nombreux effets bénéfiques dans des maladies allergiques et inflammatoires comme l'asthme (cf. ci-après).

L'activité des GC sur les cellules de l'immunité peut être évaluée *in vitro* en se servant d'un test d'activation des lymphocytes aussi appelé « test de transformation lymphoblastique (TTL) ». Ce test a été sélectionné pour mesurer l'activité biologique de la préparation SUV-DMP en la comparant à celle de la DXM libre, comme expliqué dans la section MATERIEL ET METHODES (cf. 2.3.10).

## 1.8.6 Utilisation pharmacologique des corticoïdes

### 1.8.6.1 Relation structure-activité

Les analogues synthétiques du cortisol sont très nombreux. Ils ont tous été constitués par diverses additions à la structure de base du corticostéroïde C<sub>21</sub> (**Fig. 1.21**). Grâce à ces additions, les dérivés synthétiques du cortisol sont métabolisés beaucoup plus lentement et leur affinité pour les récepteurs aux GC est accrue.



**Fig. 1.21.** Relations structure-activité des minéralo- et des gluco-corticoïdes (selon Schorderet, 2002)

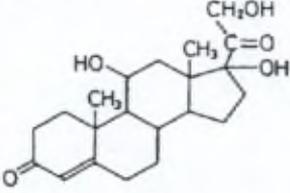
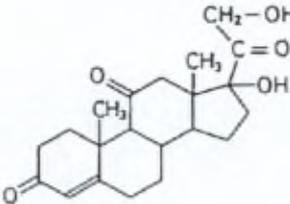
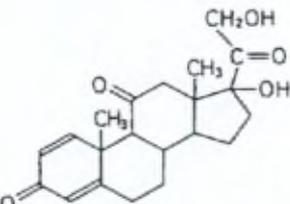
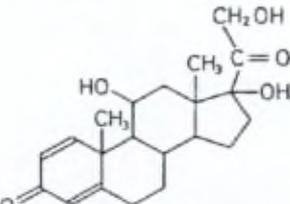
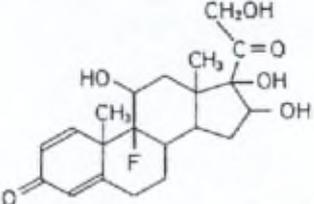
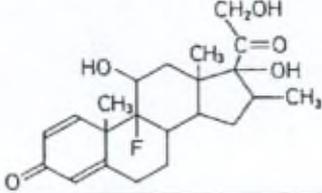
L'activité biologique relative des corticostéroïdes synthétiques peut être considérée en termes anti-inflammatoires (traditionnellement considérés comme l'activité glucocorticoïde) et en termes de rétention de sodium par les reins (représentant l'activité minéralocorticoïde). L'activité des GC et des MC synthétiques dépend des éléments suivants (cf. Fig. 1.21) :

- ◆ les oxygènes en C3 et en C20 ;
- ◆ la double liaison en C4–C5 ;
- ◆ le radical hydroxyle en C11 ;
- ◆ le radical hydroxyle en C17 (sa présence augmente l'activité GC et diminue l'activité MC).

Quant à l'hydroxylation en C21, elle est nécessaire à l'activité globale des GC et des MC. Par conséquent, toute modification de l'un ou l'autre de ces sites entraîne la perte de l'activité biologique. Cette activité peut être artificiellement modifiée, soit dans le sens d'une plus grande activité anti-inflammatoire (B), comme par exemple pour la dexaméthasone, soit dans le sens d'une activité MC (C).

La puissance relative des effets anti-inflammatoires et minéralocorticoïdes des principaux agonistes naturels et synthétiques de type GC est indiquée dans la **Fig. 1.22** en prenant comme unité de référence une hormone naturelle, le cortisol. La plupart des corticostéroïdes synthétiques sont des dérivés alcools relativement insolubles dans l'eau. Ils sont souvent utilisés sous forme de sels de sodium d'esters d'acide phosphorique ou succinique qui sont rapidement hydrolysés dans l'organisme.

Une monographie de la dexaméthasone est présentée à la fin de l'INTRODUCTION (1.8).

Agonistes	Activité glucocorticoïde:		Activité minéralocorticoïde: rétention de sodium
	anti-inflammatoire	néoglycémique (foie)	
cortisol (hydrocortisone)	1	1	1
			
cortisone <sup>1</sup>	0.8	0.8	0.8
			
prednisone <sup>1</sup>	3.5	3.5	<1
			
prednisolone	4.5	4.5	<1
			
triamcinolone	5	5	~ 0
			
dexaméthasone	30	30	~ 0
			

**Fig. 1.22.** Activités gluco- et minéralo-corticoïde du cortisol et de ses analogues naturels et synthétiques chez l'homme (selon Schorderet, 2002).

### **1.8.6.2      *Aspects pharmacocinétiques des corticoïdes***

Les corticostéroïdes sont faiblement absorbés par le tube digestif, ainsi qu'au départ de leurs multiples sites d'administration locale. Les formes hydrosolubles peuvent être administrées par voie i.v. pour obtenir des réponses rapides ; les formes liposolubles injectées par voie i.m. provoquent des effets prolongés.

Les corticostéroïdes se distribuent rapidement dans tous les tissus. Ils traversent le placenta et sont excrétés en petite quantité dans le lait maternel. Dans la circulation, les corticostéroïdes sont fortement liés aux protéines plasmatiques, surtout aux globulines, y compris la transcortine. Cependant, les corticostéroïdes synthétiques sont moins fortement liés que le cortisol. Les corticostéroïdes sont métabolisés majoritairement, mais pas exclusivement, dans le foie. Ils sont excrétés par voie urinaire.

### **1.8.6.3      *Principales indications des corticoïdes***

Elles sont détaillées dans le **Tableau 1.13**.

### **1.8.6.4      *Principaux effets indésirables des corticoïdes***

On sait depuis longtemps que les traitements corticoïdes prolongés sont toujours accompagnés d'effets indésirables, voire toxiques, et ne peuvent être envisagés que si leur rapport toxicité/effets bénéfiques est favorable au patient. Le **Tableau 1.14** énumère une série de ces effets secondaires (*Parfitt, 1999*).

**Tableau 1.13.** Principales indications des glucocorticoïdes par voie générale et (**en gras**) indications préférentielles de la dexaméthasone par voie i.v. ou orale.

Traitement de substitution de l'insuffisance surrénalienne (à doses physiologiques).

**Syndrome de sevrage alcoolique aigu.**

**Réactions allergiques graves, comme l'angio-œdème et l'anaphylaxie.**

Anémie hémolytique auto-immunitaire.

**Purpura thrombocytopénique idiopathique aigu.**

Vasculites auto-immunitaires, comme le syndrome de Behcet, la polymyalgie rhumatismale, l'artérite temporale, la polymyosite, et d'autres.

Lupus érythémateux disséminé.

Arthrite rhumatoïde.

**Uvéite postérieure, endophtalmie.**

Maladies inflammatoires de l'intestin : maladie de Crohn, recto-colite ulcéro-hémorragique.

Infection helminthique, trichinose, réaction d'Herxheimer, méningite tuberculeuse (en association avec une chimiothérapie antiparasitaire ou anti-infectieuse appropriée).

Néphrite lupique, nombreux types de glomérulonéphrites aiguës et chroniques, syndrome néphrotique.

Hépatite chronique active auto-immunitaire.

Syndrome de Guillain-Barré.

**Œdème cérébral de diverses origines (cancer primitif, métastases, malaria, maladie de l'altitude).**

**Status epilepticus.**

**Nausées et vomissements, en particulier lors des chimiothérapies anticancéreuses (en association avec les sétrons ou le métoclopramide).**

Asthme non contrôlé par les corticostéroïdes en inhalation.

Pneumonie interstitielle, BOOP (bronchiolitis obliterans organizing pneumonia).

Sarcoïdose.

**Détresse respiratoire aiguë du nouveau-né, dysplasie bronchopulmonaire, croup.**

Hirsutisme.

Pemphigus, pemphigoïde.

**Chimiothérapie anticancéreuse pour la leucémie lymphoblastique aiguë, le myélome multiple (en association avec d'autres médicaments).**

Immunosuppression, par exemple en cas de greffe d'organe (en association avec d'autres médicaments).

**Tableau 1.14.** Principaux effets indésirables des glucocorticoïdes.

<i>Catégorie</i>	<i>Exemples</i>
Musculaires	Faiblesse musculaire Réduction de la masse musculaire Myopathie cortisonique
Osseux	Ostéoporose Fractures et tassements vertébraux Nécrose aseptique des têtes fémorales et humérales
Cardiovasculaires	Réactions d'hypersensibilité, collapsus cardiovasculaire (à hautes doses par voie i.v.) Syndrome de lyse tumorale Syndrome d'hypercoagulabilité, risques de thrombi emboliques
Gastro-intestinaux	Ulcères et oesophagite peptique Pancréatite aiguë
Dermatologiques	Retard de cicatrisation Peau mince et fragile Pétéchies et ecchymoses Erythème facial Sudation excessive (hyperhydrose)
Neurologiques	Hypertension intracrânienne Convulsions Céphalées
Endocriniens	Syndrome cushingoïde (surtout à doses élevées) Retard de croissance et de puberté Inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire-corticosurrénal, provoquant une atrophie surrénalienne et une insuffisance surrénale aiguë en période de stress Intolérance aux hydrates de carbone, déclenchement d'un diabète, augmentation des besoins en insuline chez le diabétique
Ophthalmologiques	Cataracte Augmentation de la pression intraoculaire, glaucome, exophtalmie
Métaboliques	Bilan azoté négatif, fonte musculaire Augmentation de l'appétit
Infectieux	Susceptibilité élevée à certaines infections (tuberculose, virus, parasites) Atténuation ou disparition des signes infectieux (température, douleur, inflammation), retardant le diagnostic et le traitement Aggravation d'une varicelle
Psychologiques	Modifications de l'humeur Psychoses maniaques et/ou dépressives

NB. Les principaux effets indésirables des minéralocorticoïdes comprennent une rétention excessive d'eau et de sodium accompagnée d'œdèmes et d'hypertension, voire l'induction d'une insuffisance ou d'une décompensation cardiaque chez les personnes prédisposées, ainsi qu'une alcalose hypokaliémique.

La quasi-totalité des effets secondaires peut s'expliquer par les propriétés biologiques des GC et notamment par la très grande diversité des cellules qui y sont sensibles. La relation entre la dose administrée et les effets indésirables est parfaitement démontrée. Ainsi, les troubles psychiques graves ne sont observés que pour des doses très élevées de corticoïdes.

#### **1.8.6.5 Problèmes liés aux traitements prolongés aux corticoïdes**

Lors d'un traitement aux corticoïdes, on peut être confronté à :

1. Une corticodépendance, qui se manifeste parfois lors d'une tentative de sevrage. Dans ce cas, lorsqu'un patient arrête son traitement, les symptômes de la maladie réapparaissent assez rapidement. La majorité des patients asthmatiques sont corticodépendants (*Michel & Chanez, 1996*).
2. Une corticorésistance. Un asthmatique est dit résistant aux corticoïdes si, après l'administration de doses croissantes, aucun effet d'amélioration n'est observé. Quelques hypothèses ont été émises afin de tenter d'expliquer ce phénomène mais aucune n'a pu être vérifiée (*Barnes, 1995*). Citons :
  - ◆ la présence d'antagonistes compétitifs se liant aux récepteurs des GC en formant des complexes inactifs ;
  - ◆ la diminution du nombre de récepteurs aux GC ;
  - ◆ le découplage ou l'inactivation du complexe stéroïde-récepteur ;
  - ◆ et la réduction de la demi-vie du corticoïde.

#### **1.8.6.6 Les glucocorticoïdes dans le traitement de l'asthme**

La plupart des effets des GC sur les phénomènes inflammatoires et immunitaires tels que décrits plus haut expliquent leurs effets bénéfiques dans le traitement de l'asthme bronchique, une maladie allergique quasi épidémique (*McFadden, 2001*). L'asthme se caractérise par la triade suivante :

1. une forte inflammation des voies aériennes induite par le conflit allergène-IgE ;
2. une hypersécrétion muqueuse ;

3. une hyperréactivité de la musculature lisse des bronches à des stimuli non spécifiques (« hyperréactivité bronchique non spécifique »).

La bronchoconstriction intermittente provoque les symptômes majeurs de l'asthme : sifflements et difficultés respiratoires, souffle court et sensation d'écrasement du thorax. L'asthme est fréquent dans tous les pays du monde et affecte tous les âges.

Sans discuter l'ensemble de la physiopathologie de l'asthme, disons qu'elle repose sur des facteurs génétiques en relation avec l'allergie immédiate de type I et sur des facteurs environnementaux moins spécifiques comme les infections virales, la pollution ou le tabac (*Michel et al., 1997*). Le rôle de l'inflammation bronchique est fondamental, car cette inflammation est responsable de la sévérité immédiate de la maladie, de l'hyperréactivité non spécifique et de la dégradation bronchique irréversible qui survient après des années d'évolution. On comprend que les GC, qui agissent sur la plupart des composants de l'inflammation bronchique, soient devenus le traitement de fond reconnu de la maladie asthmatique (*British Thoracic Society, 1997 ; Barnes et al., 1998 ; Chavez et al., 2000*). Dans l'asthme, les GC réduisent l'activation et la sécrétion de cytokines par les cellules suivantes : les éosinophiles (qui vont jusqu'à subir une apoptose en réponse aux GC), les lymphocytes T, les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes. De plus, les GC diminuent l'activation des cellules épithéliales bronchiques elles-mêmes (ces cellules libèrent de cytokines et expriment des molécules d'adhésion), des cellules endothéliales (qui participent à l'augmentation de la perméabilité capillaire dans l'asthme) et des cellules musculaires lisses. Dans ces dernières, les GC augmentent aussi l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, améliorant par là le traitement bronchodilatateur avec les  $\beta_2$ -mimétiques inhalés (*Barnes, 1995*). Enfin, les GC réduisent la sécrétion de mucus par les glandes bronchiques.

#### **1.8.6.7 Les glucocorticoïdes en inhalation**

Les GC ont des effets indésirables sérieux et dose-dépendants mais ils restent indispensables dans le traitement de l'asthme. Cette dualité explique la mise au point de nouveaux corticoïdes destinés à être utilisés exclusivement par voie d'inhalation (*Barnes, 1995*). Ces composés ont été développés comme des molécules à effet local, c'est-à-dire des corticoïdes « topiques » ou « de contact » (*Brattsand et al., 1982 ; Check & Kaliser, 1990*). Initialement, lorsque la dexaméthasone a été synthétisée et que son activité topique (sous forme de phosphate) s'est révélée huit fois plus intense que celle du cortisol, elle a été essayée

en inhalation (*Bickermann & Itkin, 1963*). Son efficacité anti-asthmatique était évidente, mais ses effets systémiques aussi, vraisemblablement en raison d'une absorption transbronchique (*Siegel et al., 1964*). Dès lors, dans les années suivantes, de nouveaux GC ont été synthétisés qui possédaient une forte activité topique, une faible absorption par voie bronchique, et une métabolisation rapide en dérivés inactifs lors de leur passage dans la circulation. Le premier de ces composés était le dipropionate de béclo méthasone (*Maberly et al., 1973*), commercialisé en 1976.

D'autres ont suivi. La puissance des différents corticoïdes actuellement utilisés en inhalation dans le traitement de l'asthme est variable ; elle croît de la façon suivante : flunisolide < béclo méthasone < budésonide < fluticasone. Cependant, les différences d'efficacité aux doses recommandées sont minimes (*Kelly, 1998*). Un avantage de la fluticasone serait de réduire la fréquence d'administration et par là d'améliorer la compliance, un paramètre crucial des traitements prophylactiques prolongés.

De nombreuses études comparatives ont montré que l'inhalation de GC à doses adéquates, même en cas d'asthme modéré ou débutant, induisait les événements suivants (*Chavez et al., 2000*) :

- ◆ Une réduction de la dose quotidienne, voire un sevrage total, des GC oraux.
- ◆ Une réduction de la consommation de  $\beta_2$ -mimétiques à courte durée d'action (exemple : salbutamol).
- ◆ Une diminution des symptômes quotidiens et des épisodes de bronchospasme aigus.
- ◆ Une amélioration objective de la fonction respiratoire évaluée par le VEMS (volume expiratoire maximal dans la première seconde) et le DEP (débit expiratoire de pointe), ainsi qu'une amélioration de l'hyperréactivité bronchique non spécifique.
- ◆ Une amélioration des indices de qualité de vie.

Il n'est pas totalement prouvé que les GC inhalés réduisent la mortalité de l'asthme ou qu'ils ralentissent le déclin à long terme de la fonction respiratoire, mais plusieurs indices vont dans ce sens.

Cependant, on constate qu'un nombre non négligeable de patients asthmatiques ne sont pas suffisamment contrôlés par les GC en inhalation. Ces patients doivent augmenter les doses de GC inhalés ou passer à un traitement aux GC par voie orale, s'exposant ainsi à des

effets indésirables plus sérieux. En particulier, à doses élevées, l'utilisation de corticoïdes inhalés s'accompagne d'un certain nombre de problèmes :

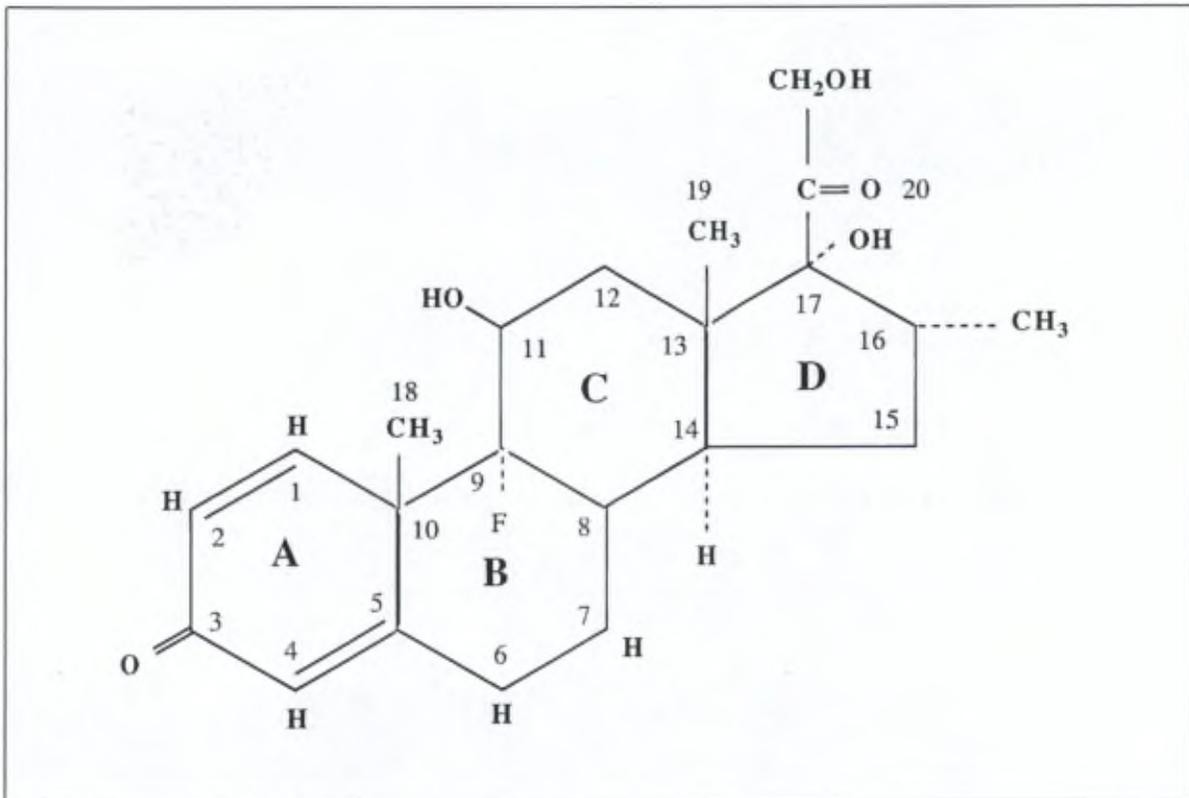
- ◆ La technique d'administration ne permet pas d'éviter le dépôt d'une grande partie des principes actifs, souvent même la majorité, dans l'oropharynx, provoquant un passage systémique rapide et des effets secondaires locaux tels qu'une contamination par le *Candida albicans* et une voix rauque (*Kim et al., 1987*).
- ◆ Les effets secondaires systémiques des GC inhalés à forte dose ne sont pas absents (*Barnes, 1995 ; Kamada et al., 1996*). On peut constater notamment un retard de la croissance chez les enfants (*Foucard, 1996*) et une élévation de la pression intraoculaire (*Garbe et al., 1997*).
- ◆ Enfin, l'effet anti-asthmatique des corticoïdes inhalés paraît encore insuffisant en terme de durée d'action (plusieurs prises par jour sont parfois nécessaires) et de « guérison » de la maladie. Cela est probablement dû à leur temps de séjour relativement court dans les poumons.

On comprend dès lors pourquoi la recherche d'un meilleur corticoïde à visée pulmonaire se poursuit. L'idée d'administrer des GC liposomaux en inhalation s'inscrit dans cette optique (*Suntres & Shek, 1998*). Divers essais ont déjà été réalisés chez les animaux (cf. Tableau 1.3), et l'innocuité chez l'homme du dipropionate de bécloéthasone liposomal a été démontrée (*Waldrep et al., 1997 ; Saari et al., 1998*). Mais pour qu'une préparation liposomale de dexaméthasone se révèle intéressante dans ce domaine, il faudra prouver que son action intrapulmonaire est plus prolongée que celle des GC en inhalation actuels, et surtout que son passage systémique est suffisamment faible pour ne pas provoquer d'effets indésirables significatifs, comme une inhibition de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Cet objectif dépasse le cadre du présent travail, qui se contentera de caractériser une préparation liposomale de dexaméthasone potentiellement intéressante.

## 1.9 Monographie de la dexaméthasone

### 1.9.1 Origine

La dexaméthasone (DXM) est un corticostéroïde à longue durée d'action apparu en 1959. Sa formule développée est présentée dans la **Fig. 1.23**. Ses caractéristiques sont décrites dans le « Martindale » (*Parfitt, 1999*).



**Fig. 1.23.** Formule développée de la dexaméthasone.

### 1.9.2 Propriétés physico-chimiques

Nom chimique :  $9\alpha$ -fluoro- $16\alpha$ -méthylprednisolone

Formule développée : **Fig. 1.23.**

Formule brute :  $C_{22}H_{29}FO_5$

Masse moléculaire : 392.5 (g/mol)

Etat : Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, inodore.

**Solubilité :** Pratiquement insoluble dans l'eau  
Assez soluble dans l'alcool et l'acétone  
Peu soluble dans le chloroforme et le dichlorométhane  
Très peu soluble dans l'éther

La solubilité maximale de la DXM dans du tampon phosphate à pH = 7,4 et isotonique ( $\lambda$  : 239 nm,  $\epsilon$  : 15150) est de 60  $\mu\text{g/ml}$ .

**Point de fusion :** ~ 253 °C

**Stabilité :** Les préparations de DXM sont généralement stockées à une température < 40 °C, préférentiellement entre 15 et 30 °C.

### **1.9.3 Propriétés pharmacodynamiques**

La DXM se lie de façon réversible au récepteur cytoplasmique aux glucocorticoïdes (GC), ce qui résulte dans son activation et sa translocation dans le noyau. Le récepteur aux GC inactif est complexé à diverses protéines dont les heat-shock proteins HSP90. Dans le noyau, le récepteur aux GC activé par la DXM se lie à des séquences spécifiques de l'ADN et induit ou réprime l'expression de nombreux gènes. La DXM inhibe la réponse inflammatoire aux agents chimiques, immunologiques ou mécaniques. Les actions antiinflammatoires de la DXM sont complexes et comprennent l'activation des lipocortines, protéines qui inhibent la phospholipase A<sub>2</sub>, et donc la biosynthèse des médiateurs de l'inflammation provenant de l'acide arachidonique, tels que les prostaglandines et les leucotriènes. La DXM inhibe l'œdème, les dépôts de fibrine, l'augmentation de la perméabilité capillaire et la migration des leucocytes et des phagocytes qui caractérisent la réponse inflammatoire. La DXM réduit également la prolifération capillaire et fibroblastique, ainsi que le dépôt de collagène et la formation des cicatrices. De plus, la DXM diminue les réponses immunitaires contre l'infection.

### **1.9.4 Propriétés pharmacocinétiques**

La DXM est très bien absorbée par le tube digestif et par les autres sites d'administration locale. Son volume de distribution est de 2 L/kg. La DXM est le prototype du glucocorticoïde à très longue durée d'action, avec une demi-vie biologique qui dépasse un

jour et demi (34 à 54 h) et une demi-vie plasmatique de l'ordre de 200 minutes. Sa liaison aux protéines plasmatiques est légèrement inférieure à celle des autres GC. La DXM est métabolisée principalement dans le foie, mais aussi dans d'autres tissus. Elle est excrétée essentiellement par le rein. Jusqu'à 65 % de la dose est éliminée dans les urines en 24 heures, dont 60 % sous forme de 6- $\beta$ -hydroxy-dexaméthasone et 5 % sous forme de 6- $\beta$ -hydroxy-20-dihydrodexaméthasone.

### **1.9.5 Propriétés pharmacologiques**

La DXM est un glucocorticoïde de synthèse 30 fois plus puissant que le cortisol. Sept cent cinquante  $\mu$ g de DXM sont équivalents en activité antiinflammatoire à 5 mg de prednisolone. La DXM a très peu d'effets minéralocorticoïdes ; elle est utilisée principalement comme agent antiinflammatoire ou immunosuppresseur. Elle peut être utilisée sous forme d'alcool libre ou l'un des ses esters en position 21 (acétate, isonicotinate, phosphate, méthylsulfobenzoate, palmitate). Ces esters sont varisemblablement hydrolysés dans les tissus cibles pour libérer la molécule active.

Par voie générale (orale ou i.v.), la DXM est particulièrement indiquée dans les affections suivantes : réactions anaphylactiques, croup, insuffisance respiratoire aiguë du nouveau-né, dysplasie bronchopulmonaire, status epilepticus, syndrome de sevrage alcoolique aigu, purpura thrombocytopénique idiopathique, anémie hémolytique auto-immunitaire, uvéite postérieure, endophtalmite, œdème cérébral de diverses causes, nausées et vomissements dans les chimiothérapies anticancéreuses, certains cancers. La DXM est également largement utilisée par voie locale, par exemple en injections intra-articulaires et intra-bursiques, en lavement rectal, en solution ophtalmique, et en divers usages dermatologiques externes.

Ses effets indésirables sont ceux des corticostéroïdes en général. La DXM entraîne très peu de rétention hydrosodée. Par voie générale, elle peut provoquer des ulcères gastro-intestinaux, une pancréatite aiguë, des troubles de la cicatrisation, une cataracte et une négativation de la balance azotée par catabolisme protidique.

### **1.9.6 Dosage**

Par voie orale, la DXM est utilisée à des doses initiales de 0,5 à 10 mg par jour. Elle est aussi utilisée dans le test de suppression pour le diagnostic du syndrome de Cushing.

### **1.9.7 Le palmitate de dexaméthasone (DMP)**

Le 21-palmitate de dexaméthasone est un ester de DXM qui est clivé en molécule active (DXM) par les estérases, qui sont présentes dans la plupart des tissus et sont notamment abondantes dans le poumon. De nombreux esters de DXM, dont les propriétés de solubilisation et de stabilité diffèrent de celles de la molécule-mère, sont déjà utilisés, ou ont été testés, à des fins thérapeutiques. Il s'agit la plupart du temps d'esters en position 21.

Dans le cas qui nous occupe, le choix du palmitate a été dicté par la volonté de réaliser une prodrogue lipophile de la DXM qui s'insère le mieux possible dans la membrane de liposomes. Le DMP a déjà été choisi, il y a plusieurs années, par un groupe de chercheurs japonais afin de réaliser une combinaison dexaméthasone-lipides sous forme d'émulsion (*Mizushima et al., 1982 ; Yokoyama et al., 1985*). Cette combinaison, commercialisée sous le nom de Limethason<sup>®</sup> par Welfide Corp. (Osaka, Japan), semble présenter des propriétés intéressantes aussi bien par voie intraarticulaire (*Hoshi et al., 1985*) qu'intraveineuse (*Ohga et al., 1994 ; Yoshikawa et al., 2000*).

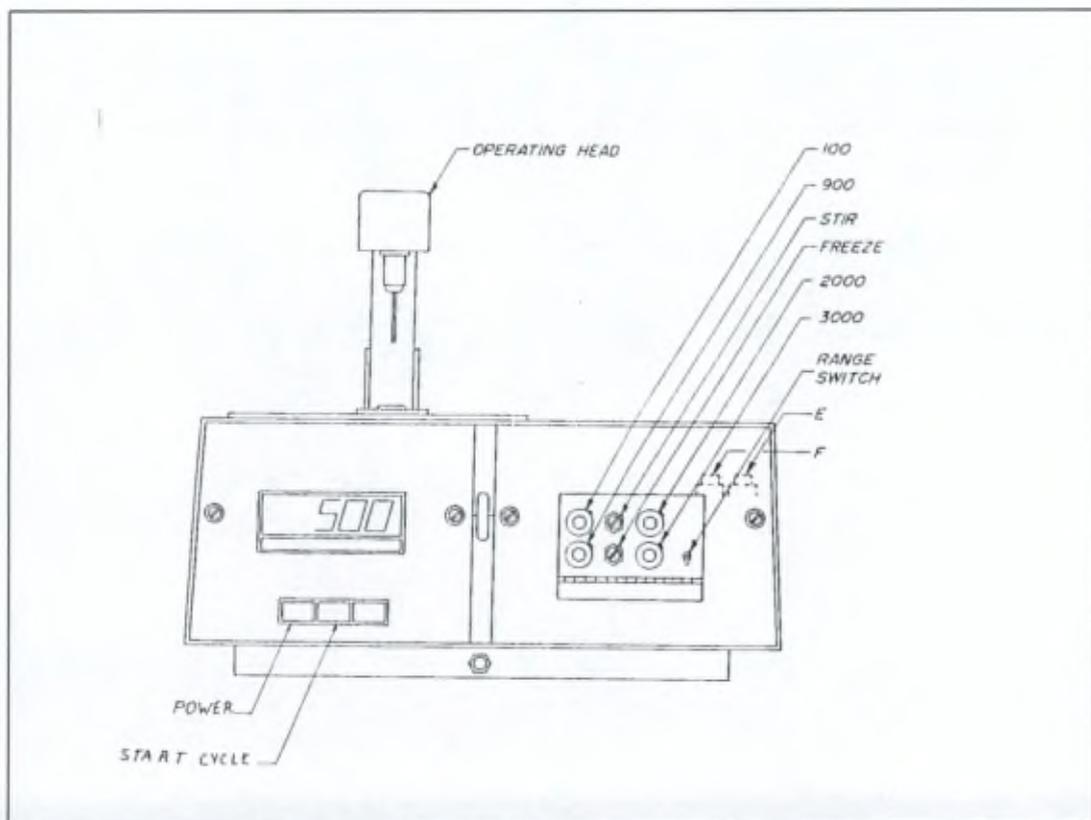
La caractérisation physico-chimique du DMP sera développée dans la partie RESULTATS ET DISCUSSION.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Appareils

#### 2.1.1 Osmomètre

Un **osmomètre de Fiske** (Fiske Associates, Burlington, USA) a été utilisé (**Fig. 2.1**). L'osmomètre a pour but de mesurer l'osmolalité, c'est-à-dire le nombre de particules osmotiquement actives d'une solution. Cette mesure est donnée directement par l'appareil de Fiske en milliosmoles par kg d'eau (mOsmol/kgH<sub>2</sub>O), unité de concentration osmotique des liquides biologiques.



**Fig. 2.1.** Osmomètre de Fiske (d'après : Fiske Associates, Burlington, USA).

### 2.1.1.1 *Principe*

Le principe de l'osmomètre est basé sur la mesure de l'abaissement cryoscopique des solutions (point de congélation), qui est directement lié au nombre d'entités ou molécules de solutés dissoutes (osmotiquement actives) dans un nombre donné d'entités de solvant. On sait que l'abaissement de la température de congélation du solvant provoqué par la dissolution d'une mole de soluté (soit le nombre d'Avogadro d'entités) dans 1 kilogramme d'eau est de 1,858 °C.

L'appareil de Fiske est entièrement automatique. L'introduction de l'échantillon est immédiatement suivie d'un refroidissement rapide avec une légère agitation, afin de réduire les gradients de température. Lorsque la température atteint 0 °C, la vitesse de refroidissement diminue jusqu'à ce que l'échantillon soit suffisamment super-refroidi (état métastable où la solution reste liquide en-deçà de son point de congélation). A ce moment, l'échantillon est agité vigoureusement et gèle. L'énergie libérée par la fusion des cristaux augmente la température de la solution jusqu'à son point de congélation. L'équilibre thermique gel-dégel est atteint précisément et la mesure de l'osmolalité se réalise sur ce plateau constant. Il n'y a aucune intervention manuelle lors de cette mesure.

Pour optimiser les mesures, l'appareil doit être étalonné à l'aide d'une solution de NaCl de référence de 300 mOsmol/kgH<sub>2</sub>O. Si l'appareil donne une valeur trop éloignée, il doit être calibré avec les standards disponibles, qui étaient dans le cas présent de 100, 900, 2000 et 3000 mOsmol/kgH<sub>2</sub>O. En pratique, l'étalonnage est réalisé avec deux de ces solutions, choisies de telle façon qu'elles encadrent la solution à analyser. Dans notre cas, l'osmolalité de l'échantillon est d'environ 300 mOsmol/kgH<sub>2</sub>O. Nous utilisons donc les standards de 100 et 900 mOsmol/kgH<sub>2</sub>O.

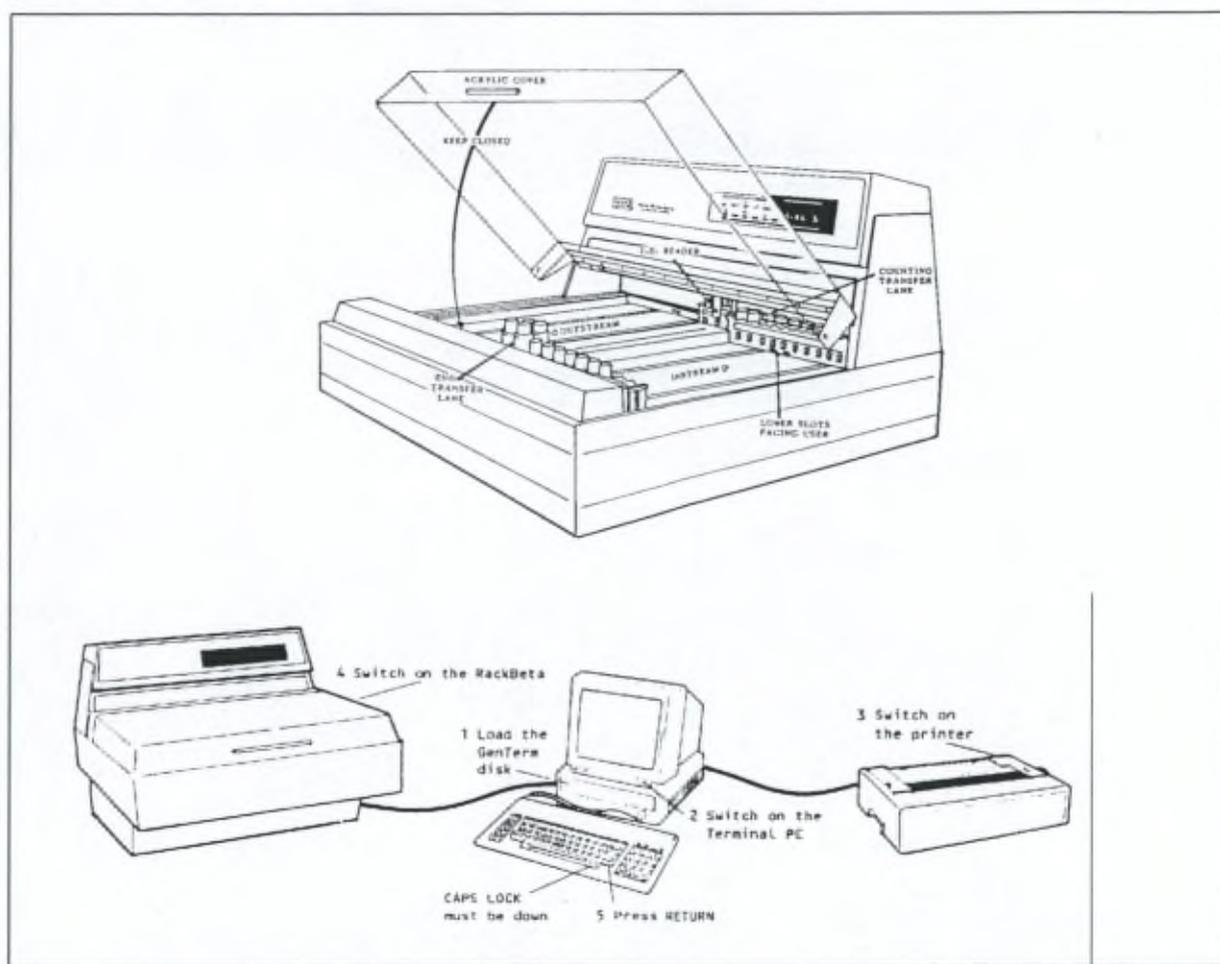
On peut ajuster l'osmolalité d'une solution à la valeur requise en ajoutant du NaCl, sachant qu'une solution à 0.9 g dans 100 ml d'eau présente une osmolalité 300 mOsmol/kgH<sub>2</sub>O.

## **2.1.2 Compteur bêta**

### **2.1.2.1 Aspects pratiques**

Le compteur à scintillation liquide ou compteur bêta est une technique commune de détection de la radioactivité des émetteurs  $\beta$  de faible énergie comme le  $^3\text{H}$  ou le  $^{14}\text{C}$ , largement utilisés dans la recherche biomédicale en tant que marqueurs radioactifs.

Le compteur bêta qui a été utilisé est un (LKB modèle 1214Radiometer Danemark) (Fig. 2.2).



**Fig. 2.2.** Le compteur à scintillation LKB 1214 (Radiometer Danemark).

Le LKB 1214 est un détecteur à scintillation qui mesure la radioactivité de solutions dans un cocktail scintillant, au moyen d'un tube photomultiplicateur. Le cocktail scintillant convertit l'énergie apportée par le rayonnement  $\beta$  en impulsions lumineuses mesurables par la photocathode du tube photomultiplicateur. Cette photocathode transforme les impulsions lumineuses en impulsions électriques. La chaîne de dynodes du tube photomultiplicateur amplifie ces impulsions d'un facteur 100, approximativement. On obtient une mesure en « coups par minute » (cpm).

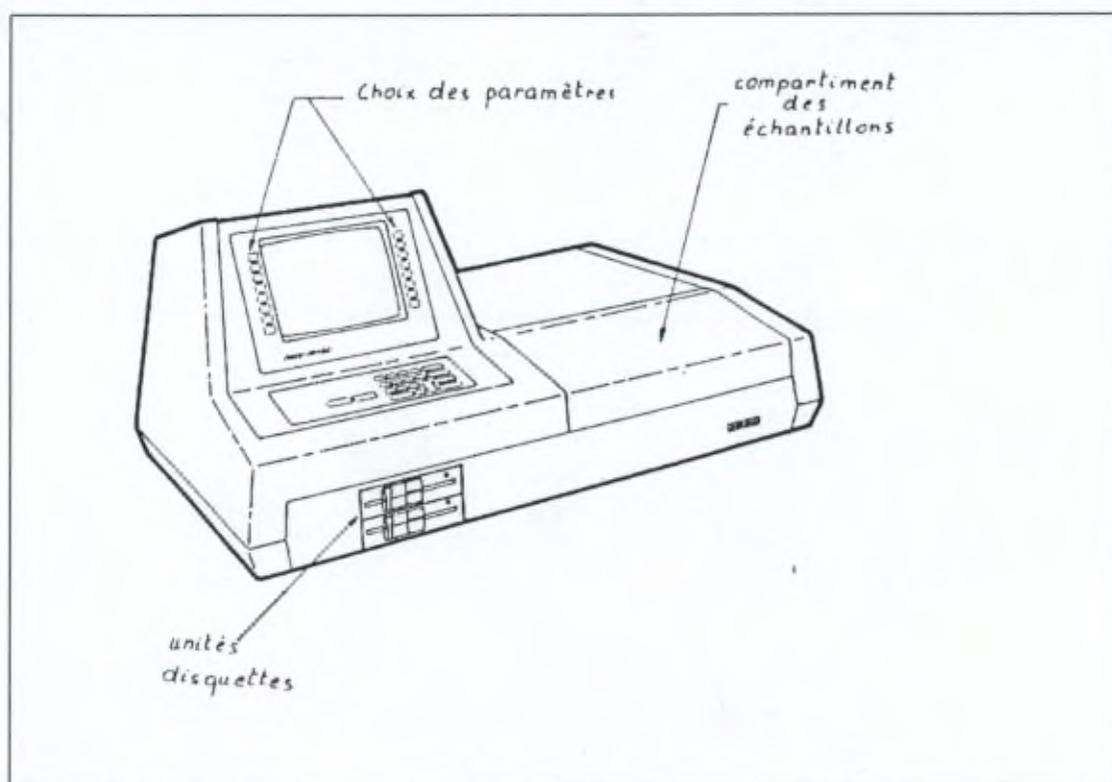
L'électronique de l'appareil comprend une haute tension réglable qui alimente, par l'intermédiaire d'une chaîne de résistances, à la fois les dynodes du tube photomultiplicateur, un préamplificateur (adaptateur d'impédance), un amplificateur linéaire et un analyseur multicanaux complet. Le compteur bêta LKB modèle 1214 est contrôlé automatiquement par ordinateur et fonctionne avec une méthode de standardisation dite externe. Elle est basée sur un pré-étalonnage donnant une courbe de rendement du  $^3\text{H}$  (ou du  $^{14}\text{C}$ ) en fonction de la mesure d'une source d'énergie continue. Cette méthode de standardisation permet de tenir

compte des agents « quencheurs » qui diminuent le rendement de scintillation dans la solution. En intégrant la courbe de pré-étalonnage dans le calcul, on peut obtenir directement des mesures en « dpm » (désintégrations par minute). Ceci n'est généralement pas nécessaire dans les expériences de biochimie telles que celles pratiquées dans le présent travail.

### 2.1.3 Spectrophotomètre d'absorption

#### 2.1.3.1 Aspects pratiques

Un spectrophotomètre d'absorption moléculaire dans le visible et l'ultraviolet (Spectromètre UV-VIS Response TM, Gilford, Pennsylvanie USA) a été utilisé (**Fig. 2.3**).



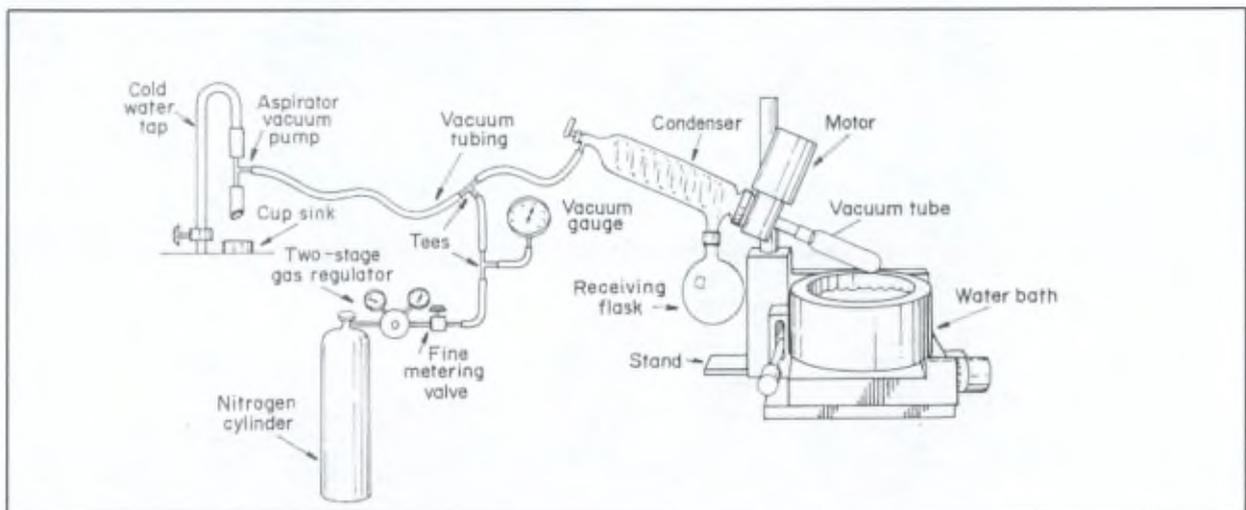
**Fig. 2.3.** Le Spectromètre UV-VIS Response TM de Gilford Pennsylvanie USA

Le spectromètre utilisé est un spectromètre à simple faisceau qui possède deux sources lumineuses : une lampe à filament de tungstène qui donne un spectre continu dans le domaine du visible (850 à 350 nm), et une lampe à décharge à deutérium avec fenêtre en quartz qui donne un spectre continu dans l'ultraviolet (350 à 200 nm). Un miroir pivotant permet d'envoyer soit de la lumière visible, soit de la lumière UV vers un monochromateur équipé

d'un réseau qui décompose le faisceau polychromatique en un certain nombre de faisceaux monochromatiques. Ceux-ci seront envoyés vers la cuvette contenant la solution à analyser. Le détecteur est constitué par une cellule photoélectrique qui mesure l'intensité de la lumière transmise par la cuvette contenant le blanc. L'appareil se place alors au zéro d'absorbance. Les lectures suivantes pour les solutions à analyser permettront de déterminer directement l'absorbance de la substance dissoute.

### 2.1.4 Evaporateur rotatif

Les films lipidiques pour la constitution des liposomes ont été préparés sous atmosphère d'azote dans un ballon relié à un évaporateur rotatif **Rotavapor™** (Büchi), selon le schéma présenté dans la **Fig. 2.4**.



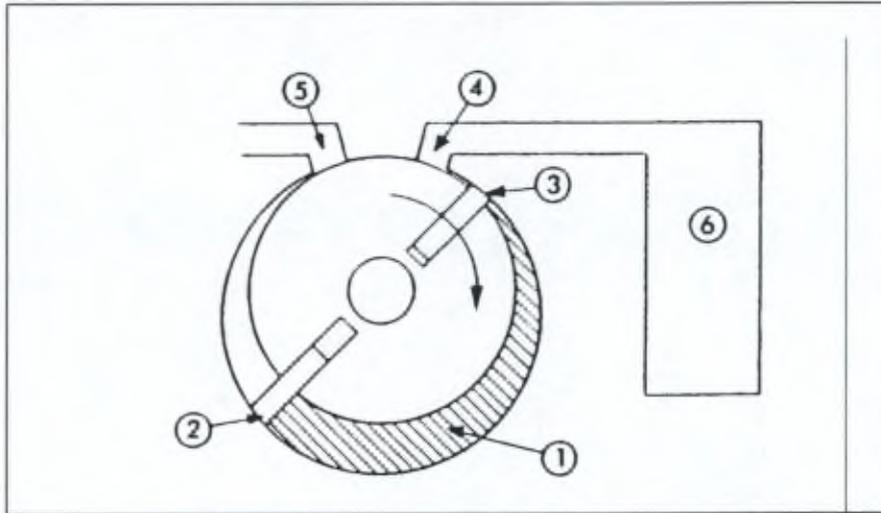
**Fig. 2.4.** Schéma du montage de l'évaporateur rotatif Rotavapor™ pour éliminer le solvant organique et constituer le film lipidique destiné à la préparation des liposomes. Ce schéma est tiré de *New, 1990*.

Les ingrédients et le solvant pour la constitution des liposomes sont introduits dans le ballon du Rotavapor™ qui est placé dans le bain à 32 °C (température choisie en fonction du Tc des constituants – cf. INTRODUCTION) et mis en rotation. Le ballon est ensuite rempli d'azote et la pression y est diminuée par paliers grâce à une pompe à vide décrite ci-dessus, jusqu'à une pression de 165 mmHg. Celle-ci sera maintenue jusqu'au lendemain afin d'éliminer toute trace de solvant. Le film lipidique qui s'est formé sur les parois du ballon sera réhydraté avec du PBS (phosphate-buffered saline) en présence de quelques billes de

verre, grâce à une agitation au vortex. Après une incubation d'environ une heure, des liposomes MLV se seront ainsi créés.

### 2.1.5 Pompe à vide

Une pompe à vide **Welch, modèle 1402** (Fig. 2.5), a été utilisée pour évaporer les traces de solvants organiques des films lipidiques.



**Fig. 2.5.** Pompe à vide Welch, modèle 1402 (schéma du fabricant)

Le principe d'une pompe à vide est d'enlever régulièrement une partie du volume initial d'un gaz contenu dans un système clos, à l'aide d'éléments rotatifs qui successivement augmentent et diminuent un espace donné. L'action de la pompe crée un espace croissant hermétique et sous vide vers lequel le gaz est poussé, en raison de la différence de pression entre l'espace créé et le raccord d'admission (n° 4 dans la Fig. 2.5). Le gaz pris au piège entre les vannes (n° 2 et 3) est comprimé puis expulsé par le conduit d'échappement (n° 5) découvert lors du mouvement des vannes.

L'augmentation et la diminution d'espace constituent un cycle du processus. A chaque cycle, la quantité de gaz résiduelle dans le système clos (n° 6) diminue ; le gaz se dilate et la pression se réduit. Après un fonctionnement prolongé, un équilibre est atteint qui résulte de la somme des pertes inévitables dues aux joints, contrebalancée par la capacité de la pompe à maintenir une pression constante dans le système.

La pompe à vide Welch, modèle 1402 est une pompe à deux étages qui permet d'atteindre des pressions de vide de  $10^{-4}$  torr.

### 2.1.6 Manomètre à mercure

Un manomètre a été fabriqué pour les besoins du travail en utilisant un tube en verre en forme de U rempli de mercure. Une des extrémités est laissée à l'air libre, l'autre est raccordée au ballon. La mesure du vide à l'intérieur du ballon sera fonction du déplacement du mercure par rapport à la position initiale, lorsque le mercure est au même niveau dans les deux branches du tube.

La hauteur engendrée par le déplacement du mercure par rapport à la position initiale, lorsque le manomètre est connecté au ballon, est notée  $H$  (en mètres). Elle est liée à la pression du vide et à la pression atmosphérique par la relation :

$$P_{atm} - P_{vide} = 2 \rho \cdot g \cdot H,$$

où  $P_{atm}$  = pression atmosphérique (en Pascal)

$P_{vide}$  = pression de l'enceinte (en Pascal)

$\rho$  = masse volumique du mercure, soit 13 540 kg/m<sup>3</sup>

$g = 9.81 \text{ m/s}^2$

On peut simplifier cette relation comme suit :

$$H_{atm} - H_{vide} = 2 H,$$

où  $H_{atm}$  = hauteur de Hg correspondant à la pression atmosphérique exprimée en mmHg

$H_{vide}$  = hauteur de Hg correspondant à la pression du vide exprimée en mmHg

$H$  = variation de hauteur de la colonne de Hg, exprimée en mm

### 2.1.7 Sonde à température

La sonde utilisée est le **thermocouple Pt 100** de Braun. Elle permet des mesures de température allant de -100°C à + 100°C.

### 2.1.8 Analyseurs de taille des particules

La taille des liposomes MLV obtenus a été mesurée par un analyseur de taille de particules «Coulter Counter LS130». Cet appareil fonctionne selon le principe de la diffraction de Fraunhofer. On mesure le diagramme directionnel de la lumière diffractée par les particules exposées au rayonnement laser (argon monochromatique, 482 nm). L'angle de diffraction est inversement proportionnel à la taille de la particule. Le diagramme est analysé par différents modèles mathématiques afin de caractériser la taille des liposomes. Les résultats sont exprimés en volume (%) et en nombre (%) de liposomes en fonction du diamètre de la particule ( $\mu\text{m}$ ).

Le Coulter Counter LS130 est entièrement automatique et informatisé. La dispersion liposomale est d'abord diluée dans du tampon phosphate jusqu'à une obturation comprise entre 10 et 13 %. Ce taux atteint, la mesure est lancée via le «run cycle». La mesure des tailles allant de 0.5 à 800  $\mu\text{m}$  se fait via 100 canaux de mesure, et un système optique spécial (PIDS) permet des mesures  $< 0.5 \mu\text{m}$ , jusqu'à une limite de 0.1  $\mu\text{m}$ . Tous les résultats sont ensuite enregistrés sur disquette pour un traitement statistique.

La taille des SUV a été mesurée sur un Malvern Zetasizer 3000 basé sur le principe de la spectrophotométrie à corrélation de photons (PCS – *photon correlation spectrometer*).

### 2.1.9 Désintégrateur ultrasonique

L'appareil, un MSE Soniprep 159, est composé d'un générateur et d'un transistor amplificateur qui fournit de l'énergie électrique à une fréquence de 23 Hz à un transducteur piézo-électrique. Ce dernier la convertit en énergie mécanique. Ensuite, il transmet les ultrasons par hautes fréquences de vibration, via une sonde. Nous avons utilisé une tête de sonication de Branson en titane. La sonde transmet l'énergie mécanique à l'échantillon (cf. Fig. 1.9 de l'INTRODUCTION). Son principal but est d'augmenter l'amplitude du transducteur à un niveau utilisable ou d'harmoniser le transfert de puissance acoustique. Le titane est le matériau requis au vu de ses avantages acoustiques, de sa haute résistance vis-à-vis de la corrosion et de l'érosion, et de son pouvoir inerte.

### **2.1.10 Hottes à flux laminaire**

L'utilisation de hottes à flux laminaire est essentielle pour l'exécution de tests de stérilité et autres opérations aseptiques. Ces appareils ont des caractéristiques particulières qu'il convient de décrire sommairement.

La création du flux laminaire est assurée par un groupe de ventilation et par la batterie des filtres absolus du groupe moto ventilateur. Ce dernier doit fournir un débit constant nécessaire pour permettre un déplacement du flux à la sortie des filtres de l'ordre de 0,5 m/s.

Les filtres conditionnent la qualité technique des flux laminaires : seuls seront retenus les éléments dont le diamètre est supérieur à celui des pores des filtres. Ces filtres absolus sont réalisés en papier de fibre de verre incombustible. Ils retiennent les particules de tailles supérieure ou égale à 0,3  $\mu\text{m}$ . Pour obtenir un écoulement laminaire du flux de sortie, une tôle perforée est placée au niveau de la face inférieure du panneau. A la sortie de la batterie filtrante, l'air dépoussiéré et exempt de particules pénètre dans l'enceinte de travail représentée par un volume cubique de dimensions variables selon les modèles.

Deux types différents d'enceintes sont utilisés dans les laboratoires de microbiologie :

1. Les hottes à flux horizontal, utilisées pour les manipulations qui ne réclament que la protection du produit : remplissage aseptique, préparation de milieu de culture, etc.
2. Les hottes à flux laminaire vertical, qui assurent la protection du produit manipulé en plus de celle du manipulateur.

Toutefois, le flux laminaire ne stérilise pas la surface de la hotte ou tout objet contaminé. Ceux-ci doivent être stérilisés à l'autoclave et la paillasse sera nettoyée avec l'isopropanol 70 %. Par conséquent, tout objet doit être stérile avant d'être introduit dans la hotte à flux laminaire.

Des hottes à flux laminaire vertical et horizontal Filtest™ ont été utilisées dans le présent travail.

### **2.1.11 Autoclave**

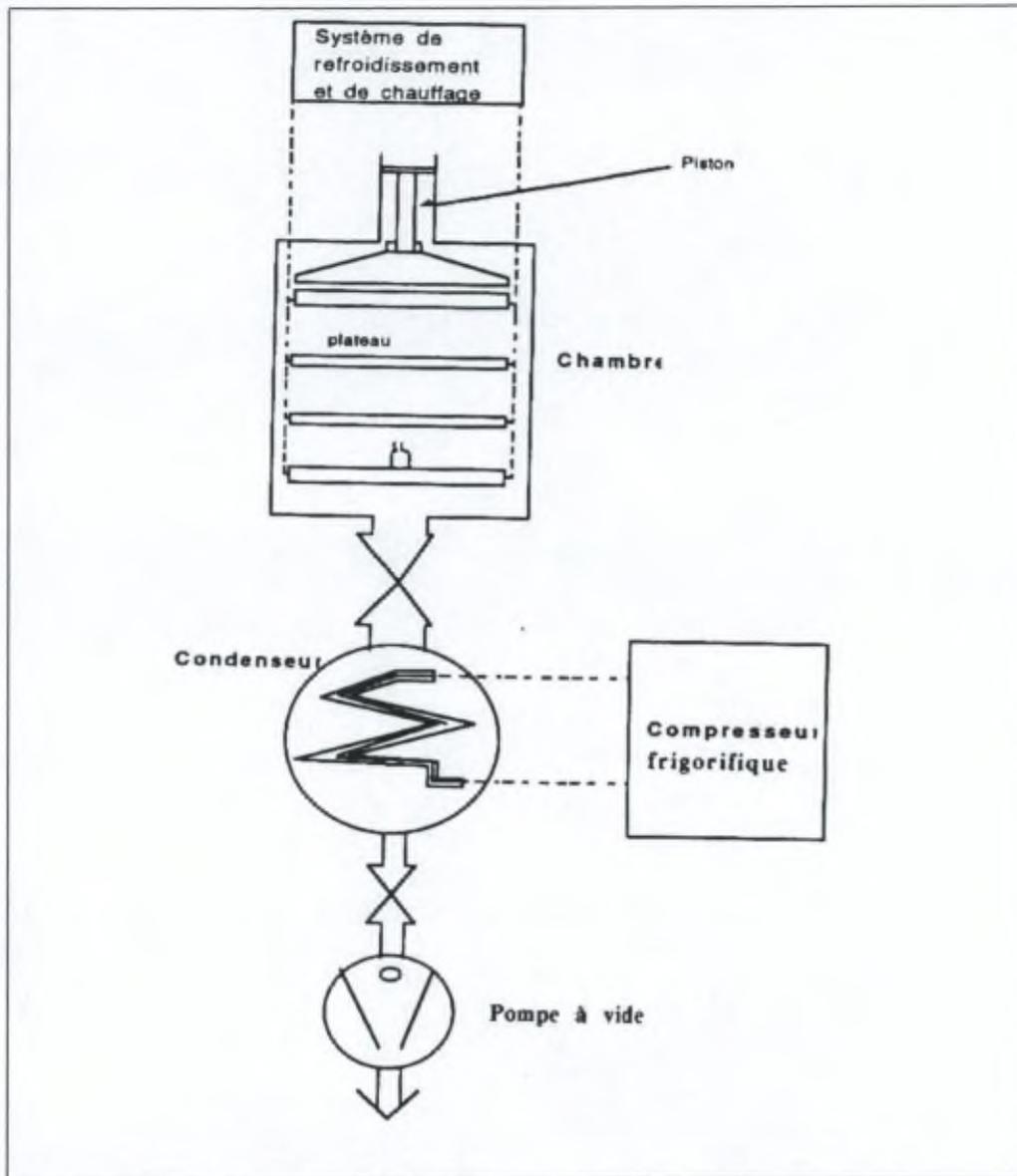
Récipient à parois épaisses et à fermeture hermétique pour réaliser sous pression la stérilisation à la vapeur ( $T^{\circ} = 121.1^{\circ}\text{C}$  ;  $t = 20$  min ; pression = 1 bar). L'autoclave Alpha (PBI International) a été utilisée dans ce travail.

### **2.1.12 Lyophilisateurs**

Le lyophilisateur est l'ensemble des appareillages permettant d'effectuer une lyophilisation. Deux types de lyophilisateurs ont été utilisés : le **Lyovac GT4** et le **Lyovac GT3**, tous deux de Leybold-Hereaus. Dans le GT4, utilisé pour la lyophilisation des liposomes, la congélation, la sublimation et la désorption thermique se déroulent dans un même bloc. Le GT3 n'est utilisé que pour des lyophilisations non optimisées. Il ne comporte pas de système de régulation de température.

#### **2.1.12.1 Lyophilisateur GT4**

L'appareil (**Fig. 2.6**) comprend une chambre de lyophilisation, un condenseur et une pompe à vide. Dans la chambre de lyophilisation, les flacons ou le produit sont déposés en vrac sur des étagères mobiles avec des espaces réglables. A l'intérieur de chaque étagère circule, en circuit fermé, un fluide échangeur de chaleur (huile de silicone) qui vient puiser ses frigorifiques dans un échangeur de température alimenté à son tour par un compresseur frigorifique (fréon R502). La congélation se fait donc par contact avec la surface refroidie (congélation statique) et permet d'amener le produit à une température de  $-40^{\circ}\text{C}$ . Le fluide échangeur de chaleur peut également se réchauffer (jusqu'à  $+70^{\circ}\text{C}$ ) pour fournir l'énergie nécessaire à la sublimation et à la désorption thermique. Un vérin hydraulique situé en partie haute de la chambre permet, sans ouvrir cette dernière, de comprimer les plateaux les uns sur les autres et d'obturer hermétiquement les fioles par des bouchons prévus à cet effet en l'espace de quelques secondes.



**Fig. 2.6.** Schéma du lyophilisateur Lyovac GT4 (dessiné).

La chambre de lyophilisation est en communication, par l'intermédiaire d'un conduit muni d'une vanne, avec une seconde partie très importante de l'appareil : le condenseur. Il s'agit d'un grand réservoir (20 litres) muni d'un échangeur en serpentins maintenu à très basse température ( $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) par un deuxième compresseur frigorifique (fréon R 502). Le rôle du condenseur est de transformer en glace la vapeur d'eau émise par les échantillons lors de la sublimation et de la désorption thermique.

Enfin vient la pompe à vide. C'est une pompe rotative à palettes qui ne joue qu'un rôle secondaire. En effet, le vide est gouverné par la température du condenseur. C'est la condensation de la vapeur d'eau sur ce dernier qui crée le vide dans l'enceinte. Le vide maximal

qu'on peut obtenir est égal à la tension de vapeur de la glace à la température du condenseur. Le rôle de la pompe est cependant triple : elle crée le vide de départ, compense les entrées d'air provenant des fuites de l'appareil et sert à éliminer les gaz difficilement condensables (ex.: CO<sub>2</sub>). Il faut noter que le vide n'est pas uniforme dans toute la chambre, mais qu'un gradient de pression s'instaure dans l'appareil entre le condenseur et le produit.

A la fin de la lyophilisation, il est nécessaire d'éliminer la glace qui s'est accumulée à la surface du condenseur. On procède par injection d'eau ; une fois le condenseur dégivré, une deuxième pompe permettra l'évacuation de l'eau.

#### **2.1.12.2 Lyovac GT3**

Le **Lyovac GT3**, qui a été utilisé dans la mesure du point eutectique, est quelque peu différent du lyophilisateur GT4. Le GT3 se compose d'un condenseur, d'un bain de congélation annexe et d'un groupe de pompage (**Fig. 2.7**). La congélation a lieu dans un bain annexe d'isopropanol refroidi via un compresseur frigorifique. Une fois l'échantillon congelé, celui-ci est branché à un arbre composé d'un axe central creux et de dérivations latérales sur lesquelles des échantillons peuvent être branchés. L'arbre est directement relié au condenseur. Le système puise l'énergie nécessaire à la sublimation dans le milieu ambiant.

Le GT3 n'est utilisé que pour des lyophilisations non optimisées. Il ne comporte pas de système de régulation de température.

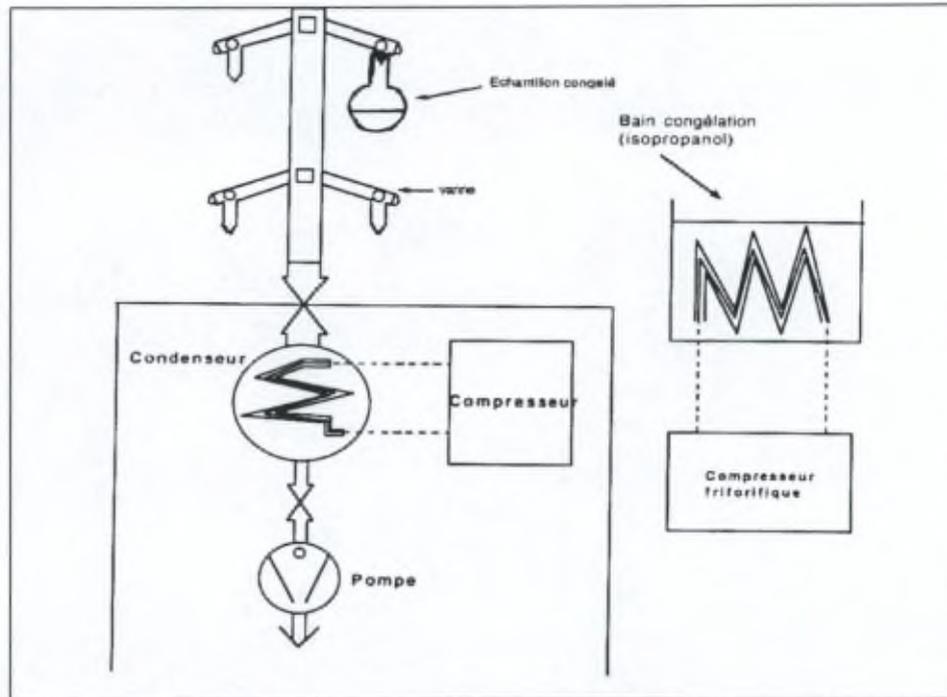


Fig. 2.7. Schéma du lyophilisateur Lyovac GT3 (dessiné).

## 2.1.13 Conductimètre

### 2.1.13.1 Principe

La méthode conductimétrique consiste à mesurer la variation de conductivité d'un fluide. L'aptitude d'une substance à conduire le courant se mesure par la résistivité ou par son inverse, la conductivité. En solution, le courant électrique ne peut être transporté que par des particules chargées électriquement. Lorsqu'on applique une différence de potentiel à une solution composée d'un électrolyte et d'un solvant, on crée en son sein un champ électrique dans lequel les ions se déplacent. Pour un électrolyte ayant une seule espèce d'ion positif et une seule espèce d'ion négatif, la conductivité électrique est donnée par la relation suivante :

$$\gamma = C \cdot \alpha \cdot N \cdot e (U_c + U_a)$$

où :  $\gamma$  = conductivité électrique,

$C$  = concentration de l'électrolyte en équivalent-gramme,

$\alpha$  = degré de dissociation,

$N$  = nombre d'Avogadro,

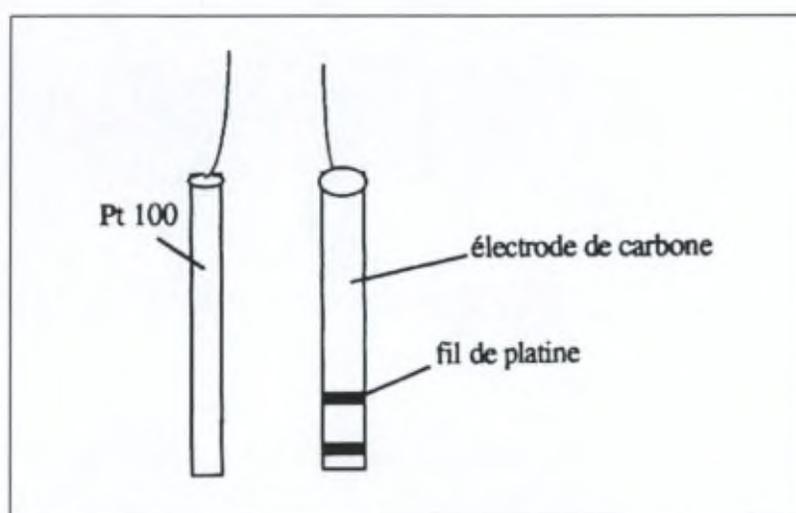
$e$  = charge de l'électron,

$U_c$  et  $U_a$  = mobilité des cations et des anions.

L'unité usuelle de la conductivité est le microSiemens.cm<sup>-1</sup> ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ). Les facteurs qui influencent la conductivité sont le type, la mobilité et la concentration des ions en présence, ainsi que la température, la viscosité, et la nature du solvant.

### 2.1.13.2 Appareillage

L'appareillage utilisé (Hanna Instruments, HI 9032) est constitué d'une électrode en carbone enroulée de deux fils de platine (bornes) et d'une sonde Pt 100 pour la mesure de température (**Fig. 2.8**).



**Fig. 2.8.** Schéma des sondes du conductimètre (dessiné).

On introduit les sondes dans un volume déterminé du liquide à étudier. Les bornes de la sonde à conductivité sont reliées à une source de tension constante ( $U$  = tension en volts). Le courant ( $I$ , en ampères) qui passe entre les deux bornes est mesuré. La résistance ( $R$ ) du liquide entre les deux bornes est alors donnée par la loi d'Ohm ( $R = U/I$ ) et l'appareil transforme la valeur de résistance en valeur de conductivité. Lors de ces mesures, il est indispensable de corriger les températures, car les solutions aqueuses ont un coefficient de température positif et non négatif comme les métaux. C'est pour cette raison qu'une sonde Pt 100 est généralement associée à la sonde conductimétrique. Avec cette sonde, la gamme de mesure de conductivité s'étend de  $100 \text{ Scm}^{-1}$  à  $0,1 \mu \text{ Scm}^{-1}$ , et la gamme de température, de  $+50$  à  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.1.14 *Moniteur eutectique*

Cet appareil permet la détermination des points eutectiques par la mesure de l'évolution de la résistance électrique et de la température au sein du produit lors de la congélation et de la décongélation.

Un **moniteur eutectique AW2** de Leybold-Hereaus a été utilisé. Sa tête est constituée de deux électrodes en platine (pour la mesure de la résistance électrique) et d'une sonde à température Pt 100. Cette tête est reliée au moniteur via un câble résistant à basse température. Le moniteur est relié à un enregistreur X-Y (PM 8125 de Philips) qui permet le relevé et le tracé de la résistance électrique en fonction de la température. Avec l'AW2, la gamme de mesure de la résistance s'étend de  $10^3$  à  $10^{11}$   $\Omega$ , et la gamme de mesure de la température, de  $-80$  à  $+20$  °C.

### 2.1.15 *Diffractomètre*

La diffraction des rayons X permet de déterminer la structure cristalline d'une substance ou d'un mélange de substances (USP XXII, 229). Les rayons incidents atteignant un cristal sont réfléchis par ses plans parallèles d'atomes constitutifs, selon un angle égal à celui du rayon incident. Chaque famille de plans peut donc réfléchir ou diffracter une onde incidente lui parvenant selon un angle particulier et défini par la loi de Bragg :

$$n.\lambda = 2.d.\sin\theta$$

où  $n$  est un nombre entier,  $\lambda$  est la longueur d'onde du rayon incident,  $d$  est la distance séparant 2 plans d'atomes du cristal, et  $\theta$  est l'angle du rayon incident.

La diffractométrie consiste à balayer l'échantillon à analyser par un faisceau de rayons X dont on fait progressivement varier l'angle d'incidence. On enregistre au fur et à mesure l'image diffractée, caractéristique du réseau cristallin de la substance. En fonction de l'orientation de ses plans moléculaires, le cristal ne réfléchira que les rayons X l'atteignant selon un angle caractéristique. Les rayons diffractés pour un angle donné sont convertis en pics dont la surface est proportionnelle à leur intensité.

Le spectre de diffraction d'une substance cristalline se présente comme une succession de pics correspondant chacun à un angle de diffraction donné. Une substance amorphe, dont l'arrangement des molécules est établi de façon anarchique, ne présente qu'un diagramme de diffraction diffus et peu cohérent, caractérisé par l'absence de pic.

Les analyses de diffraction par la méthode des poudres ont été réalisées à l'aide d'un diffractomètre Philips (**PW 1710**) équipé d'un générateur de rayons X (**PW 1729**) émis par une anticathode en cuivre (source de radiation CuK $\alpha$ ) et filtrés par un filtre en nickel. Les conditions standard appliquées sont de 32 kV, sous une intensité de courant de 24 mA.

Les échantillons ont été broyés dans un mortier puis disposés dans la fenêtre de diffraction où ils ont été bombardés selon un angle variant de 5° à 80°.

### **2.1.16 Analyse enthalpique différentielle (DSC)**

L'analyse enthalpique ou calorimétrie différentielle à balayage (DSC, pour *Differential Scanning Calorimetry*) permet de détecter les phénomènes de transition de phase que subit un échantillon lorsqu'il est soumis à une augmentation ou à une réduction régulière de température. Les transitions observées peuvent être d'ordre endothermique (absorption de chaleur) ou exothermique (émission de chaleur). Pour une substance pure, les principaux phénomènes qui sont susceptibles de s'exprimer lors d'une analyse sont des endothermes de fusion ou d'évaporation ainsi que des exothermes de cristallisation. Notons qu'en plus, l'analyse thermique des polymères permet de détecter une transition dite de second ordre, la transition vitreuse.

Les analyses calorimétriques ont été réalisées à l'aide d'un appareillage Perkin-Elmer **DSC-7**. Cet appareil est équipé de deux fours, l'un pour l'échantillon, l'autre pour la référence, chacun étant relié à son propre système de chauffage. L'appareil est muni d'un système de compensation de puissance permettant de maintenir identiques, à tout moment, les températures des deux fours, grâce à l'adaptation de l'apport d'énergie (*Ford & Timmins, 1989*). Un système de refroidissement est annexé à l'appareillage, ce qui permet de réaliser des mesures à des températures sub-ambiantes pouvant aller jusqu'à -40 °C. Durant l'analyse, les deux fours sont balayés par un flux d'azote.

L'appareil est calibré à l'aide d'un étalon d'indium (pureté > 99,999 %) dont le point de fusion est égal à 156,6 °C, et l'enthalpie de fusion, à 28,45 J/g. Afin de permettre une

analyse quantitative, l'échantillon (entre 5 et 10 mg) est pesé avec précision dans une cupule en aluminium qui est ensuite scellée. La cellule de référence contient uniquement une cupule scellée vide. Les cupules utilisées ont une capacité de 50  $\mu$ l et sont perforées de trous, afin de prévenir les phénomènes de surpression lors du chauffage de l'échantillon. Les analyses de la dexaméthasone-palmitate ont été réalisées lors d'un chauffage de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  à  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  à la vitesse de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  par minute.

La transition de phase des phospholipides de jaunes d'œufs étant de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  à  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , elle ne sera pas mesurée dans ce travail par l'analyse enthalpique différentielle.

### **2.1.17 Cellule à numérotation**

Une cellule de comptage « **Neubauer improved** » a été utilisée pour dénombrer les monocytes. Son quadrillage comprend 9 grands carrés de  $1\text{ mm}^2$  chacun. Par addition de lignes intermédiaires, on a formé dans le carré central 25 plus petits carrés, chacun subdivisé en 16 carrés de  $0.05\text{ mm}$  de côté. La numérotation des érythrocytes et des leucocytes s'effectue dans le carré central.

### **2.1.18 Système de récolte des cellules**

Le « **Nunc Cell Harvester** » est un système qui permet de récolter les cellules sur un filtre, à partir d'une plaque comportant des puits, et ensuite de laver les filtres pour récupérer les cellules.

## **2.2 Solutions et réactifs**

### **2.2.1 Réactifs pour la préparation et l'analyse des liposomes**

- Trois formes principales de **lécithines** ont été utilisées. Il s'agit, dans tous les cas, de phosphatidylcholine de haute pureté ( $>95\%$ ) :
  - Pour des expériences préliminaires, la phosphatidylcholine de jaune d'oeuf (**EPC Type VII-E**, Sigma, USA) a été livrée en solution à  $100\text{ mg/ml}$  dans du chloroforme.

La composition complète en acides gras de l'EPC a été donnée dans les Tableaux 1.4 et 1.5 (INTRODUCTION).

- Toute la mise au point de la constitution des liposomes DMP a été effectuée avec le produit « **Lipoid E 100** » de la firme Seppic (Paris, France). Il s'agit d'une phosphatidylcholine à 100 %, extraite de lécithine de jaune d'œuf, qui est préconisée pour la constitution de liposomes. Elle doit être conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité à une température inférieure à 18 °C. Sa stabilité est alors garantie pendant un an au moins. Sa composition en acide gras est la suivante :

acide palmitique	35.3 %
acide stéarique	13.1 %
acide oléique	27.4 %
acide linoléique	5.6 %
acide linoléinique	0.2 %
acide arachidonique	1.0 %
acide eispentanoïque	3.5 %
acide docosapentanoïque	1.3 %
acide docosahexanoïque	12.6 %

- Lors de la mise au point du Réactosome, le « **Phospholipon<sup>®</sup> 100** » de la firme Rhône-Poulenc Rorer a été utilisé. C'est une PC de grade pharmaceutique purifiée de lécithine de soja au moyen d'un procédé breveté (méthode RPR<sup>®</sup> Nattermann) en conditions GMP. Le procédé utilise exclusivement de l'éthanol pour la purification (pas de traces d'acétone). Le Phospholipon<sup>®</sup> 100 est chimiquement et physiquement stable pendant au moins 2 ans dans son conteneur d'origine en atmosphère de gaz inerte. Le Phospholipon<sup>®</sup> 100 contient de façon certifiée 95 % de PC, 2 % de lyso-PC, et maximum 2 % d'eau, 0.5 % d'éthanol, et 100 germes/g. Il est additionné d'environ 0.2 % de d,- $\alpha$ -tocophérol. Sa composition en acide gras est la suivante :

Acide palmitique :	12 $\pm$ 2 %
Acide stéarique :	3 $\pm$ 1 %
Acide oléique :	10 $\pm$ 3 %
Acide linoléique :	66 $\pm$ 5 %
Acide linoléinique :	5 $\pm$ 2 %

- Le **cholestérol** (Sigma, USA) est livré sous forme de poudre. Il est dissous dans du chloroforme à une concentration de 20 mg/ml.

- L' **$\alpha$ -tocophérol** provient également de Sigma (USA).
- La **dexaméthasone (DXM)**, ou 9 $\alpha$ -fluoro-16 $\alpha$ -methylprednisolone (cf. INTRODUCTION) est livrée par Sigma (USA) dans un flacon de 1 g sous forme de poudre cristallisée blanche. Une solution à 20 mg/ml est préparée dans de l'éthanol absolu.
- La **DXM tritiée**, [1,2,4,6,7-<sup>3</sup>H]DXM ou plus simplement [<sup>3</sup>H]DXM, est une solution à 37 MBq/ml dans de l'éthanol absolu. Elle est livrée par Amersham (UK).
- Le **chlorure de palmitoyl** est livré par Aldrich (Allemagne) sous forme liquide.
- La **pyridine** est livrée par Sigma (USA) sous forme de solution pure à  $\geq 99\%$ .
- Le **21-palmitate de dexaméthasone (DMP)**, produit non commercialisé, nous a été gracieusement donné par Roussel UCLAF (France) dans un flacon de 10 g sous forme de poudre cristallisée blanche. Une solution à 50 mg/ml est préparée dans de l'éthanol absolu. Le certificat de conformité de ce produit se trouve dans la **Fig. 2.9**. Du DMP a également été synthétisé selon la procédure décrite en 2.3.2.

Direction du Développement  
Préclinique Santé  
Département Central d'Analyse  
Analyse Principes Actifs  
DF-7A0176B-1

**ROUSSEL UCLAF**



5 janvier 1995

**CERTIFICAT D'ANALYSE**

**PALMITATE DE DEXAMETHASONE**  
(RU 42297)

Contrôle N° 7A0176B (lot 14)

Taille du lot : 1,165 kg

- Caractères	:	poudre blanche
- Identité (IR, UV, RMN)	:	conforme
- Pouvoir rotatoire spécifique à 20°C, sur substance sèche	:	+66,8°
- Eau (K. Fischer)	:	2,9 %
- Solvants résiduels (chromatographie gazeuse)	:	
. somme	:	< 0,1 %
- Cendres sulfuriques	:	< 0,1 %
- Acide palmitique libre	:	< 0,1 %
- Substances apparentées (CCM)	:	
. somme	:	1 %

Date de fabrication	:	10 mars 1987
Lieu de fabrication	:	Romainville
Date de contrôle	:	27 mars 1987
Date et numéro de recontrôle	:	5 janvier 1995 - 4A0254B
Date du prochain recontrôle	:	31 janvier 1997
Conditions de stockage	:	à une température comprise entre +2 et +8 °C à l'abri de la lumière

Accepté pour usage préclinique

A. DUGUET  
Pharmacien

**CERTIFIE  
CONFORME**

102, Route de Noisy 93235 Romainville Cedex  
Tél. + 33 (1) 49 91 49 91  
STRET 342 008 081 00052 00045

Roussel Uclaf, Société Anonyme à Directoire et Conseil de Surveillance  
au capital de 544 749 300 F - R.C.S. Paris B 542 008 081  
Siège social : 35, Boulevard des Invalides 75007 Paris

**Fig. 2.9.** Copie du certificat de conformité du 21-palmitate de dexaméthasone reçu de la firme Roussel-UCLAF.

- Le **tampon phosphate** à pH = 7,4 et à 300 mosmol/kgH<sub>2</sub>O est composé de 1,1454 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ; de 0,0286 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; de 0,229 g de NaCl ; et de 200 ml de H<sub>2</sub>O désionisée sur colonne échangeuse d'ions. Le tout est porté au trait dans un matras de 500 ml et agité, puis l'osmolalité est ajustée à l'aide de NaCl sur l'osmomètre automatique de Fiske, et le pH est vérifié à l'aide d'une électrode de verre double.
- Le **chloroforme** provient d'Aldrich (Allemagne).
- Le **Rouge Ponceau** provient de Sigma (USA).
- Le **gel Séphadex G50 Medium** provient de Pharmacia (Suède).
- Le liquide scintillant choisi (**Insta-Fluor**, Packard, USA) convient pour les échantillons organiques.
- Le **soluène** (Packard, USA) est une solution 0,5 N d'hydroxyde d'ammonium quaternaire dans du toluène.
- Le **réactif de Stewart**, ou ferrothiocyanate d'ammonium 0,1 M, est préparé au départ de :
  - 27,03 g d'hexahydrate de chlorure ferrique (UCB, Belgique)
  - 30,04 g de thiocyanate d'ammonium (Sigma, USA)
  - 1 litre d'eau désionisée

### **2.2.2 Réactifs pour les cultures et l'analyse des lymphocytes**

- Le milieu RPMI 1640 et la solution saline de Hanks (HBSS = Hank's Balanced Salt Solution) sont livrés par Gibco BRL.
- Le sérum de veau fœtal (Gibco BRL) est dépourvu de mycoplasme et de virus.
- La benzylpénicilline sodique (Continental Pharma, Belgique) est livrée dans un flacon de 600 mg sous forme de poudre blanche (1 000 000 U). Une solution à 200 000 U/ml est préparée dans de l'eau distillée stérile.
- Le sulfate de streptomycine (Merck, Darmstadt, Allemagne) est livré sous forme de poudre blanche.
- Le Ficoll-Paque (Pharmacia, Suède) est une solution aqueuse de densité = 1,077 g/ml, contenant 5,7 g de Ficoll 400 et 9 g de diatrizoate de sodium avec EDTA dans 100 ml.

- La concanavaline A (Boehringer Mannheim, Allemagne) est livrée dans un flacon de 5 mg sous forme de poudre. Une solution à 1 mg/ml est préparée dans de l'eau distillée stérile.
- La thymidine tritiée, ou [6-<sup>3</sup>H]thymidine, est une solution à 1 mCi/ml provenant d'Amersham (UK).
- Le colorant Bleu Trypan (Sigma, USA) est préparé selon les instructions dans du K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et du NaCl.
- L'héparine Novo (S.A. Novo Industries, Danemark) est une solution aqueuse d'héparinate sodique titrée à 5000 UI/ml.
- Le Diff-Quick est un colorant livré prêt à l'emploi par Dade (Allemagne).
- L'isopropanol, dilué à 70 %, et le désinfectant sont livrés par le C.U.B. des Cliniques Universitaires Erasme de l'ULB.

## **2.3 Méthodes**

### **2.3.1 Méthodes chromatographiques**

#### **2.3.1.1 Chromatographie Couche Mince (ascendante d'adsorption)**

La chromatographie sur couche mince utilise une couche de support adsorbant (silice) attachée sur une plaque de verre maintenue verticale dans une enceinte fermée. La phase stationnaire est constituée par de la silice. La phase mobile est un mélange volume à volume de solvants chloroforme / éthyle acétate (1/1). Elle est disposée à la base de la plaque de verre, de telle sorte qu'elle monte dans le support adsorbant par capillarité. Avant le passage du mélange de solvants, on dépose le produit de la réaction sur la plaque. Le passage des solvants réalise un partage des substances à séparer entre la silice et la phase mobile. Lorsque le développement est achevé, on sort la plaque, on la sèche et on la révèle sous une lampe UV. Les diverses molécules qui ont été séparées ainsi que les spots de référence DXM, Cl-Palmitate apparaissent sous formes de taches.

Dans le présent travail, la chromatographie ascendante d'adsorption a été utilisée pour purifier le DMP tritié (cf. RESULTATS).

### **2.3.1.2 Chromatographie de filtration sur gel**

La chromatographie de filtration sur gel, par exemple un gel de silice tel le Sephadex™ G50 de Pharmacia (Suède), utilise un support fait de grains d'une matière poreuse qui laisse pénétrer les petites molécules, alors que les grosses restent à l'extérieur. Les grosses molécules sont donc exclues du gel et peuvent ainsi être séparées des petites molécules qui ne sortent du gel que plus tardivement. Les pores du gel de silice doivent être suffisamment larges pour permettre l'accès et la sortie des molécules d'échantillon, car un diamètre trop faible provoquerait une exclusion stérique préjudiciable à l'efficacité. Un conditionnement des colonnes par imprégnation avec une phase liquide est indispensable pour rendre les sites actifs accessibles.

La chromatographie de filtration sur gel a été utilisée pour la purification des liposomes et la séparation du DMP lors de la mise au point de sa synthèse.

### **2.3.1.3 Minicolonnes Sep Pak Plus**

Ces minicolonnes représentent un moyen rapide et reproductible d'extraction solide-liquide pour la préparation d'échantillons destinés à des techniques analytiques comme l'HPLC (high performance liquid chromatography) ou la spectrophotométrie, auxquelles il faut fournir le composé concerné sous forme de solution libre d'interférences (tels les éléments matriciels) et suffisamment concentrée pour la détection et la mesure.

Le principe des minicolonnes Sep Pak Plus (Millipore, Bruxelles, Belgium) est une chromatographie d'adsorption solide-liquide pour la séparation de composés de polarités différentes liées à la présence et/ou à la position de groupements fonctionnels différents. Le processus d'adsorption établit un équilibre à l'intérieur de la colonne. Une molécule d'échantillon, adsorbée sur un groupement fonctionnel (par exemple, hydroxyle) à la surface de la phase stationnaire, est heurtée de manière continue par les molécules du courant de la phase mobile. L'énergie de ce courant est suffisante pour affaiblir progressivement la liaison échantillon-phase stationnaire. Le flux continu des molécules de la phase mobile réussit à déloger le composé adsorbé et à l'entraîner jusqu'au premier groupement fonctionnel disponible où, selon son affinité pour celui-ci, le composé pourra ou non prendre la place de molécules de phase mobile arrêtées sur le site d'adsorption. L'augmentation du nombre des étapes de désorption et d'adsorption allonge d'autant plus le temps de séjour dans la colonne des composants de l'échantillon que leur affinité pour l'adsorbant est grande, améliorant ainsi leur séparation.

La phase mobile est un solvant appelé éluant. Le choix de l'éluant est facilité par l'utilisation de l'échelle dite de Hildebrand, qui donne la force éluante du solvant. Cette force est définie par la quantité de chaleur libérée par l'adsorption de chaque solvant sur l'alumine. Un autre paramètre utile est la viscosité. Des mélanges d'éluants sont parfois intéressants pour obtenir des polarités intermédiaires.

Dans les minicolonnes Sep Pak Plus, la phase stationnaire est un gel de silice dont la surface est recouverte de groupement hydroxyles. Dans les colonnes « tC18 » utilisées pour la séparation des lipides et du produit actif, des chaînes acyles CH ont été greffées en lieu et place des groupements hydroxyles. Avant d'utiliser cette colonne, il est nécessaire de déplier par un solvant organique les longues chaînes greffées (Fig. 2.10).

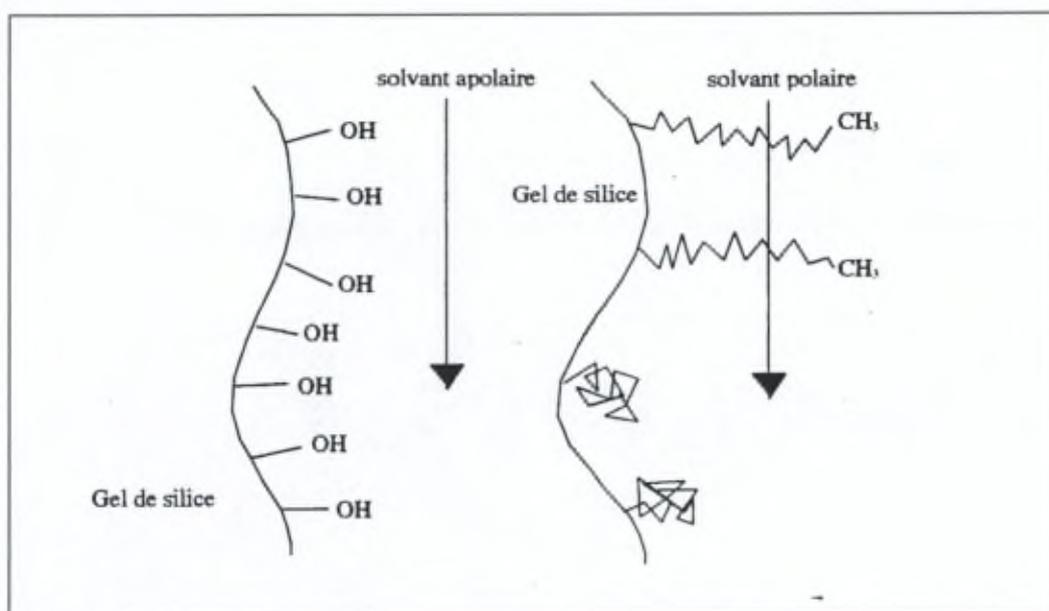


Fig. 2.10. Schéma du conditionnement de la colonne « tC18 » (dessiné).

#### **2.3.1.4 Chromatographie Liquide à Haute performance (HPLC)**

Afin de déterminer le titre de dexaméthasone palmitate nous avons utilisé la méthode CLHP développée et validée par Roussel sous le numéro 3311 dont le mode opératoire est résumé ci dessous :

- Colonne : sphérosil OA 600 (5µm)
- Solvant d'éluion : dichlorométhane/méthanol/ eau/ (97,5/2,3/0,2)
- Détection : UV 240 nm
- Température : ambiante
- Temps de rétention : 4,4 min.
- Débit : 0,7 ml/min
- Sensibilité : 0,64

(cf. RESULTATS).

#### **2.3.2 Couplage entre la dexaméthasone et le chlorure de palmitoyl**

Pour obtenir 10 g de palmitate de dexaméthasone (DMP) par réaction d'estérification, nous avons procédé comme suit :

- On pèse 15,0 g de dexaméthasone (DXM) et 32,0 g de chlorure de palmitoyl.
- On solubilise la DXM dans 40 ml de pyridine séchée sur tamis moléculaire et on additionne le chlorure de palmitoyl.
- La réaction s'effectue sous agitation continue à 4 °C pendant 24 heures.
- Passé ce délai, la mixture est concentrée sous vide dans un évaporateur à 45 °C.
- On ajoute ensuite 50 ml d'eau distillée et 200 ml d'éthanol, puis le mélange est passé dans l'évaporateur à 45 °C, afin d'éliminer l'eau.
- Cette opération est répétée 3 fois.
- Le résidu est concentré dans 10 ml de chloroforme pour la chromatographie ascendante d'adsorption sur couche mince de silice (CCM).

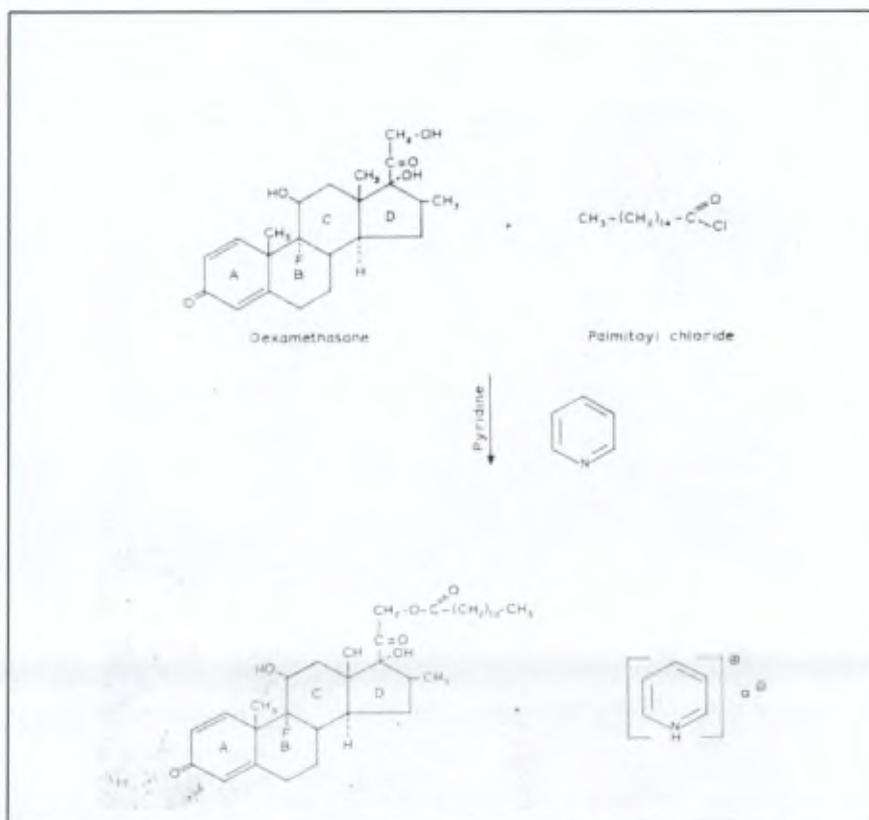
(cf. RESULTATS).

### 2.3.3 Préparation du DMP tritié (D\*MP)

Certaines expériences, cependant, nécessitaient une forme radioactive de DMP. Celle-ci a été obtenue par la réaction d'estérification suivante :

- On prend 1200  $\mu$ l d'une solution de DXM à 20 mg/ml et 50  $\mu$ l de solution de [ $^3$ H]DXM à 37 MBq/ml.
- Le mélange est évaporé et dissous dans 1 ml de pyridine séchée sur tamis moléculaire.
- On ajoute à ce mélange 6  $\mu$ l de chlorure de palmitoyl et un barreau magnétique. La réaction s'effectue sous agitation continue à 4 °C pendant 24 heures.
- Passé ce délai, on ajoute 5ml d'eau distillée et 20 ml d'éthanol.
- Le mélange est ensuite placé dans un évaporateur rotatif à 45°C sous vide pour évaporer l'eau. Cette opération est répétée trois fois.
- Le résidu est concentré dans 10 ml de chloroforme pour la CCM.

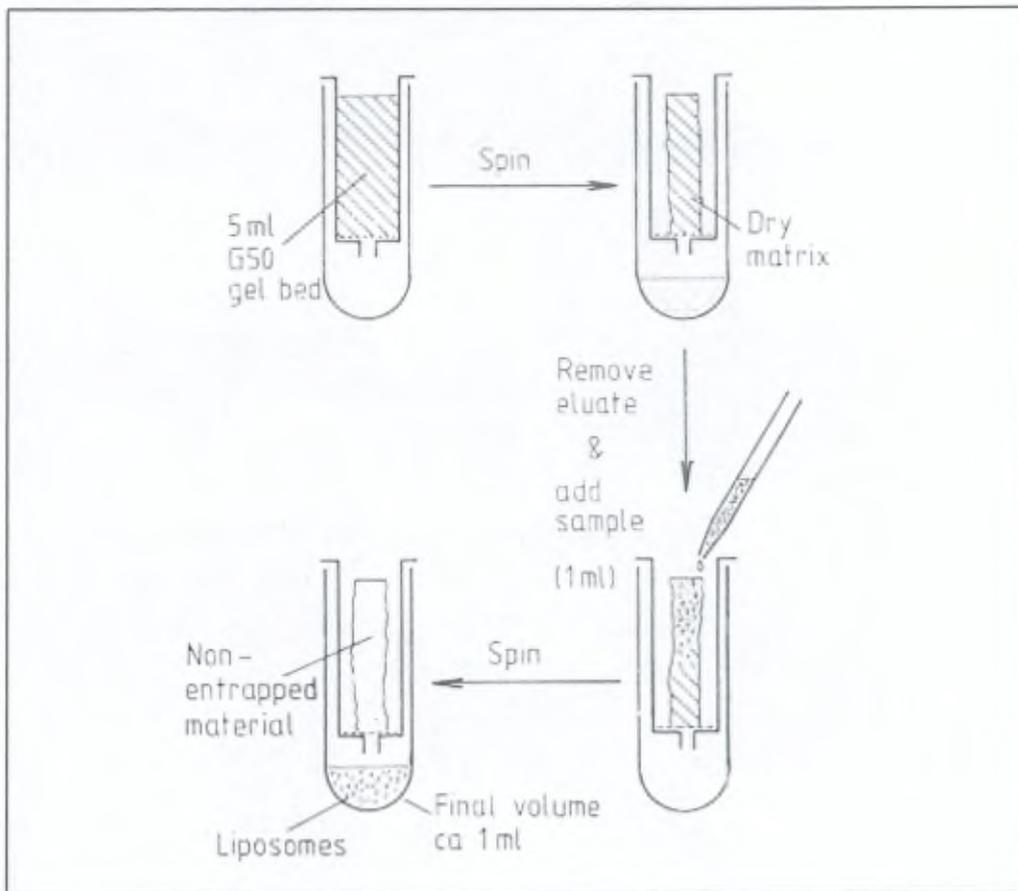
On obtient ainsi du D\*MP tritié. C'est la D\*MP en mélange avec de la DMP froide qui sera utilisé comme marqueurs dans toutes les études d'encapsulation (voir annexe préparation de la D\*MP).



### 2.3.4 Préparation des liposomes

Les principales méthodes de préparation des vésicules unilamellaires et multi-lamellaires ont été présentées dans l'INTRODUCTION. Nous ne décrivons ici que les procédures expérimentales de formation et de séparation des liposomes utilisés au cours de ce travail.

- Les lipides (EPC, cholestérol et  $\alpha$ -tocophérol) sont dissous à différentes concentrations molaires dans un minimum de chloroforme, la concentration massique totale étant de 20 mg/ml de phase aqueuse. Le principe actif à encapsuler (DXM native ou DMP) et le marqueur radioactif éventuel (D\*MP tritié) sont dissous dans la phase organique.
- La phase organique est évaporée lentement sous flux d'azote de manière à déposer un film lipidique sur les parois du récipient. Son maintien ultérieur sous vide assure un séchage optimum du film.
- On introduit alors le tampon phosphate à pH 7,4 et on agite mécaniquement (vortex). Les MLV apparaissent durant l'agitation de la suspension, maintenue à une température (32 °C) supérieure à la température de transition ( $T_c$ ) des lipides constitutifs.
- Pour obtenir les SUV, les MLV sont soumis aux ultrasons (tête de sonication Branson, puissance dissipée 60 W, durée 20 min). Un bain thermostatique maintient une température 20°C supérieure au  $T_c$ . La sonication de l'EPC se fait au bain de glace et sous flux d'azote. Notons que la sonication, quelle que soit sa durée, ne transforme jamais intégralement les MLV en SUV; cependant la fraction des MLV résiduels ne dépasse pas 5 % (New, 1990 ; Gregoriadis, 1984) .
- Les SUV sont purifiés par chromatographie sur un gel de Séphadex G50 préalablement placé en tampon phosphate à pH 7,4 dans des seringues de 5 ml, dont la sortie est munie d'un filtre en microfibrilles de verre (Whatman GF/C). Cela permet d'éliminer les agrégats, les complexes lipides-DMP, ainsi que les micelles qui interfèrent avec les liposomes. La chromatographie est pratiquée selon la méthode de Fry *et al.* (1978) qui est conseillée par New (1990) et adaptée comme suit (Fig. 2.11) :



**Fig. 2.11.** Purification des SUV par centrifugation sur minicolonnes G50 (selon *New, 1990*).

- ◆ Centrifuger les seringues à 1000 rpm pendant 8 min à 4 °C.
- ◆ Evacuer le tampon phosphate élué.
- ◆ Peser les seringues ne contenant que la colonne de gel asséchée.
- ◆ Ajouter une suspension de SUV préparés.
- ◆ Peser les seringues contenant la colonne de gel et les SUV.
- ◆ Centrifuger les seringues à 1000 rpm pendant 8 min à 4 °C.
- ◆ Peser les tubes contenant les SUV purifiés.
- ◆ Evacuer les liposomes purifiés.

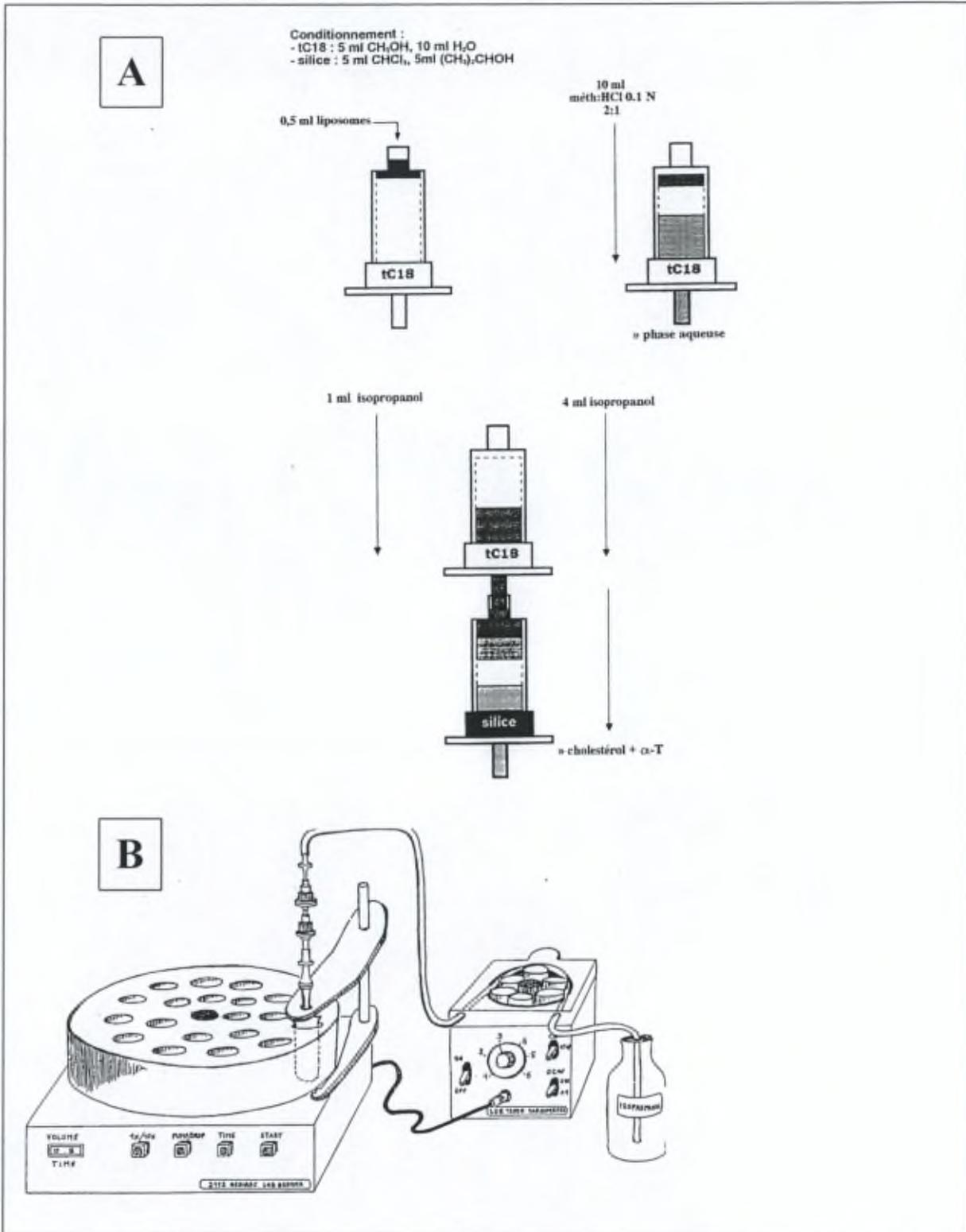
- Enfin, les liposomes vides ou porteurs de DMP sont stérilisés par passage sur un filtre de Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ . Les préparations de DXM libre sont stérilisées par le même procédé.

### **2.3.5 Extraction du cholestérol des liposomes**

Elle est schématisée dans la **Fig. 2.12**.

Les liposomes sont tout d'abord dénaturés par changement de la constante diélectrique du solvant. La chromatographie en phase inverse sur une minicolonne Sep Pak Plus tc18 permet l'interaction des lipides avec les chaînes C18 greffées sur la silice de la colonne, alors que les molécules hydrophiles sont éluées par un solvant polaire. On élue ensuite avec un solvant peu polaire pour décrocher les lipides. L'opération se poursuit par une chromatographie en phase normale sur gel de silice qui permet la séparation du cholestérol et de l' $\alpha$ -tocophérol des phospholipides par élution au moyen d'un solvant peu polaire.

Remarque : durant ces opérations, les colonnes doivent être maintenues verticales et ne peuvent être laissées à sec.



**Fig. 2.12.** A) Schéma du conditionnement des minicolonnes permettant l'extraction du cholestérol et de l' $\alpha$ -tocophérol. B) Dispositif technique d'extraction (selon le fabricant).

a) Extraction du Rouge Ponceau

- Conditionner la minicolonne Sep Pak Plus tC18 par 5 ml de méthanol pour HPLC, élué à raison d'une goutte par seconde à la sortie de la colonne.
- Rejeter ces 5 ml.
- Conditionner la minicolonne avec 10 ml d'eau MilliQ (à la même vitesse).
- Rejeter ces 10 ml.
- A l'aide de la seringue de 1 ml, placer 0,5 ml de suspension liposomale sur la minicolonne.
- Préparer un mélange méthanol : HCl 0,1 N à raison de 2:1. Pour 500 ml d'une telle solution, verser 16 à 17 ml d'HCl 1 M dans un verre à pied de 500 ml, ajouter 150 ml d'eau MilliQ, et mettre au trait avec du méthanol.
- Eluer les molécules hydrophiles par 10 ml du mélange à l'aide d'une pompe péristaltique et à la même vitesse qu'au conditionnement.
- Collecter ces 10 ml.

b) Extraction du cholestérol et de l' $\alpha$ -tocophérol

- Fixer la sortie de la pompe péristaltique délivrant l'isopropanol à l'entrée de la colonne TC18.
- Eluer la colonne avec 1 ml d'isopropanol.
- Recueillir la phase extraite.
- Connecter les deux colonnes silicagel et la tC18.
- Eluer les colonnes par 4 ml d'isopropanol à l'aide d'une pompe péristaltique et à raison d'une goutte par seconde à la sortie.
- Recueillir le cholestérol et l' $\alpha$ -tocophérol.

### 2.3.6 Determination du pourcentage d'encapsulation

Il consiste à mesurer le pourcentage d'encapsulation intraliposomal, soit par le produit actif (PA) radiomarqué, soit par encapsulation d'une solution de concentration connue d'un marqueur hydrophile des liposomes (Rouge Ponceau).

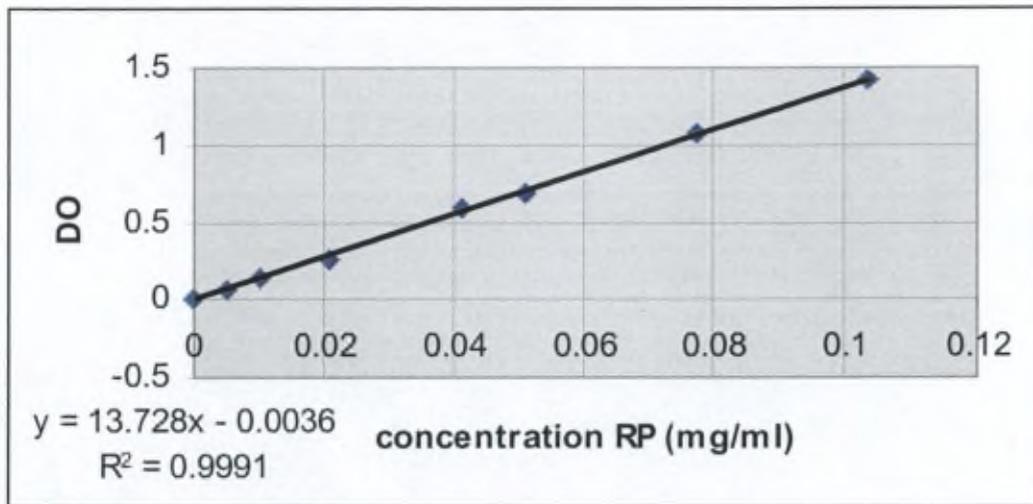
#### 2.3.6.1 Mesure par D\*MP tritié

- Comptage du standard : après suspension du film lipidique contenant le D\*MP tritié dans le tampon phosphate pH 7,4, 300 mOsm/kgH<sub>2</sub>O , prélever 100 µl de suspension, ajouter 500 µl de solvène, puis 10 ml de liquide scintillant et compter pour obtenir la valeur « cpm-1 ».
- Comptage d'un échantillon : après trois lavages par centrifugation à 4000 rpm à 4°C de la préparation liposomale correspondante, prélever 100 µl du culot remis en suspension dans le tampon. Ajouter 500 µl de solvène, puis 10 ml de liquide scintillant et compter ainsi la valeur « cpm-2 ».
- Calcul du pourcentage d'encapsulation :
  - ♦ Pourcentage d'encapsulation =  $(\text{cpm}^{-2} / \text{cpm}^{-1}) \times 100$
  - ♦ Quantité de PA encapsulé =  $(\text{cpm}^{-2} / \text{cpm}^{-1}) \times \text{Quantité totale de PA utilisé.}$

#### 2.3.6.2 Mesure par spectrophotométrie

- Dosage du standard : après suspension du film lipidique contenant du Rouge Ponceau, prélever 1 ml de suspension, ajouter 1 ml de méthanol, puis 1 ml de chloroforme, agiter au vortex pendant 15 secondes, centrifuger pendant 5 minutes à 4000 rpm à 4 °C, ôter la phase chloroformique inférieure, et lire la densité optique à 515 nm.
- Dosage d'un échantillon : après trois lavages, prélever 1 ml de suspension, ajouter 1 ml de méthanol, puis 1 ml de chloroforme, agiter au vortex pendant 15 secondes, centrifuger pendant 5 minutes à 4000 rpm à 4 °C, ôter la phase chloroformique inférieure, et lire la densité optique à 515 nm.

- Pour le calcul du pourcentage d'encapsulation, une droite d'étalonnage reprenant la densité optique en fonction de la concentration en Rouge Ponceau est réalisée dans une solution de méthanol, tampon d'hydratation et chloroforme (**Fig. 2.13**).



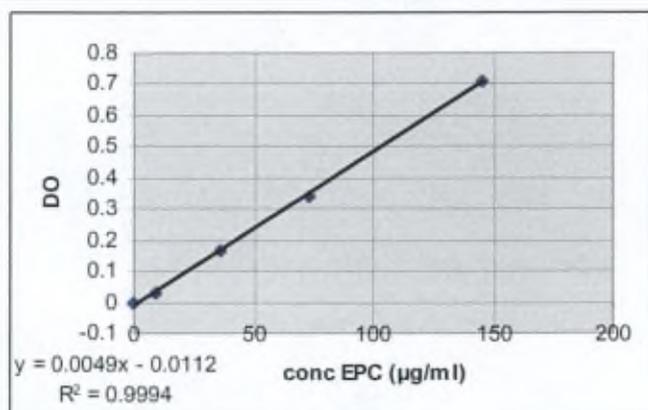
**Fig. 2.13.** Droite d'étalonnage du rouge ponceau mesuré par spectrométrie à 515 nm.

### 2.3.7 Dosage des phospholipides par la méthode de Stewart

L'avantage de la méthode de Stewart (*Stewart, 1980*) pour doser les phospholipides est l'absence d'interférence provenant de la présence de phosphate inorganique. Les phospholipides ont la propriété de former un complexe coloré avec le ferrothiocyanate d'ammonium dans un solvant organique, le chloroforme. Ce complexe est dosé par spectrophotométrie. Cette méthode est celle qui est conseillée pour doser les phospholipides de préparations liposomales (*New, 1990*).

- Les courbes standard (exemple : **Fig. 2.14**) sont établies en préparant des solutions contenant de l'EPC, du cholestérol et du DMP dans les proportions molaires correspondant aux diverses préparations liposomales.
- Le tout est dissous dans du chloroforme à raison de 1 ml de chloroforme par mg d'EPC.
- On prépare divers tubes avec des quantités croissantes de la solution standard de façon à conserver 2 ml de phase chloroformique et 2 ml de réactif de Stewart (27,03 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 30,04 g de  $\text{NH}_4\text{SCN}$  pour 1 litre d'eau)
- Mélanger au vortex pendant 15 sec. Un complexe coloré se forme.

- Centrifugation de 5 min à 1240 rpm pour séparer les phases chloroformique et aqueuse. La phase chloroformique est extraite et lue au spectrophotomètre à 485 nm.
- Les phospholipides liposomaux sont dosés de la même façon, directement dans le chloroforme. En effet, des expériences préliminaires ont montré qu'en dissolvant tout d'abord les liposomes dans un mélange de chloroforme, méthanol et HCl 0,1 N (1:1:1), comme parfois suggéré (*New, 1990*), on obtenait des résultats tout à fait équivalents. La méthode la plus simple a été conservée.



**Fig. 2.14.** Droite d'étalonnage de la phosphatidylcholine de jaune d'œuf (EPC) mesurée par la méthode de Stewart.

### 2.3.8 Coefficient de partage

Le coefficient de partage est recherché afin de déterminer le pourcentage de D\*MP tritié dans la phase aqueuse et dans la phase organique. La phase aqueuse est le tampon phosphate à pH = 7,4 et 300 mOsmol/kgH<sub>2</sub>O ; la phase organique est l'octanol.

- Dans chaque tube, ajouter 3 ml d'octanol, 3 ml de tampon, 75 µl de DMP et 10 µl de solution D\*MP tritié.
- Agiter au vortex pour homogénéiser les solutions puis retourner les tubes toutes les 3 sec pendant une heure dans un « rocking roller ».
- Centrifuger à température ambiante à 5000 rpm pendant 10 min. Les deux phases se séparent très facilement.
- Prendre dans chaque tube 2 échantillons de 950 µl de chaque phase.
- Placer ce volume dans une fiole Packard de 20 ml avec 10 ml de cocktail scintillant et passer au compteur bêta (LKB).

– Le pourcentage de D\*MP tritié dans la phase aqueuse est calculé comme suit :

$$\blacklozenge \text{ Pourcentage} = (\text{cpm phase aqueuse} / \text{cpm phase organique}) \times 100$$

### 2.3.9 Calcul conformationnel

La procédure utilisée a été réalisée sur ordinateur par un programme mis au point par le Professeur R. Brasseur du Laboratoire de Chimie des Macromolécules aux Interfaces (ULB). Cette méthode permet de définir le mode d'organisation de molécules lipidiques associées en bicouches ainsi que le mode d'insertion d'agents amphiphiles dans cette matrice lipidique (*Brasseur et al., 1981*).

#### 2.3.9.1 Molécule isolée

La détermination de la structure la plus probable à l'interface lipide-eau, c'est-à-dire celle possédant l'énergie libre la plus basse, est très complexe en raison du grand nombre de degrés de liberté associés aux nombreux atomes constituant(s) les molécules étudiées. Dans un but de simplification, seule l'énergie interne associée à chaque molécule isolée est calculée dans un premier temps. Les structures les plus probables obtenues pour les molécules isolées sont alors utilisées lors de l'assemblage en monocouche et en bicouche. L'énergie conformationnelle totale ( $E_{TOT}$ ) résulte de la somme de trois termes :

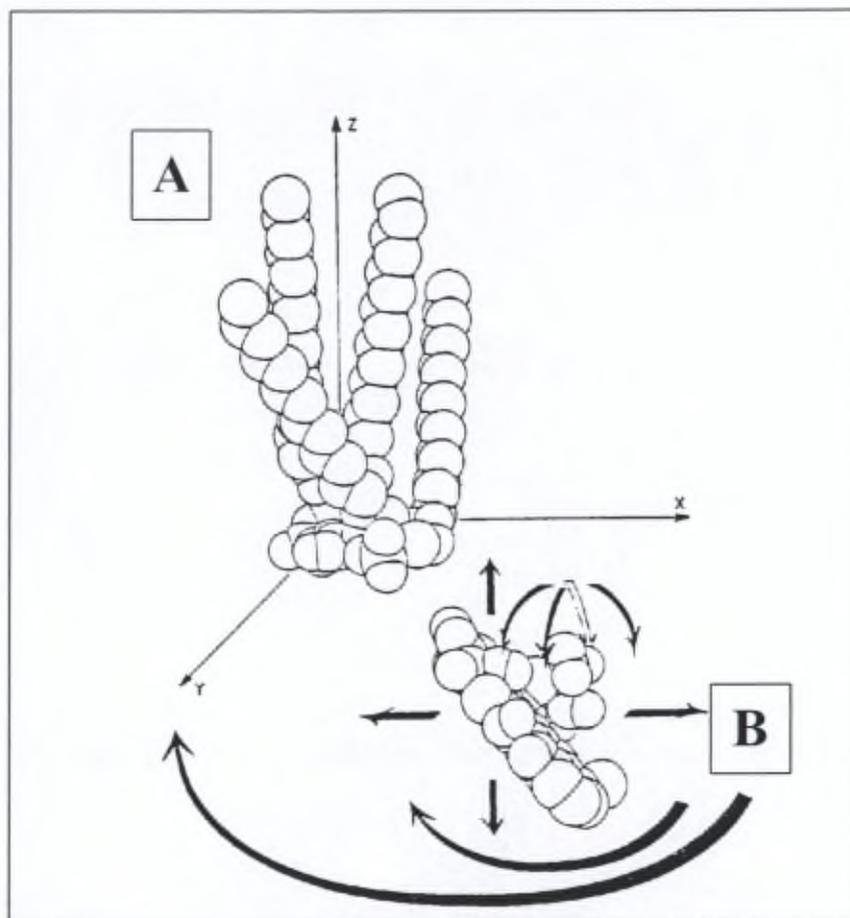
$$E_{TOT} = E_{INT} + E_{EXT} + E_{BIC},$$

où  $E_{INT}$ ,  $E_{EXT}$  et  $E_{BIC}$  représentent respectivement l'énergie interne de la molécule isolée, l'énergie d'interaction entre molécules au sein d'une monocouche, et l'énergie d'interaction entre deux monocouches constituant une bicouche.

Pour limiter le nombre de degrés de liberté possibles, la longueur des liaisons et les angles de valence sont considérés comme constants. Les champs d'énergie utilisés et la méthode de détermination de l'orientation de la molécule à l'interface sont ceux utilisés par le Professeur Brasseur (*Brasseur et al., 1981*).

### 2.3.9.2 Assemblage en monocouche

Les assemblages en monocouche de deux molécules, A et B, identiques ou différentes, sont réalisés sur base de la modification de quatre degrés de liberté (**Fig. 2.15**):



**Fig. 2.15.** Représentation schématique de la procédure d'assemblage en monocouche de deux molécules.

1. La position de la molécule B est modifiée le long de l'axe  $X$  avec un incrément de 5 nm. Pour chaque modification de distance entre ces deux molécules, la molécule B est amenée à tourner sur elle-même par pas de  $30^\circ$ , ainsi qu'à décrire un cercle centré sur la molécule A fixe, également par pas de  $30^\circ$ . Ces modifications effectuées conjointement donnent un total de 14400 configurations différentes. Parmi celles-ci, seule celle de plus basse énergie sera considérée dans la suite de l'étude conformationnelle.
2. La molécule B subit un mouvement de translation le long de l'axe  $Z$  perpendiculaire à l'interface lipide-eau, par déplacements successifs de 5 nm. A nouveau, seule la structure de plus basse énergie sera retenue.

3. L'orientation de la molécule B autour de l'axe Z est modifiée par pas de  $5^\circ$ . A ce stade, la configuration de plus basse énergie est retenue.
4. L'addition d'une troisième molécule suppose un processus similaire, la configuration la plus probable des deux premières molécules étant alors considérée comme une seule entité fixe autour de laquelle évoluera la troisième molécule. Pour  $n$  molécules à assembler, le processus sera répété  $(n - 1)$  fois.

Un paramètre important qui peut être calculé à partir du mode d'organisation d'une telle monocouche est l'encombrement superficiel de ses constituants. Il est obtenu en calculant la surface occupée par la molécule après projection sur le plan de l'interface.

De plus, la somme des interactions entre la molécule considérée et les molécules voisines, divisée par le nombre de premières voisines, permet de déterminer l'énergie d'interaction moyenne dans le plan de la monocouche.

### **2.3.9.3 Assemblage en bicouche**

Les assemblages en bicouches sont obtenus à partir de deux monocouches. L'une est fixe et la position de l'autre est modifiée par rapport à la première selon la procédure suivante :

1. La position de la monocouche 1 est modifiée le long de l'axe X avec un incrément de 10 nm. Pour chaque modification de la distance entre les deux monocouches, la monocouche B subit une rotation autour de l'axe Z par pas de  $30^\circ$ . La configuration de plus basse énergie est retenue.
2. L'orientation autour de l'axe Z de la monocouche B est modifiée par pas de  $5^\circ$ . A nouveau, seule la structure d'énergie minimale est retenue.

## 2.3.10 Test de transformation lymphoblastique

### 2.3.10.1 Principe

Le test de transformation lymphoblastique (TTL), aussi appelé test de stimulation lymphocytaire, mesure la capacité des lymphocytes à être activés par un antigène. Il permet de détecter les allergies microbiennes et médicamenteuses, de juger de l'efficacité de la réaction immunitaire contre un micro-organisme particulier, d'étudier les fonctions immunes et les interactions entre les différents types de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, etc. Nous l'avons sélectionné pour évaluer l'effet biologique de la préparation liposomale de DXM au moyen d'un test bien établi qui évalue les propriétés immunorégulatrices des glucocorticoïdes (Heilmann *et al.*, 1973 ; Fauci & Dale, 1975). Deux types de stimulants lymphocytaires peuvent être utilisés dans ce test :

- Soit une stimulation spécifique à partir d'antigènes simples, le plus communément utilisé étant la PPD, dérivé protéique purifié de la toxine tuberculinique. L'antigène du *Candida albicans* est aussi utilisé, comme dans ce travail.
- Soit une stimulation non spécifique à partir d'agents mitogènes tels la concanavaline A (Con A) et la phytohémagglutinine A (PHA) pour les lymphocytes T, les lipopolysaccharides (LPS) pour les lymphocytes B, et le pokeweed (PWM) pour les lymphocytes T et B. En effet, les lectines mitogéniques issues de diverses plantes et bactéries se lient à des récepteurs spécifiques à la surface des lymphocytes et initient le processus métabolique menant à la différenciation et à la prolifération des cellules. C'est la Con A, stimulant spécifique des lymphocytes T, que nous avons choisie.

La Con A, extraite de *Canavalia ensiformis*, une légumineuse tropicale, est un tétramère composé de quatre sous-unités identiques mais asymétriques ayant chacune un poids moléculaire de 26000 daltons. Chaque sous-unité est dotée d'un site de liaison, ce qui permet à la Con A de se lier à une variété de carbohydrates contenant des résidus d' $\alpha$ -D-mannopyranoside, d' $\alpha$ -D-glucopyranoside et d' $\alpha$ -2-acétamido-2-déoxy-D-glucopyranoside. La liaison mitogène-récepteur n'est pas covalente; il s'agit généralement de ponts hydrogènes et de liaisons hydrophobes. La liaison au récepteur induit un changement de conformation au sein de la molécule de Con A. La structure de celle-ci est stabilisée grâce à des ions divalents,  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mn}^{++}$ , à raison d'un atome de chaque ion par sous-unité. Ces deux

métaux ne sont pas directement impliqués dans la liaison sucre-mitogène, mais ils sont nécessaires à l'activation lymphocytaire.

Trois phases successives peuvent être définies lors de l'activation lymphocytaire :

1. Une première étape « membranaire » entraîne des modifications physiques et chimiques de la membrane cytoplasmique. Les plus importantes concernent les lipides : augmentation de la fluidité membranaire par modifications biochimiques des phospholipides permettant une plus grande mobilité des glycoprotéines et mise en jeu du métabolisme de l'acide arachidonique aboutissant à la libération de métabolites telles les prostaglandines. Ces modifications entraînent des variations de la concentration intracellulaire en AMP cyclique, une phosphorylation des glycoprotéines membranaires et la mise en jeu du kinétoquelette. Celle-ci se traduit par les mouvements des glycoprotéines à la surface de la membrane (formation des coiffes ou « capping ») avec redistribution des récepteurs.
2. Une deuxième étape correspond au début de la transformation lymphoblastique entraînant une augmentation de la synthèse des protéines et de l'ARN (phase G1 du cycle cellulaire). L'augmentation de l'ARN cytoplasmique rend compte des modifications cytologiques qui se traduisent par un accroissement de volume de la cellule et de la masse cellulaire.
3. Une troisième étape concerne les phénomènes biochimiques au niveau du noyau et caractérise la phase S du cycle cellulaire. Il s'agit de modifications de la chromatine : acétylation des histones, phosphorylation des protéines nucléaires et synthèse d'ADN. La poursuite de la synthèse d'ADN aboutit à la phase G2 définie par un contenu en ADN double. Cette phase est suivie rapidement par la mitose (phase M).

La transformation lymphoblastique est identifiable en microscopie par l'augmentation de taille des cellules (en moyenne 14  $\mu\text{m}$  au lieu de 8  $\mu\text{m}$  pour un lymphocyte non stimulé), accompagnée d'un élargissement du noyau et d'un relâchement de la chromatine, ainsi que par l'élévation de leur activité métabolique qui se traduit par un réticulum endoplasmique

---

développé et de grandes quantités d'ARN et de ribosomes. Cependant, une technique plus simple de mesure de la transformation lymphoblastique, que nous avons choisie, est de mesurer la prolifération cellulaire au moyen de l'incorporation d'un traceur radioactif (thymidine tritiée) dans l'ADN (**Fig. 2.16**).

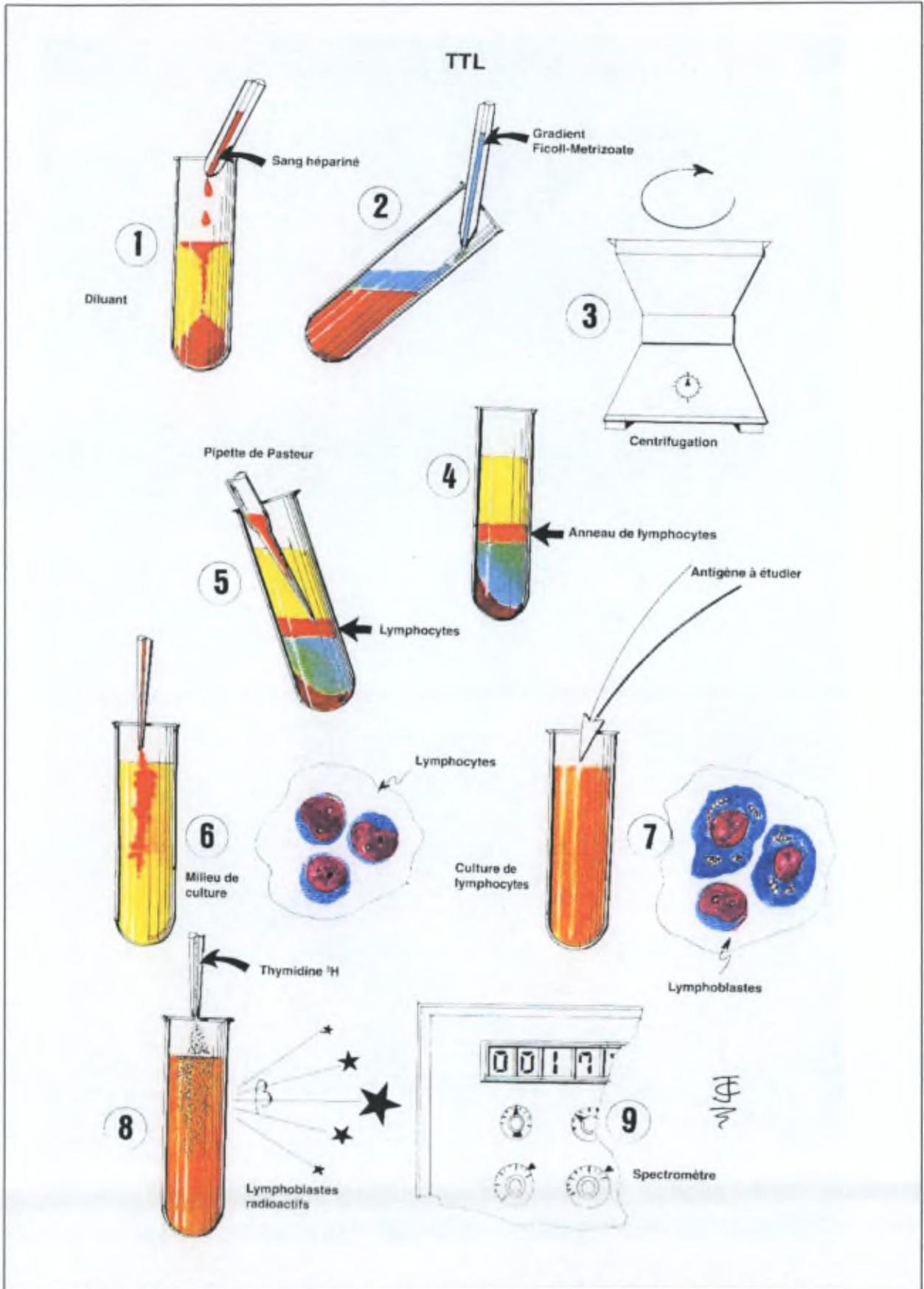


Fig. 2.16. Test de Transformation Lymphoblastique (Atlas d'Immuno-Allergologie UCB).

### **2.3.10.2 Préparation des lymphocytes**

Elle est effectuée selon la méthode de *Boyum (1968)* :

- Prélever 20 ml de sang humain chez des volontaires.
- Mêler le sang à de l'héparine Novo (quelques gouttes dans un tube Falcon suffisent).
- Répartir le sang total dans des tubes Falcon de 15 ml.
- Diluer le sang avec du tampon HBSS dans un rapport v/v de 1/2.
- Ajouter très lentement 3 ml de Ficoll-Paque à 10 ml de sang dilué en évitant au maximum le mélange des deux phases.
- Centrifuger à 2000 rpm pendant 30 min à 20 °C.
- Prélever l'anneau lymphocytaire situé à l'interface, et cela dans un volume minimum.
- Transvaser celui-ci dans un tube Falcon de 15 ml et ajouter 10 ml de tampon HBSS.
- Centrifuger à 2000 rpm pendant 10 min à 20 °C.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter à nouveau 10 ml de tampon HBSS.
- Centrifuger dans les mêmes conditions.
- Répéter l'opération 3 fois.
- Recueillir les lymphocytes lors du dernier lavage.
- Placer ceux-ci dans 1 ml de milieu de culture RPMI 1640 Medium additionné de 10 % de sérum de veau fœtal, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.
- Compter les cellules avant de mettre en culture.

### **2.3.10.3 Comptage total des cellules**

Il est réalisé à la cellule à numération « Neubauer improved ».

- Rincer la chambre à l'eau distillée, puis à l'isopropanol, puis la sécher.
- Mouiller les deux côtés parallèles de la lame couvre-objet.

- Appuyer fortement sur les deux bords de la chambre Neubauer. La lame couvre-objet ne doit pas tomber lorsqu'on retourne la chambre.
- La concentration cellulaire optimale est de  $10^7$  cellules/ml, mais la distribution comptable varie de  $2.10^5$  à  $4.10^7$  cellules/ml. Si nécessaire, il faut diluer la suspension cellulaire dans du tampon en agitant bien.
- Transférer dans la première moitié de la chambre par capillarité.
- Placer la chambre horizontalement pour figer les cellules (1 min).
- Compter au moins 200 cellules à l'objectif 10× ou 40×. Compter uniquement les cellules dans les surfaces internes des carrés et celles touchant le sommet et le bord gauche des carrés.
- Calculer la concentration sachant que la profondeur dans les surfaces internes des carrés est de 0,1 mm. Un carré a 0,2 mm de côté, soit une surface de  $0,04 \text{ mm}^2$ .
- Multiplier le total des cellules par 25, puis par 10 000, pour obtenir une concentration de  $1.10^6$  cellules/ml. Ne pas oublier le facteur de dilution si nécessaire.

#### **2.3.10.4 Comptage des cellules viables**

Il s'effectue au Bleu Trypan.

- Mélanger, dans un tube, 100  $\mu\text{l}$  de suspension cellulaire ( $1.10^7$  cellules/ml) avec 100  $\mu\text{l}$  de solution Bleu Trypan.
- Homogénéiser au vortex.
- Remplir la chambre de la cellule Neubauer. Attendre 1 min pour figer les cellules.
- En moins de 3 minutes, compter plus de 100 cellules bleues (mortes) en même temps que les cellules incolores (vivantes).

### 2.3.10.5 Culture cellulaire et mesure de la prolifération

- La culture cellulaire se réalise sur une plaque (Nunc) renfermant 96 puits. Chaque puits estensemencé avec un nombre de cellules déterminées dans un volume final de 200  $\mu$ l qui comprendra 10 ou 20  $\mu$ l de stimulant (concanavaline A ou antigène Candida) et 20  $\mu$ l de solution à tester (soit de DXM, soit de suspension liposomale, soit de solution contrôle). Dans certains cas, la solution à tester n'est ajoutée que 24 h après le début de la culture (le volume final reste fixé à 200  $\mu$ l). Après différents essais, la quantité optimale de cellules par puits a été fixée à  $10^5$ . Chaque condition est testée en 5 réplifications.
- Après leur préparation, les plaques de 96 puits sont mises dans l'incubateur à 37 °C et dans une atmosphère renfermant 5 % de CO<sub>2</sub> et 100 % d'humidité.
- Les cellules (sauf les blancs) sont stimulées par 10  $\mu$ l de concanavaline A à 0,2 mg/ml, soit une concentration finale optimale de 10  $\mu$ g/ml, ou par 20  $\mu$ l d'antigène Candida représentant une concentration finale de  $10^{-2}$  M.
- La DXM est ajoutée pour obtenir la concentration finale indiquée, qui va de  $10^{-10}$  à  $10^{-6}$  M, au départ de différentes dilutions d'une solution stock à  $10^{-5}$  M. La quantité de DXM (PM=392) ajoutée à chaque puits de 200  $\mu$ l va de 8 pg ( $10^{-10}$  M) à 80 ng ( $10^{-6}$  M).
- Pour ajouter les SUV-DMP, on prépare d'abord une suspension liposomale en PBS dans laquelle la DMP se trouve à une « concentration » de  $10^{-5}$  M. Tenant compte de l'efficacité d'incorporation de la DMP, qui est d'environ 65 % mais varie légèrement d'une préparation à l'autre, la suspension liposomale stock contient environ 200  $\mu$ g de lipides (EPC et cholestérol) pour 6,3  $\mu$ g de DMP (PM=631) par ml. Une fois mise dans les puits de 200  $\mu$ l (volume final), cette suspension apportera des quantités de DMP de 12,6 pg (correspondant à une « concentration » de  $10^{-10}$  M) à 126 ng (correspondant à  $10^{-6}$  M), et des quantités de lipides de 0,4 à 4  $\mu$ g.
- Lorsque des SUV « vides », c'est-à-dire préparés sans DMP, sont utilisés, ils le sont aux quantités de lipides indiquées ci-dessus.
- Après stimulation des lymphocytes, en présence ou non de liposomes, une quantité de 1  $\mu$ Ci de thymidine tritiée est ajoutée par puits. Le moment optimal pour mettre la thymidine a été mesuré ; il s'est avéré être 48 h après l'ajout de concanavaline A.

- Les puits sont incubés avec la thymidine tritiée pendant des temps déterminés. Ici aussi, la durée d'incubation optimale a été mesurée : elle s'est avérée être 18 h. Ensuite, les cellules sont récoltées, filtrées (Nunc Cell Harvester) puis lavées à l'eau distillée.
- Les filtres (0,3 µm) sont ensuite mis à sécher durant une nuit à température ambiante, puis additionnés de 10 ml de cocktail scintillant.
- Le comptage s'effectue au spectomètre bêta et permet de mesurer le taux de radioactivité exprimé en moles de thymidine tritiée.
- L'incorporation de thymidine tritiée se calcule à partir de la formule suivante, adaptée de la méthode de *Aileen et al. (1979)* :

$$\text{Incorporation en moles} = \frac{\text{cpm} \times 100}{E \times S \times 2.22 \cdot 10^{12}},$$

où S = activité spécifique du marqueur, soit 27 Ci/mmole (NB. 1 Ci = 2.22 10<sup>12</sup> dpm).

E = efficacité du comptage en %

#### 2.3.10.6 Mesure de la production d'interféron-γ

Les lymphocytes stimulés sécrètent de nombreuses cytokines, dont l'interféron-γ. Comme la production de cette substance est également inhibée de façon dose-dépendante par les glucocorticoïdes, y compris la DXM (*Corrigan et al., 1991 ; Braun et al., 1997 ; Rowland et al., 1998*), nous avons utilisé ce test quantitatif, en plus des mesures de la prolifération lymphocytaire, pour évaluer l'efficacité biologique de la préparation liposomale. La procédure est la suivante :

- Les lymphocytes sont incubés en tubes à essai, dans du milieu RPMI 1640, à raison de 10<sup>6</sup> cellules par mL.
- Quatre conditions différentes sont évaluées, chacune étant répliquée dans 5 tubes différents. Les 4 conditions sont :
  1. Cellules contrôles, sans stimulant.
  2. Ajout de concanavaline A à raison de 10 µg/mL.
  3. Ajout de DXM libre en présence de concanavaline A à la même concentration
  4. Ajout de la préparation liposomale en présence de concanavaline A.

- La concanavaline A est laissée en présence des cellules durant 24 heures, après quoi le milieu est changé.
- Après 48 heures d'incubation, les tubes sont centrifugés à 400 g pendant 10 min à 4 °C.
- Les surnageants contenant l'interféron- $\gamma$  produit sont prélevés et congelés à -20 °C en attendant d'être utilisés.
- Les concentrations en interféron- $\gamma$  sont mesurées par un kit ELISA acheté chez Eurogenetics (Belgique). Dans ce test, les quantités d'interféron- $\gamma$  sont déterminées en U/mL en mesurant l'absorbance moyenne des 5 réplicats et en interpolant le résultat d'une droite d'étalonnage (étalons fournis avec le kit).

### 2.3.10.7 Test de coloration cellulaire au Diff-Quik

Le Diff-Quik est un set de coloration rapide qui convient bien aux cellules mono-nucléées. Les échantillons sont trempés à plusieurs reprises dans les solutions Diff-Quik et peuvent ainsi être fixés et colorés en 15 secondes seulement. En modifiant les temps de trempage dans les solutions colorantes adéquates, il est aisé de modifier les contrastes et l'intensité des colorations.

#### Réactifs :

Solution colorante I	500 ml
Eosine G en tampon phosphate à pH 6,6	1,22 g/500 ml
Solution colorante II	500 ml
Colorant Thiazine en tampon phosphate à pH 6,6	1,10 g/l
Solution fixative	500 ml
Fast Green en méthanol	0,002 g/l

Le test s'effectue comme suit :

- Verser les différentes solutions Diff-Quik dans des récipients.
- Tremper la lame où une goutte d'échantillon a été déposée (a), pendant 5 fois 1 sec, dans le réactif « Solution fixative » en laissant égoutter rapidement l'excédent à chaque fois.

- 
- Tremper la lame 5 fois une seconde dans le réactif « Solution colorante I » en laissant égoutter rapidement l'excédent à chaque fois, puis 5 fois une seconde dans le réactif « Solution colorante II » en laissant égoutter rapidement l'excédent à chaque fois.
  - Rincer la lame à l'eau distillée. Laisser sécher à l'air et examiner.

## **2.4 Mesures d'apyrogénicité et de stérilité**

### **2.4.1 Test de challenge microbiologique de filtres membrane stérilisant**

#### **2.4.1.1 Principe**

Vérifier l'absence de passage de bactéries à travers les membranes employées dans la filtration on-line des solutions : valider la stérilisation par filtration des solutions entrant dans le procédé de fabrication. Une suspension d'une souche de *Pseudomonas diminuta* contenant  $10^8$  micro-organismes par  $\text{cm}^2$  de filtre sera passée à travers le filtre utilisé. Un second filtre sera placé en série et recueillera le filtrat du premier. Ce deuxième filtre sera mis en culture sur milieu TSA (Tryptic Soy Agar) et l'absence de croissance sera vérifiée.

#### **2.4.1.2 Matériel**

- Tubes à culture
- Fil de platine recourbé en oese
- Boîtes de Pétri en polystyrène, 100 x 20 mm (Corning, réf. 25020)
- Autoclave SEC (AA-417, Manubelge)
- pH-mètre E 512 (Metrohm herisau)
- Incubateur

#### **2.4.1.3 Produits**

- *Pseudomonas diminuta* (réf. ATCC 19146)
- Tryptic Soy Agar (Sigma, réf. T-4536)
- NaCl (Merck, Art. 6404)
- Peptone (Sigma, réf. P-8388)
- Tryptic Soy Broth (Sigma, réf. T-8907)

#### 2.4.1.4 Mode opératoire

##### *Préparation de la suspension de Pseudomonas diminuta*

- repiquer la souche de la glycérine dans du milieu T.S.A., 2 fois à 24 h d'intervalle,
- identifier la souche à l'aide d'une galerie API Non E,
- réaliser une coloration de Gram.

##### *Dénombrement des cultures de 24 heures en milieu T.S.B. :*

- diluer le bouillon de culture en série logarithmique par NaCl 0,9% et peptone 0,1%,
- prélever 2 fois 1 ml des dilutions  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  M,
- couler dans des boîtes de Pétri le milieu T.S.A. stérilisé et refroidi à 45-50 °C,
- mélanger 1 ml de la suspension de *Pseudomonas diminuta* à chaque boîte,
- incuber les boîtes à 32 °C, pendant 48 heures,
- compter les colonies apparues après 48 heures,
- en déduire le nombre de micro-organismes présents dans 1 ml,
- de ce nombre, calculer le volume de suspension nécessaire à la préparation de 5 litres de sérum physiologique reprenant  $10^8$  micro-organismes par  $\text{cm}^2$  de filtre,
- filtrer ce milieu dans les mêmes conditions d'utilisation que lors de la production,
- poser le second filtre sur une boîte de TSA face "out" vers le bas,
- identifier les colonies éventuellement présentes après 120 heures : seul *Pseudomonas diminuta* peut être présent,
- une absence de toute colonie montre le bon fonctionnement de la filtration stérilisante.

##### *Caractéristiques de Pseudomonas diminuta*

- Bacille Gram négatif de petite taille ne formant pas d'assemblage particulier

- sur boîte TSA après 48 heures : colonies de surface classiques d'un blanc cassé, colonies en profondeur losangées
- sur galerie API Non E : seuls OXYDASE et CAP sont positifs après 24 ou 48 heures (code API 00 00014).

## **2.4.2 Vérification de la stérilisation**

### **2.4.2.1 Principe**

Stériliser une quantité connue de spores résistant et vérifier l'éventuelle croissance de ces spores après stérilisation.

### **2.4.2.2 Produits**

- Test SPORDI 24 (Amsco, réf. NA 015)
- *Bacillus subtilis* (réf. ATCC 9372)
- *Bacillus stearothermophilus* (réf. ATCC 12980)
- Trypticase Soy broth (Sigma, réf. T 8907)
- Eau mQ

### **2.4.2.3 Mode opératoire**

Utilisation du test de stérilisation biologique SPORDI (AMSCO). Ce test est composé de trois languettes de papier recouvertes de spores de deux micro-organismes : *Bacillus subtilis* et *stearothermophilus*.

- placer deux des languettes dans l'appareil aux endroits les moins accessibles à l'agent stérilisant, et réaliser la stérilisation,
- ôter les languettes de l'appareil et les transférer stérilement chacune dans un tube contenant 10 ml de milieu TSB (Trypticase Soy Broth),
- placer la troisième languette (non stérilisée) dans un tube identique (contrôle positif),

- incuber les tubes ainsi préparés plus un contrôle négatif (tube non inoculé) pendant 7 jours à une température de 30-35°C dans le cas de la chaleur sèche ou de l'oxyde d'éthylène, et de 60-65°C pour l'autoclave.

La stérilisation est considérée comme complète si seul le contrôle positif montre une croissance. Dans le cas d'autres tubes montrant une croissance, les micro-organismes doivent être caractérisés pour démontrer l'absence de contamination extérieure : si seuls *Bacillus subtilis* et *stearotherophilus* sont trouvés, le test doit être recommencé après réglage de l'appareil (Fig. 2.13).

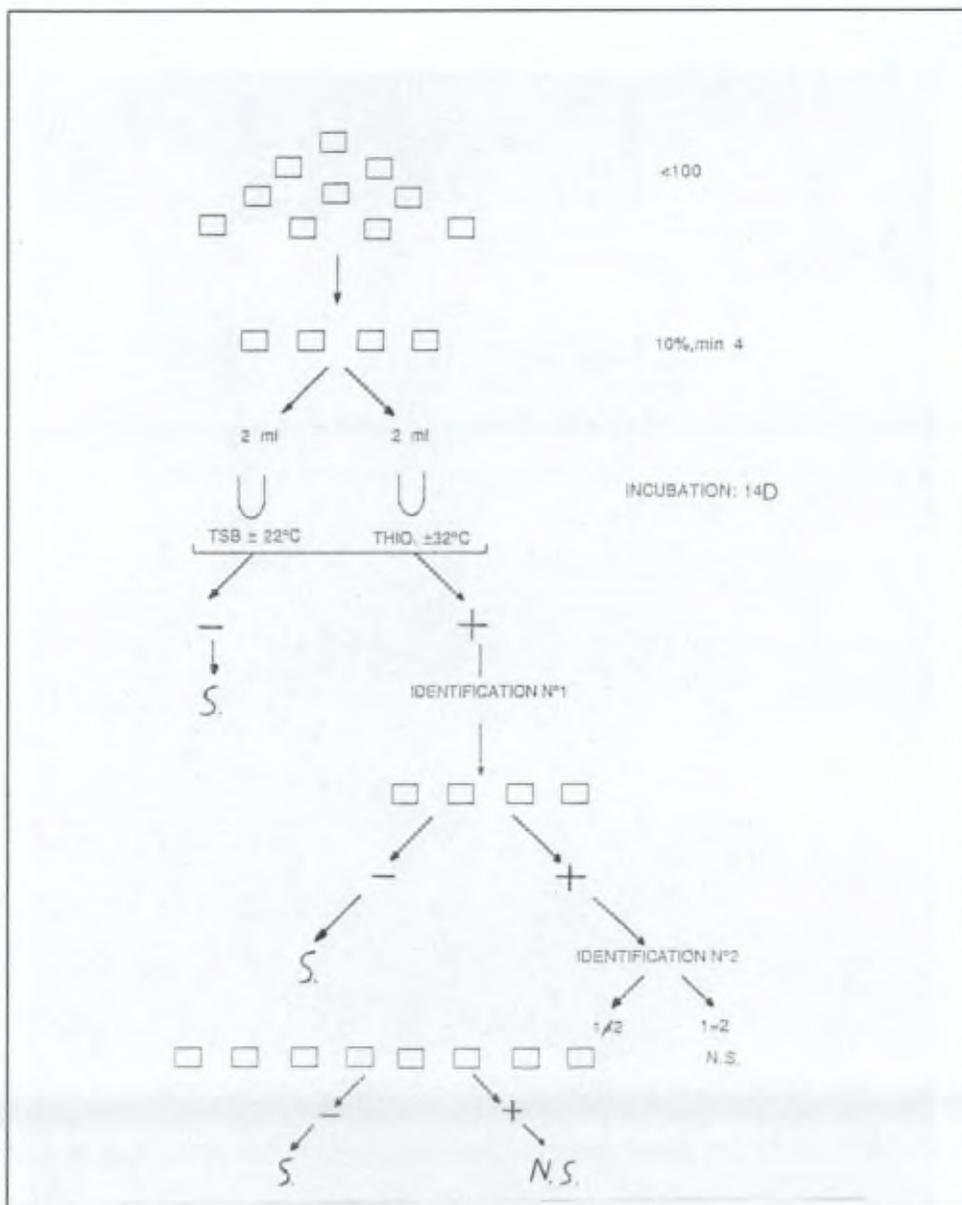
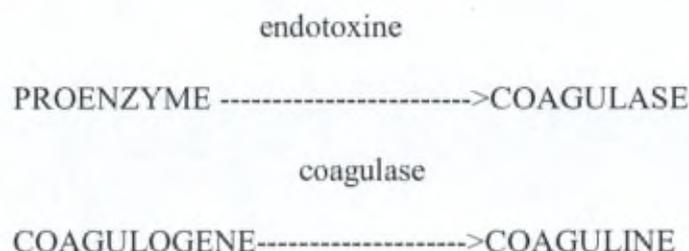


Fig. 2.13. Tableau synoptique de stérilité.

### 2.4.3 Détermination de la pyrogénicité par le test du L.A.L. (lysate d'amœbocyte de limule)

#### 2.4.3.1 Principe

Déterminer la quantité d'endotoxines présente dans une préparation injectable. Les lipopolysaccharides (LPS) sont des fragments de la membrane des bactéries Gram négatif, principalement responsables d'une augmentation de la température du corps humain après leur injection. Le test est basé sur la réaction enzymatique suivante :



La coaguline ainsi produite forme un gel.

Les procédures utilisées sont basées sur :

- a) Multi-Test, Limulus Amebocyte Lysate, PYROGENT: manuel d'utilisation .
- b) Guide pratique de la recherche et du dosage des endotoxines à l'aide du lysat d'amœbocytes de Limule, rapport d'une commission SFSTP, S.T.P. PHARMA PRATIQUES 1 (1) 51-88 1991.

#### 2.4.3.2 Définitions

- CSE : Control Standard Endotoxine : endotoxine de contrôle dont la concentration est connue exactement.
- EU : Endotoxin Unit.
- K : dose seuil d'endotoxine admise par la pharmacopée. Elle est de 5 EU/kg de poids corporel pour une injection IV, et de 0,2 EU/kg pour une injection intra-rachidienne.
- ë : Sensibilité du lysat.
- M : dose maximale injectable pour un homme de 70 kg de poids corporel. Elle est exprimé en ml/kg ou ml/kg/heure.

- MAEC : concentration maximale admissible d'endotoxines présente dans une solution injectable.
- MVD : Minimal Valid Dilution : dilution minimale d'une solution donnant un test LAL positif.
- EP : End-Point : dernière dilution produisant un test LAL positif.

#### **2.4.3.3 Matériel**

- tubes en verre de 10 ml, apyrogènes
- tubes tests LAL, apyrogènes (Whittaker, réf. n° N201)
- pipettes (10, 5, 1 ml), apyrogènes
- micropipette de 100 µl (type Eppendorf, Gilson, ...)
- tips pour micropipette, apyrogènes
- seringues et aiguilles, apyrogènes
- étuve ou bain thermostatisé non agité à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

#### **2.4.3.4 Produits**

- Lysat d'amœbocytes de Limule (LAL, Pyrogen, Whittaker, réf. n° N183)
- Endotoxines standards (Whittaker, réf. n° N186)
- Eau apyrogène (Baxter, réf. A 0304)
- HCl 0,1 M apyrogène
- NaOH 0,1 M apyrogène

#### **Remarques :**

-les pipettes plastiques emballées stérilement (FALCON, ...) sont le plus généralement apyrogènes, de même que les tips pour micropipettes. En cas de doutes, ces derniers peuvent être dépyrogénisés par un rinçage suivi d'une stérilisation à l'autoclave.

-les tubes en verre peuvent être dépyrogénisés par quatre heures de chauffage à  $180^{\circ}\text{C}$

-l'eau pour injection convient généralement pour réaliser les tests.

-HCl et NaOH 0,1 M apyrogènes sont réalisés par dilution de solutions très concentrées par de l'eau apyrogène.

#### **2.4.3.5 Mode opératoire**

##### ***Reconstitution du lysat :***

Le lysat d'amœbocyte doit être reconstitué avec soin pour éviter la formation de mousse :

- ôter entièrement la capsule métallique protégeant le bouchon du flacon de lysat,
- faire tomber au fond du flacon le maximum de lysat,
- casser le vide du flacon grâce à une aiguille stérile,
- ajouter stérilement la quantité d'eau apyrogène nécessaire à reconstituer le lysat,
- agiter le flacon avec précautions pour éviter la formation de mousse,
- conserver le flacon entre 2 et 8°C pour une utilisation directe,
- conserver le flacon à - 10°C pour une utilisation dans les 4 semaines.

##### ***Reconstitution de l'endotoxine standard :***

- casser le vide du flacon grâce à une aiguille stérile,
- ajouter stérilement la quantité d'eau apyrogène nécessaire à reconstituer le lysat,
- agiter vigoureusement le flacon (vortex) 30 minutes .

##### ***Dilution de l'endotoxine standard :***

- diluer l'endotoxine reconstituée avec de l'eau apyrogène
- agiter vigoureusement la dilution 60 secondes.

##### ***Vérification de la sensibilité du lysat :***

Ce test est à réaliser lors de changement de lot de lysat ou de fournisseur :

- préparer la série de dilutions de l'endotoxine standard suivante: 4ë, 2ë, ë, ë/2, ë/4.
- reconstituer le lysat,
- préparer 4 séries de 5 tubes tests LAL contenant 100 µl de chaque dilution (4 tubes contenant 100 µl de 4ë, 4 tubes de 2ë, etc),
- ajouter à chaque tube 100 µl de lysat d'amoebocyte,
- agiter avec précaution tous les tubes sans former de mousse,
- incuber les tubes 60 ± 2 minutes à 37 ± 1 °C,

Un résultat est positif si le tube présente un gel résistant à une rotation de 180° du tube. Tous les autres résultats sont négatifs (liquide ou gel "coulant").

- porter les résultats en tableau :

essais	4λ	2λ	λ	λ/2	λ/4	EP
1	+	+	+	+	-	λ/2
2	+	+	+	-	-	λ
3	+	+	+	-	-	λ
4	+	+	+	-	-	λ

- calculer la moyenne géométrique des EP reprenant les dernières dilutions donnant un résultat positif :

$$\text{Moyenne géométrique} = \lambda \log \left[ \frac{\prod_{n=1}^4 \log EP_n}{4} \right]$$

L'inverse de cette valeur doit être comprise entre 2ë et ë/2, elle sera employée comme nouvelle valeur de ë lors des tests.

#### *Vérification de l'inhibition de la solution :*

- a) Calcul de la MVD :

Par définition, MAEC est la concentration maximale d'endotoxines pouvant se trouver dans la solution injectable, elle est donnée par : MAEC = K / M, et est exprimée en [EU/ml] .

La MVD est donnée par : MVD = MAEC / ë.

- b) Test d'inhibition : (cf. « vérification de la sensibilité du lysat »)

- diluer la solution à tester par de l'eau apyrogène jusqu'à la MVD,
- réaliser une série de dilutions de l'endotoxine standard dans l'eau (essai H<sub>2</sub>O),
- réaliser une série de dilutions de l'endotoxine standard dans la solution diluée à la MVD reprenant les mêmes concentrations en endotoxines (essai SOL),
- réaliser le test dans les mêmes conditions que pour vérifier la sensibilité du lysat,
- lire les résultats,
- les porter en deux tableaux,

essaiH <sub>2</sub> O	4λ	2λ	λ	λ/2	λ/4	EP
1	+	+	+	-	-	λ/2
2	+	+	+	+	-	λ
3	+	+	+	-	-	λ
4	+	+	+	-	-	λ

- calculer la moyenne géométrique des EP reprenant les dernières dilutions donnant un résultat positif,

$$C_{H_2O} = A \log \left[ \frac{\lambda \sum_{n=1}^4 \log EP_n}{4} \right]$$

Essai SOL	4λ	2λ	λ	λ/2	λ/4	EP
1	+	+	+	+	-	λ/2
2	+	+	+	-	-	λ
3	+	+	+	-	-	λ
4	+	+	+	-	-	λ

- calculer la moyenne géométrique des EP reprenant les dernières dilutions donnant un résultat positif,

$$C_{SOL} = A \log \left[ \frac{\lambda \sum_{n=1}^4 \log EP_n}{4} \right]$$

CSOL doit être compris entre 2 CH<sub>2</sub>O et 0,5 CH<sub>2</sub>O pour que le produit ne soit ni inhibiteur, ni activateur.

**Test LAL :**

- ajuster le pH de la solution à tester entre 6,0 et 7,5 grâce à HCl 0,1M ou NaOH 0,1M apyrogènes,

- reconstituer le lysat ou le laisser revenir à 4°C,

- diluer par de l'eau apyrogène le produit à tester pour obtenir une série de dilutions :

4MVD 2MVD MVD MVD/2 MVD/4,

- réaliser deux séries de 5 tubes tests LAL reprenant ces différentes dilutions,

- ajouter à chaque tube 100 µl de lysat d'amoebocytes,

- agiter gentiment les tubes,

- les incuber 60 ± 2 minutes à 37 ± 1 °C,

- lire les résultats,

- les porter en tableau,

Essais	4MVD	2MVD	MVD	MVD/2	MVD/4	EP
1	+	+		-	-	MVD/2
2	+	+		-	-	MVD/2

- calculer la moyenne géométrique des EP = C :

$$C = A \log \left[ \frac{\sum_{n=1}^2 \lambda \log EP_n}{2} \right]$$

La concentration en endotoxines présente dans la solution est donnée par :

$$\frac{\lambda}{C} = \text{concentration en endotoxines en } \left[ \frac{\text{EU}}{\text{ml}} \right]$$

## **2.5 Nettoyage d'une membrane de microfiltration**

Cette procédure se trouve en Annexe I.

## **2.6 Protocole de validation de la production de liposomes**

### **2.6.1 Principe**

Valider la production de liposomes MLV selon la méthode Bangham utilisant un évaporateur rotatif pour les deux types de principes actifs (hydrophile [Rouge Ponceau, RP], hydrophobe [DMP]). Cette préparation s'effectue en trois étapes principales:

- a. Formation du film lipidique.
- b. L'hydratation.
- c. L a purification par microfiltration.

### **2.6.2 Matériel**

#### **2.6.2.1 Matériel de production**

- Hotte à flux laminaire vertical, classe 100, classe II (Gelaire TCA60)
- Evaporateur rotatif avec son ballon réactif de 1 litre (Buchi), et son corps de distribution avec SVL.
- Billes de verre (diam.: 4 mm, à raison de 20 g de billes par gramme de lipides (EPC + cholestérol))
- Tuyaux:
  - a. Silicones qualité médicale (diam.: 8 mm) (Silclear Tubing réf.: 0988)
  - b. Téflon PTFE (diam.: 4 mm) (Vel réf.: 727832)
  - c. Pharmed (diam.: 8mm) (Norton réf.: AYW42017)
  - d. En gomme beige pour vide et N2 (Vel réf.: 7233051)
- 4 robinets en verre à 3 voies avec clé en Téflon (Vel réf.: 1616678)
- Robinet en verre 1 voie avec clé en Téflon (Vel réf.: 1616512)

- 2 filtres Holders en inox (Sartorius réf.: SM 16254)
- Flacons à pénicilline en verre de type I 10-15 ml (Derco réf.: AN-B1-5-00), bouchons en butyle rouge (Derco réf.: AC-CR-20-ANT) et cape en alu trois attaches (Derco réf.: AC-A3-N20-ANT)
- Colliers de serrage 9-14 mm et 12-17 mm (Vel réf.: 7512315 et 7512320)
- Module F Carbosep (Vermo réf.: CAR20111)
- Gants stériles sans poudre (Hospitera réf.: NUT 8)
- Combinaisons Tyvek Protech (Delta Bio réf.: 79516)
- Tapis stérile (Mölnlycke Klinidrape100 réf.: 80043030)
- Pompe à membrane (KNF Liquiport ND 100)
- 2 pompes péristaltiques (Masterflex pump controller model n° 7554-50)
- Distributeur Wheaton Unispense (Delta Bio réf.: 07911-374302)

### **2.6.2.2 Matériel de préparation des produits**

- Balance analytique digitale (Sartorius réf.: LC 1200 S)
- récipient sur pied avec son bouchon
- Matras jaugés de 500 ml
- Verre à pied de 50 ml et de 500 ml

### **2.6.3 Produits**

#### **2.6.3.1 Pour le film**

- EPC ( Lipoid K.G. réf.: EPC-I T12063-1/07) à -18°C
- Cholestérol ( Merck réf.: 3670 )
- Alpha-Tocopherol Acetate ( Kremer Louward ) à -18°C
- Dichloromethane ( Merck réf.: 6049 )
- Azote ultra pur de qualité 5,5 (Air Products réf.: 5,5 B50)

### **2.6.3.2 Pour le tampon**

#### *Pour un lot Liposomes MLV*

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ( Merck réf.: 6580 )
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( Merck réf.: 4873 )
- NaCl ( Merck réf.: 6404 )
- Eau pour injection 1000 ml ( Baxter réf.: A0304)

#### *Principe actifs utilisés*

- Dexaméthasone Roussel Uclaf
- Rouge Ponceau

### **2.6.4 Mode opératoire:**

#### **2.6.4.1 Préparation de la hotte à flux laminaire vertical et des appareillages**

- Nettoyer et désinfecter la hotte la veille et après chaque production
- Désinfecter, à l'aide de désinfectant pour machine, le rotavapor, la pompe péristaltique, et le distributeur Wheaton Unispense
- introduire ces 3 appareils dans la hotte à flux laminaire vertical
- nettoyer et désinfecter les colliers de serrage en inox et les introduire dans la hotte à flux laminaire vertical
- fermer la hotte et allumer les U.V.pour la nuit

#### **2.6.4.2 Préparation du film lipidique**

S'effectue le lendemain de la stérilisation

#### *Pesées*

Celles-ci s'effectuent dans la chambre ultra propre sur la balance analytique digitale, comme suit:

a) Matériel

- Spatule, produits ( Egg PC, Cholestérol, Alpha-T, DMP, Rouge Ponceau)
- Feuille de pesée (voir annexe n°2)
- Récipient sur pied avec son bouchon

Mettre-le tout dans un bac et entrer dans le sas

b) Mode opératoire

- Se laver les mains et les avant-bras dans le sas,
- s'habiller, mettre la combinaison propre, des gants sans poudre et un masque,
- rentrer dans la chambre ultra propre avec tout le matériel de pesée,
- s'asseoir à la table de pesée,
- allumer la balance analytique et retirer le couvercle,
- tarer le récipient sur pied,
- peser l'Egg PC, noter la valeur sur la feuille de pesée et tarer,
- peser le cholestérol, noter la valeur et tarer,
- peser l'alpha-tocophérol, noter la valeur et tarer,
- peser la Rouge Ponceau, noter la valeur,
- Dissoudre-le tout dans plus ou moins 50 ml de dichlorométhane,
- ranger, mettre la hotte en conditionnement pendant au moins 1/2 heure (ouvrir celle-ci en éteignant les U.V., allumer le flux, brancher les fiches des pompes ),
- sortir.

***Production***

*1ère phase film lipidique ( après le montage ) :*

remplir le ballon d'alimentation de la solution lipidique:

- après évaporation du dichlorométhane couper graduellement l'azote,
- laisser soutirer jusqu'au lendemain (minimum 18 heures).

*2<sup>ème</sup> phase, l'hydratation :*

a. Préparation de 500 ml de tampon phosphate à pH=8,1

- Peser les composantes sur la balance digitale comme suit:

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                    5,716 g

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                    0,168 g

- NaCl                         2,250 g

- Dissoudre-le tout dans 500 ml d'eau pour injection et filtrer sous 0,2 µm (vérifier le pH et l'osmolalité (solution isotonique),
- Couper le vide et remplir l'appareillage d'azote pour rétablir la pression interne,
- Remplir le ballon de 350 ml de solution tampon à l'aide d'un verre à pied,
- Enclencher la pompe péristaltique et purger le filtre,
- Commencer l'agitation qui dure 1 heure avec des intervalles d'arrêts de 15 min.

Lorsque les liposomes sont formés commencer le processus de µF:

- Actionner la pompe péristaltique, et laisser tourner pendant une heure
- Remplir les flacons de 20 ml de dispersion liposomes purifiés

### 3. Résultats et discussion

Les travaux relatifs à cette thèse ont notamment fait l'objet de deux publications dans des revues internationales à comité de lecture :

**Benameur H, De Gand G, Brasseur R, Van Vooren JP, Legros FJ.** (1993) Liposome-incorporated dexamethasone palmitate : chemical and physical properties. *Int J Pharm.* 89:157-167.

**Benameur H, Latour N, Schandene L, Van Vooren JP, Flamion B, Legros FJ.** (1995) Liposome-incorporated dexamethasone palmitate inhibits in vitro lymphocyte response to mitogen. *J Pharm Pharmacol.* 47:812-817.

et du dépôt d'un brevet :

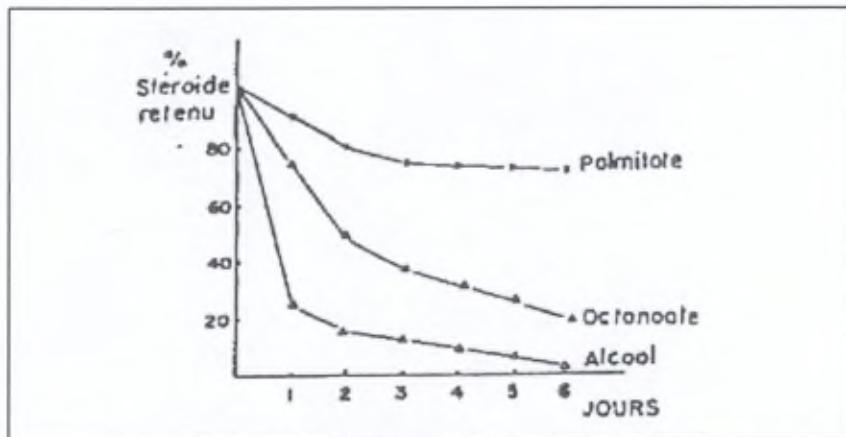
**Benameur H, Moës A.** (2001) Liposomes preparation method and plant. *US Patent # 6,217,899.*

Le but de notre travail consiste à améliorer l'efficacité d'encapsulation liposomale de la **dexaméthasone (DXM)**, un des plus puissants dérivés corticoïdes antiinflammatoires, et à prouver l'efficacité de la préparation obtenue. L'encapsulation sera étudiée en fonction de la concentration en DXM et des différents rapports molaires en lipides (EPC/cholestérol). On peut prévoir que la DXM native, comme tous les glucocorticoïdes, présentera une efficacité d'encapsulation très faible, étant donné sa haute perméabilité dans les bicouches lipidiques (*Gulati et al., 1998*). Des essais préliminaires ont confirmé cette prévision, l'incorporation de DXM native en liposomes EPC/cholestérol ne dépassant pas 2 % (cf. plus loin). En nous référant à la littérature et en tenant compte du fait que les molécules liposolubles s'enchâssent aisément entre les phospholipides, nous avons alors cherché un modèle où la DXM serait rendue plus hydrophobe grâce à l'adjonction d'une longue chaîne hydrocarbonée.

Le plus souvent, les dérivés hydrophobes des corticoïdes ont été obtenus en greffant à la molécule originale une longue chaîne hydrocarbonée de type octanoyl (8 atomes de carbone [C8]), lauryl (C12), myristyl (C14) ou palmitoyl (C16). Cette chaîne assure l'insertion du

principe actif dans la bicouche lipidique. Cette méthode a été appliquée essentiellement sous forme d'esters alkylés du cortisol (*Shaw et al., 1976; Fildes et al., 1978; de Silva et al., 1979; Cleland et al., 1982*), de la cortisone (*Arrowsmith et al., 1983*), et du triamcinolone acétonide (*Goundalkar & Mezei, 1984*). Cependant, toutes ces préparations liposomales ont été conçues il y a plusieurs années, et aucune d'entre elles n'a été testée en vue d'une administration pulmonaire. Vu leur structure, la plupart ne conviendraient pas à cette application.

Notre choix s'est porté sur un ester palmitate de la DXM. En effet, il a été démontré que la rétention liposomale du cortisol palmitate était supérieure à celle d'un octanoate (*Shaw et al., 1976; Fig. 3.1*). En collaboration avec les pneumologues de l'hôpital universitaire Erasme, notre choix s'est porté sur le **palmitate de dexaméthasone (DMP)**. Cette pro drogue n'étant pas commercialisée, nous devons dès lors le synthétiser afin de démontrer la faisabilité de l'encapsulation liposomale. La dexaméthasone étant un alcool notre choix s'est porté sur la réaction de Fisher : un alcool plus un acide donne un ester plus de l'eau (*Benameur et al., 1994*). En parallèle nous avons effectué avec le professeur Moës la recherche d'une société pharmaceutique susceptible de nous fournir la dexaméthasone palmitate selon les BPF pharmaceutiques. Roussel nous a gracieusement fourni 10g de DMP synthétisée et purifiée selon leurs procédures opératoires standardisées. Ce produit n'a jamais été commercialisé par Roussel.



**Fig. 3.1.** Rétention du cortisol, cortisol octanoate et palmitate dans des liposomes en fonction du temps résultats obtenus par *Shaw et al., 1976*.

### 3.1 Mesures physico-chimiques relatives à la DXM et au DMP

#### 3.1.1 Couplage entre la DXM et le chlorure de palmitoyl

Pour obtenir suffisamment de DMP, nous avons utilisé 15,0 g de DXM et 32,0 g de chlorure de palmitoyl (cf. *METHODES*). Le rendement chimique de la réaction a été de 68,7 %.

En ce qui concerne le couplage de la DXM radioactive avec le chlorure de palmitoyl, nous avons mesuré le rapport entre les cpm de départ et ceux du D\*MP radioactif purifié. Ce rapport était de 98 %.

Afin de contrôler l'estérification de la molécule, un premier examen en spectroscopie infrarouge en phase liquide (film dans du solvant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) a été effectué. Il révèle la présence de la bande de vibration du carbonyle d'ester à  $\nu_{\text{carbonyl}} = 1740 \text{ cm}^{-1}$  (**Fig. 3.2**). Ce spectre a été comparé à celui de la DXM.

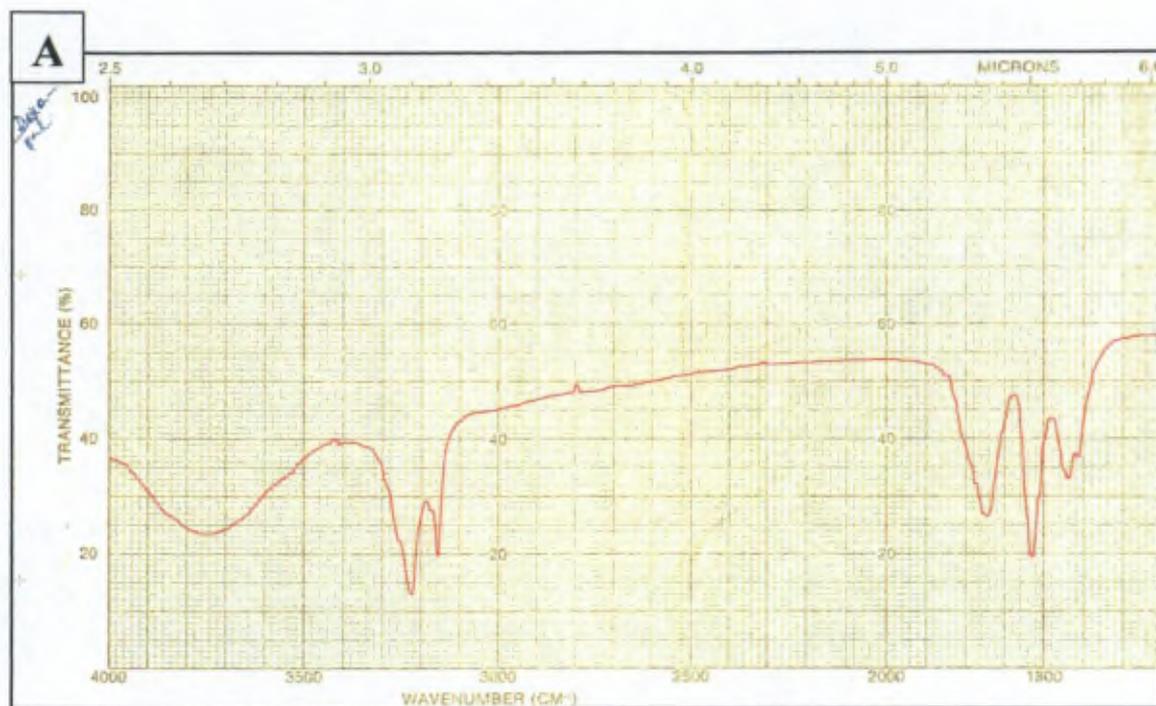


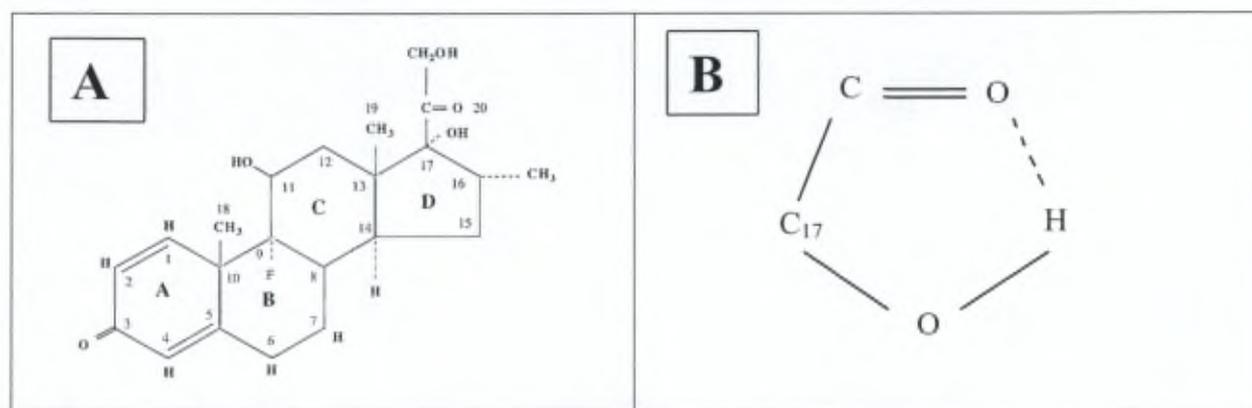
Fig. 3.2. A) Spectre infrarouge mesuré de la DMP synthétisée



Fig. 3.2 B) spectre IR de la DXM utilisée pour la synthèse.

Cependant, cet examen ne permet pas de lever l'ambiguïté concernant la détermination de la position du groupe palmitate dans la molécule. En effet, pas moins de trois fonctions hydroxyliques de la DXM sont susceptible de réagir avec le chlorure de palmitoyl. Deux d'entre elles ont toutefois moins de probabilité de le faire.

Ainsi, il est raisonnable de penser que la réaction au niveau de l'hydroxyle porté par le carbone n° 17 est entravée par effet stérique et par l'existence possible d'un lien hydrogène intramoléculaire dans un cycle à 5 centres, favorable en chimie organique (**Fig. 3.3**).



**Fig. 3.3.**

A) Structure de la dexaméthasone.

B) Pont hydrogène intramoléculaire à hauteur du C<sub>17</sub>.

Quant à l'hydroxyle porté par le carbone n° 11, il s'agit d'une fonction alcool secondaire par opposition à la fonction alcool primaire du carbone n° 21 (CH<sub>2</sub>OH), située elle-même en  $\alpha$  d'une fonction cétonique plus réactive.

Afin de lever cette ambiguïté et de confirmer l'estérification en position 21, des spectres de résonance magnétique nucléaire protonique à 250 MHz du DMP et de la DXM ont été mesurés dans le solvant CDCl<sub>3</sub>. Le triméthylsilane (TMS) était pris comme référence (**Figs. 3.4 et 3.5**). Les spectres de la RMN protonique et de la RMN en <sup>13</sup>C de la DMP fournie par Roussel sont également montrés (**Figs. 3.6 et 3.7**).

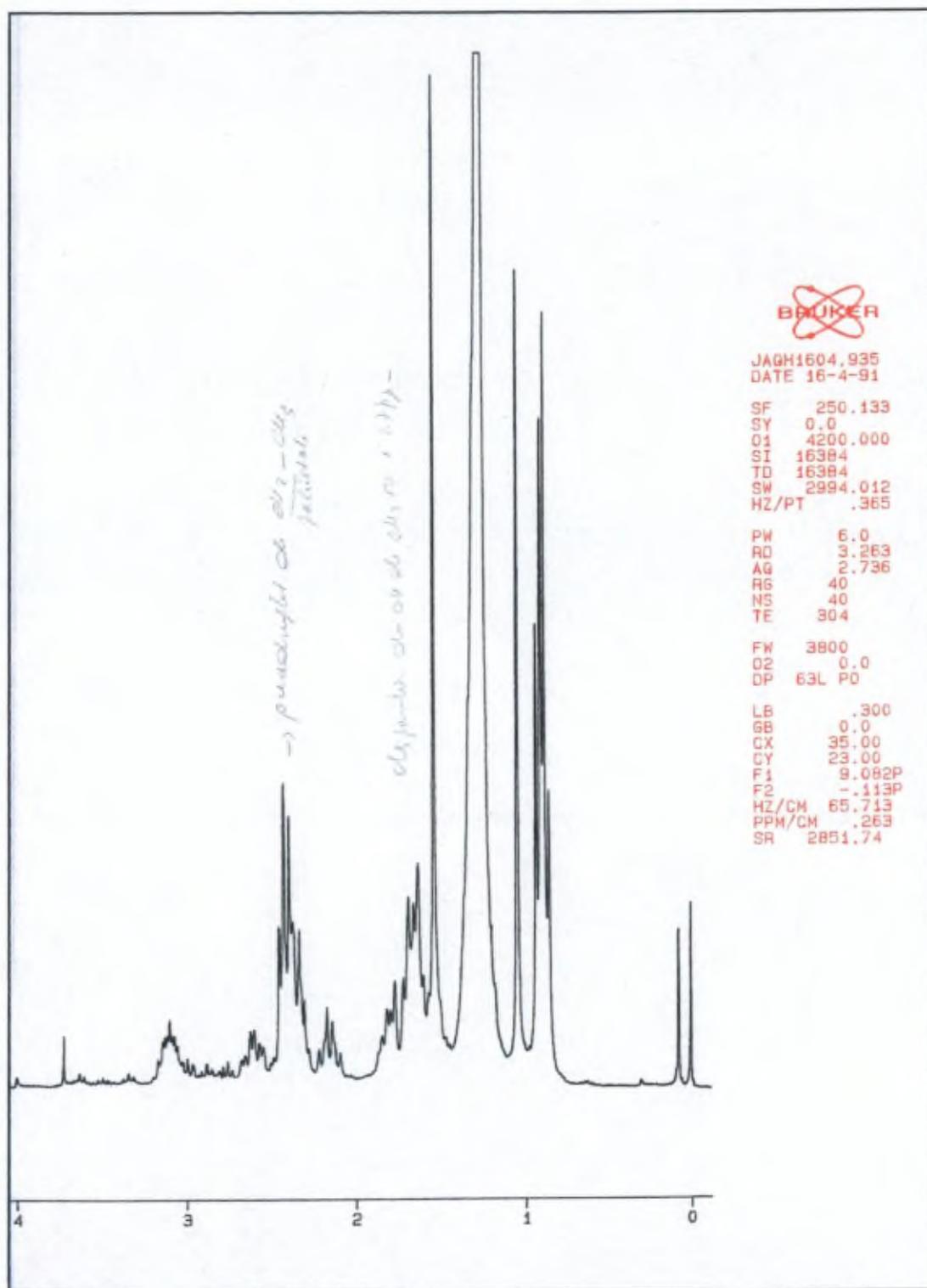


Fig. 3.4. Spectre RMN protonique de la DMP synthétisée

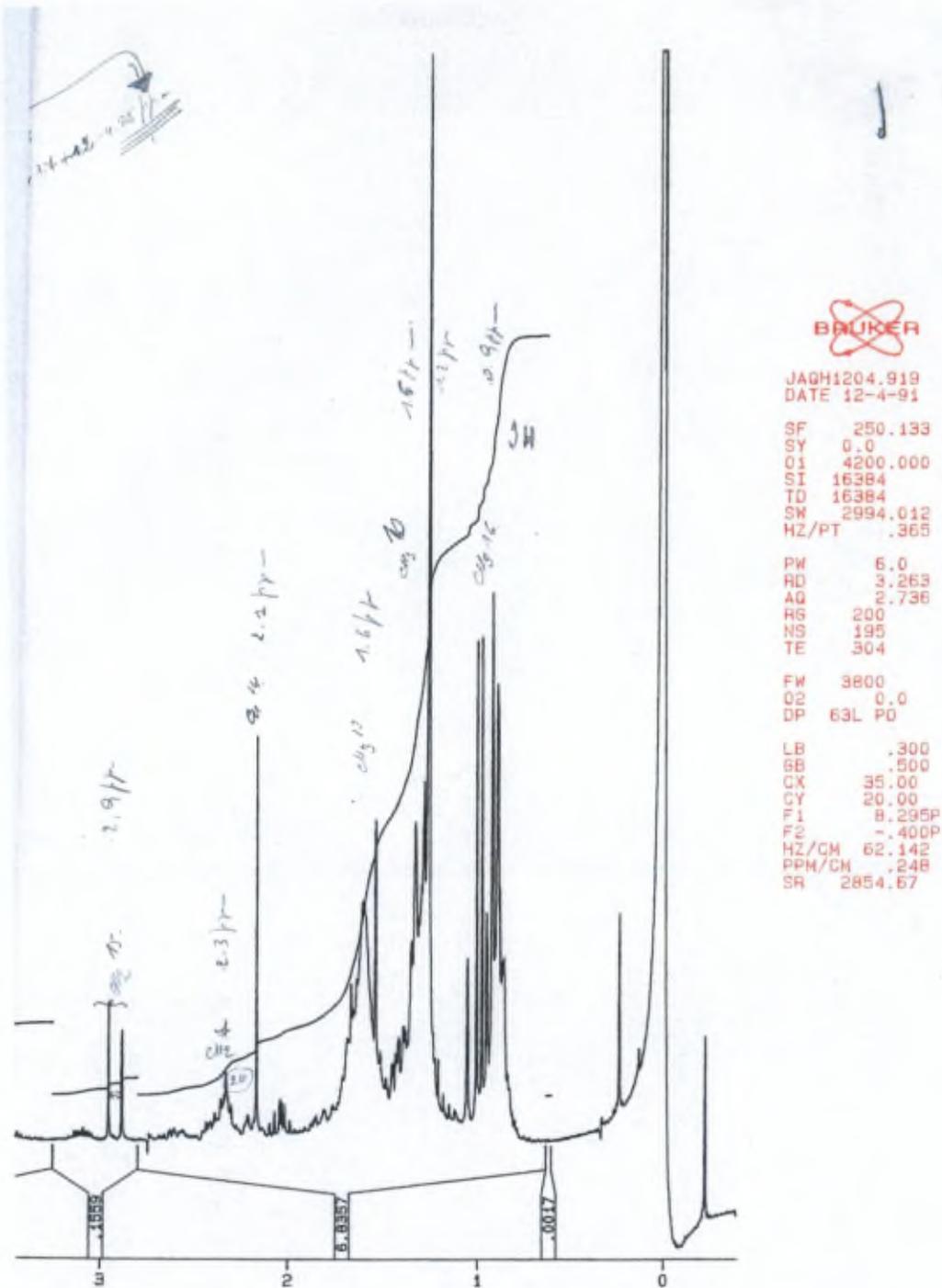


Fig. 3.5. Spectre RMN protonique de la DXM utilisée pour la synthèse

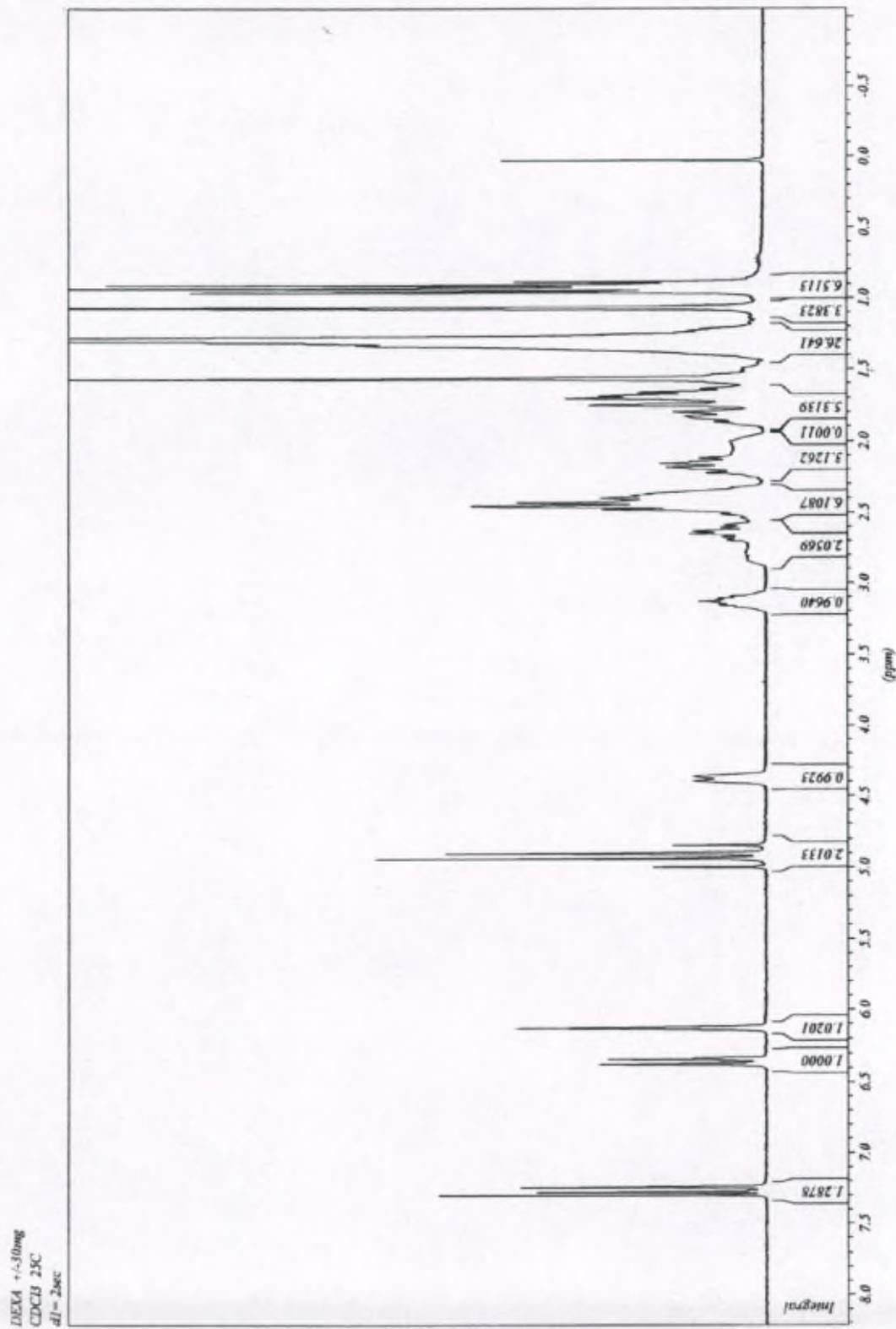


Fig. 3.6. Spectre RMN protonique de la DMP fournie par Roussel.

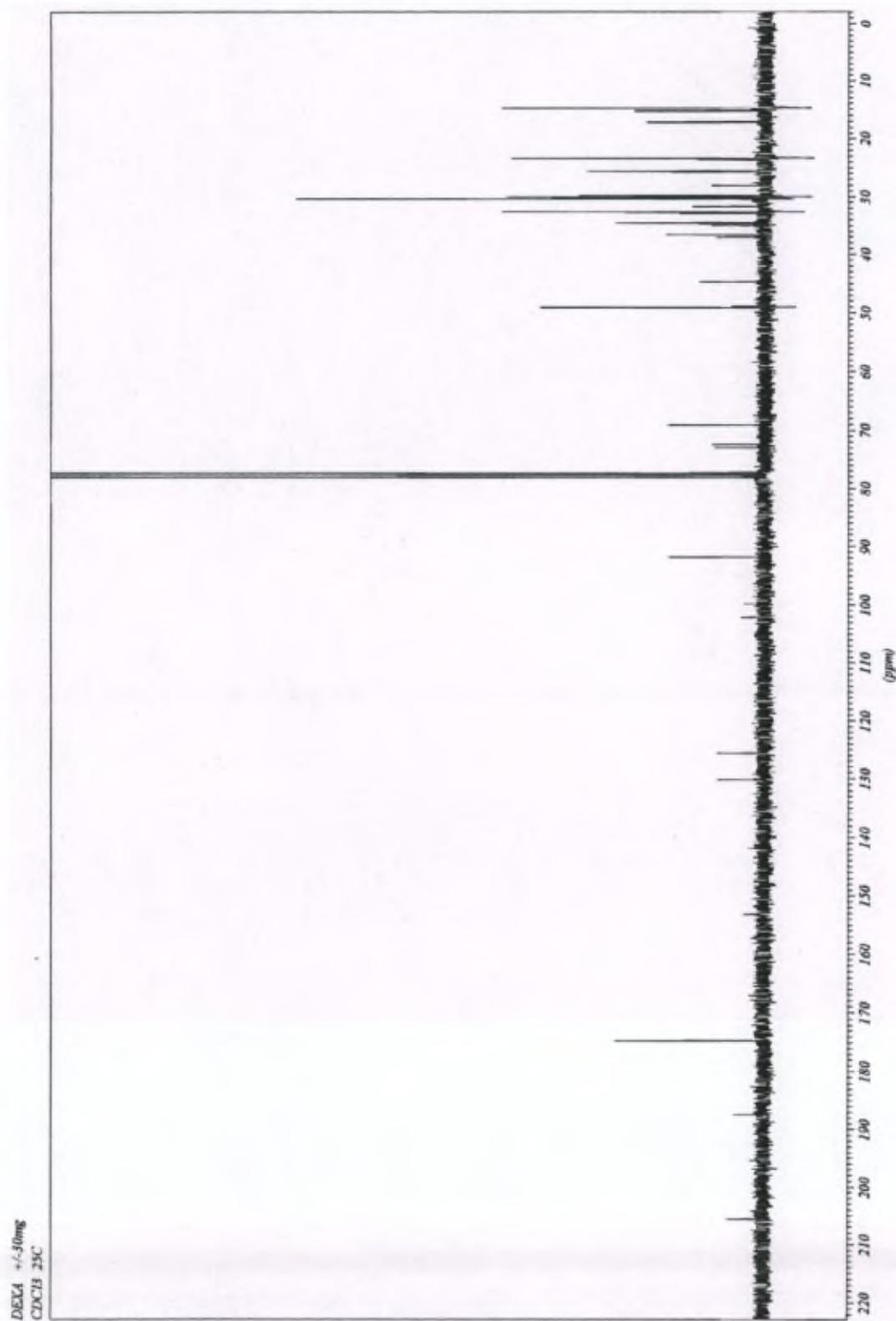
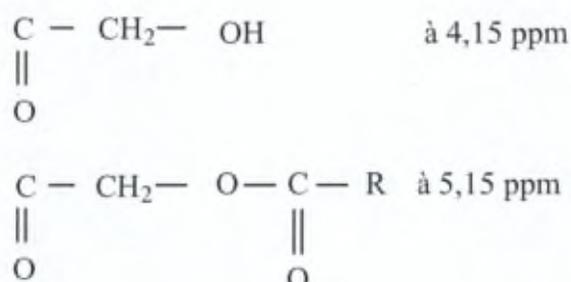


Fig. 3.7. Spectre de la DMP fournie par Roussel UCLAF, en résonance magnétique nucléaire du  $^{13}\text{C}$ .

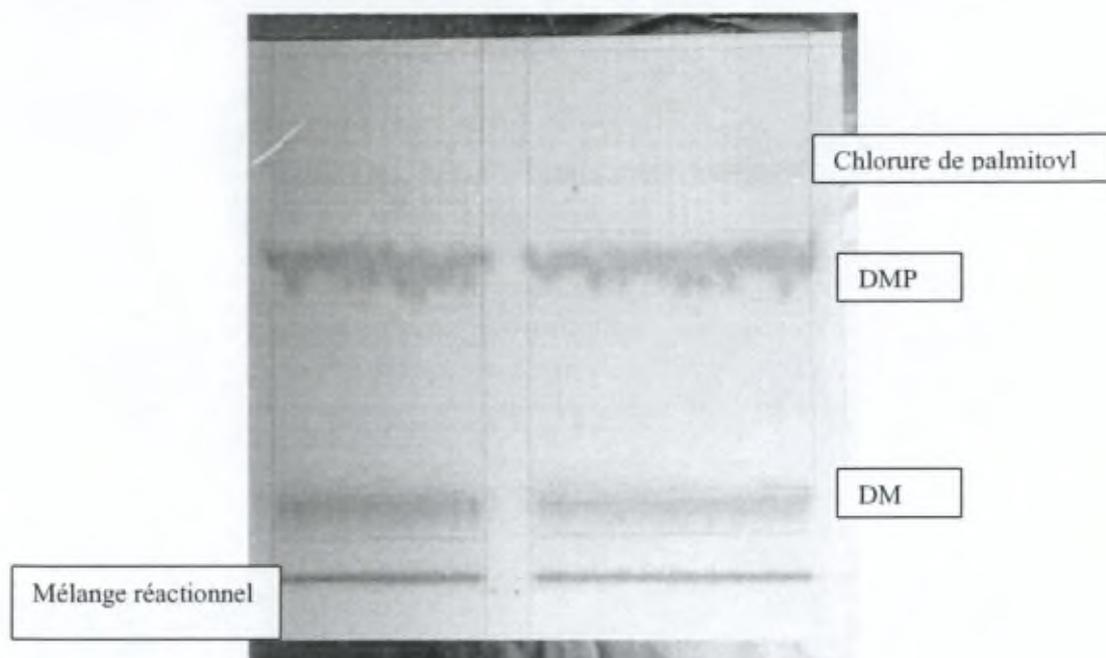
A l'examen des spectres RMN du proton et du carbone 13 figures 3.4 et 3.5, le déplacement chimique de CH<sub>2</sub> en position 21, porteur du groupe palmitate à 5 ppm, singulet comme attendu et interférant sur deux protons, confirme le bon déroulement de la réaction à savoir la fixation du palmitate en position 21 et non 17. Ces valeurs observées semblent également en accord avec les valeurs calculées selon la règle de Shoolery, à savoir :



L'apparition du singulet à 5 ppm est en accord avec la disparition concomitante du pic à 4,6 ppm ( $\delta [\text{CH}_2]^{21} - \text{OH}$ ).

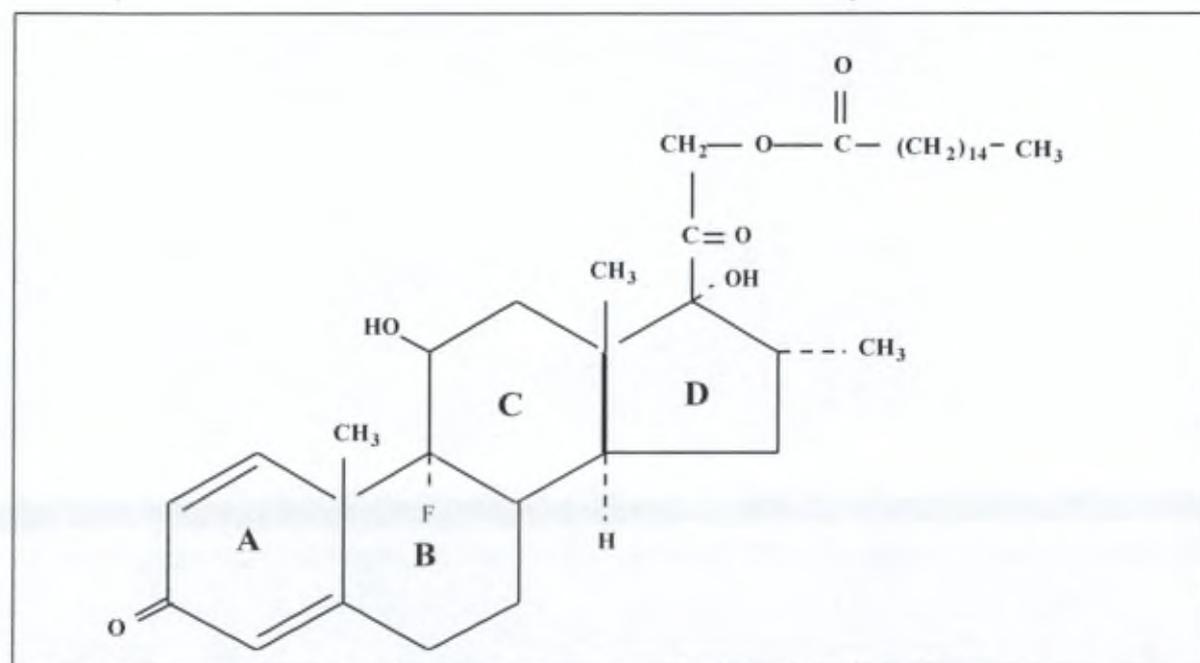
Quant au groupement palmitate, celui-ci est clairement visualisé dans le spectre au niveau des déplacements chimiques du groupe méthyle à 1 ppm et méthylénique à 1,3 ppm.

Une confirmation nous est également apportée par l'examen du comportement en chromatographie sur couches minces de gel de silice CCM: en effet, le composé estérifié migre avec le front de solvant apolaire son R<sub>f</sub> est supérieur à celui de la DXM le mélange réactionnel hydrophile reste sur la ligne de base.(Fig. 3.8).



**Fig. 3.8.** Photographie du résultat de la chromatographie sur couches minces de la DMP éluée dans le mélange chloroforme éthyle acétate 1/1 (V/V).

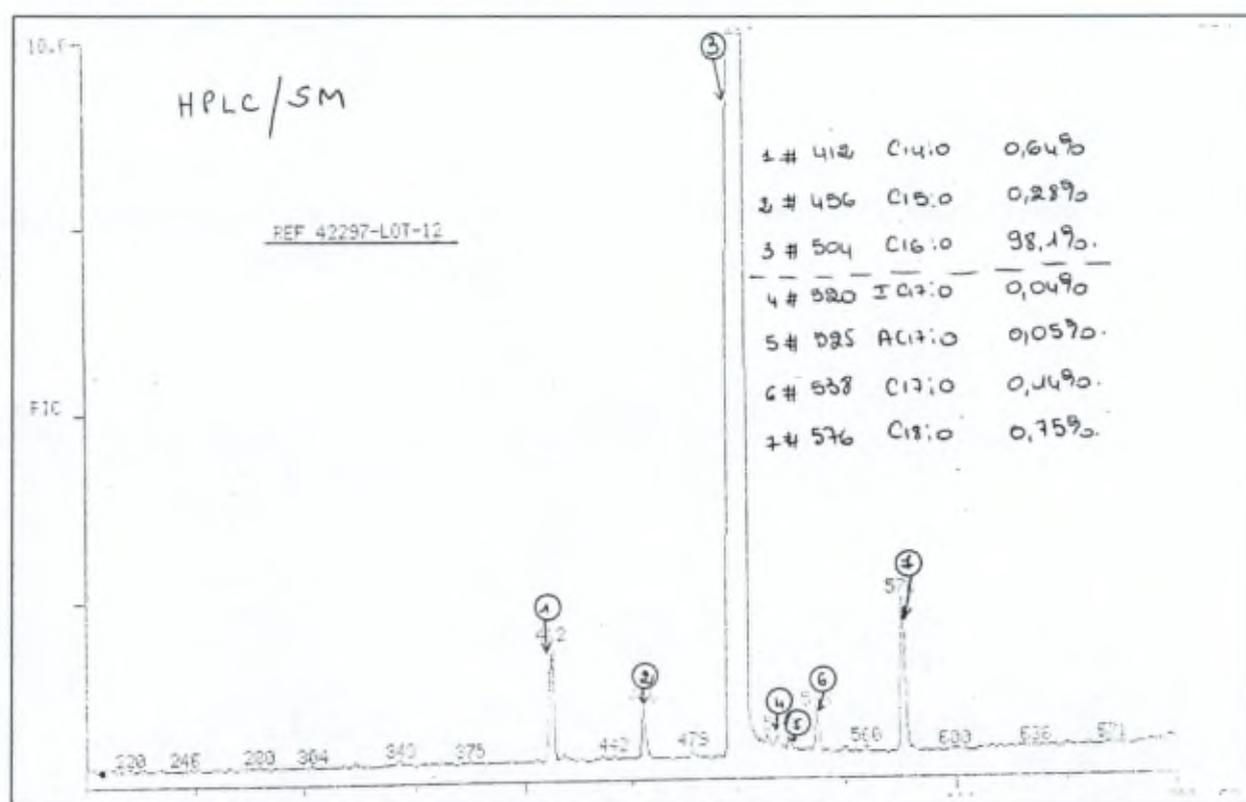
A ce stade, nous pouvons conclure avec suffisamment de certitude que le DMP obtenu possède la formule développée indiquée dans la **Fig. 3.11** ci-dessous. A partir de là, nous avons examiné les caractéristiques physico-chimiques du DMP en référence à ceux de la DXM.



Dexaméthasone-21 palmitate (DMP) synthétisé.

De plus grâce à la dexaméthasone-21-palmitate obtenue de Roussel Uclaf dont une copie du certificat d'analyse du 21-palmitate de dexaméthasone RU 42297, recontrôlé en 1995, est présenté dans la section « MATERIEL ET METHODES » nous avons confirmé que notre composé migre avec un  $R_f$  identique au  $R_f$  à ce produit considéré comme référence.

Ce produit est utilisé dans les parties encapsulations et études biologiques. De plus nous avons obtenu de Roussel Uclaf les chromatogrammes suivants indiquant la pureté en acide gras HLC couplé à un spectre de masse et la pureté de la DMP par HPLC phase inverse. Les résultats sont montrés dans les **Figs. 3.9 et 3.10**. Pour des raisons de confidentialité nous n'avons pas obtenu la méthode et les produits utilisés pour la synthèse de la DMP de Roussel. Nous utiliserons donc la DMP de Roussel dans notre étude et la DMP radioactive synthétisée par nos soins suivant la méthode développée ci dessus.



**Fig 3.9** Chromatogramme HPLC – MS pureté de la DMP

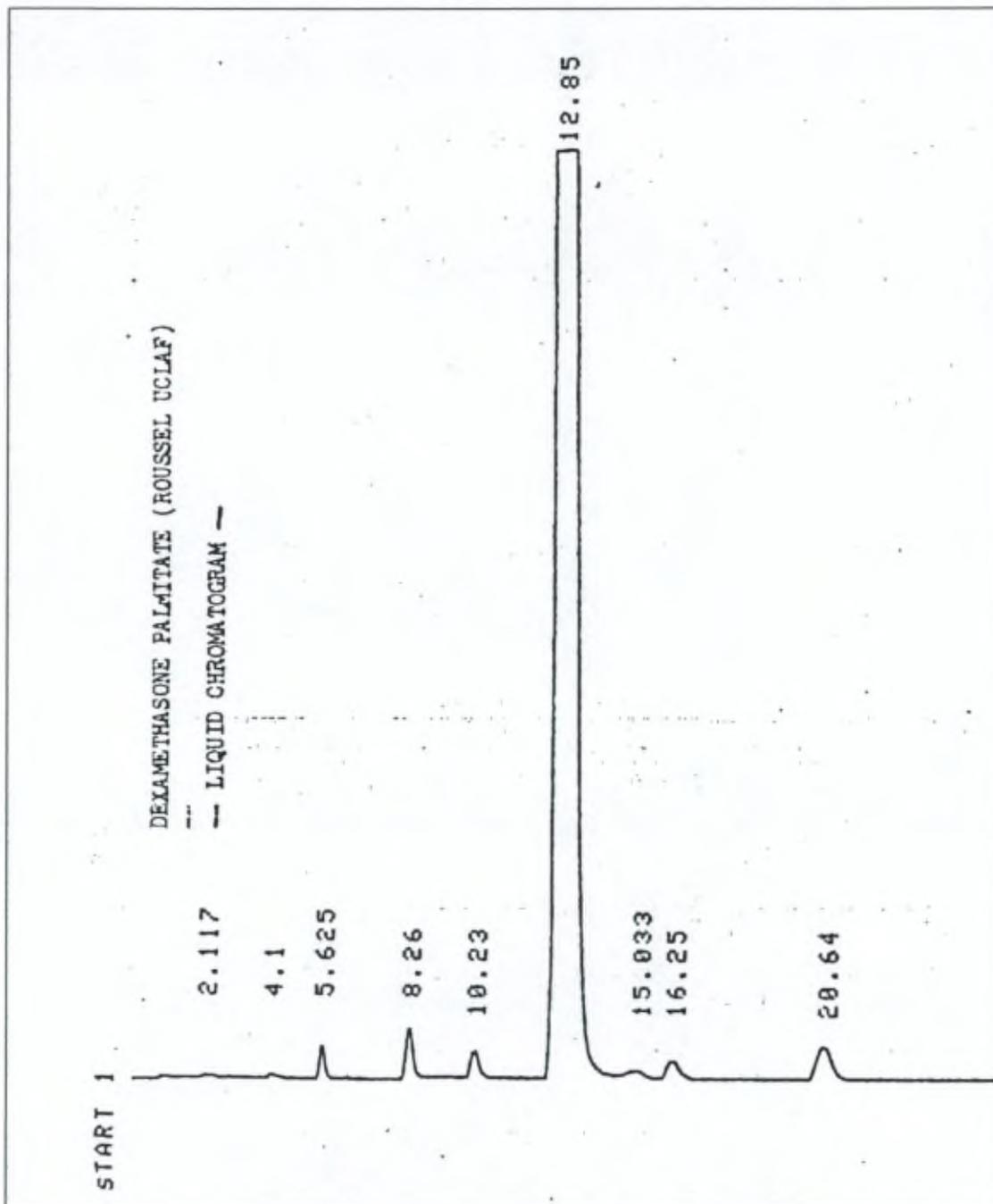
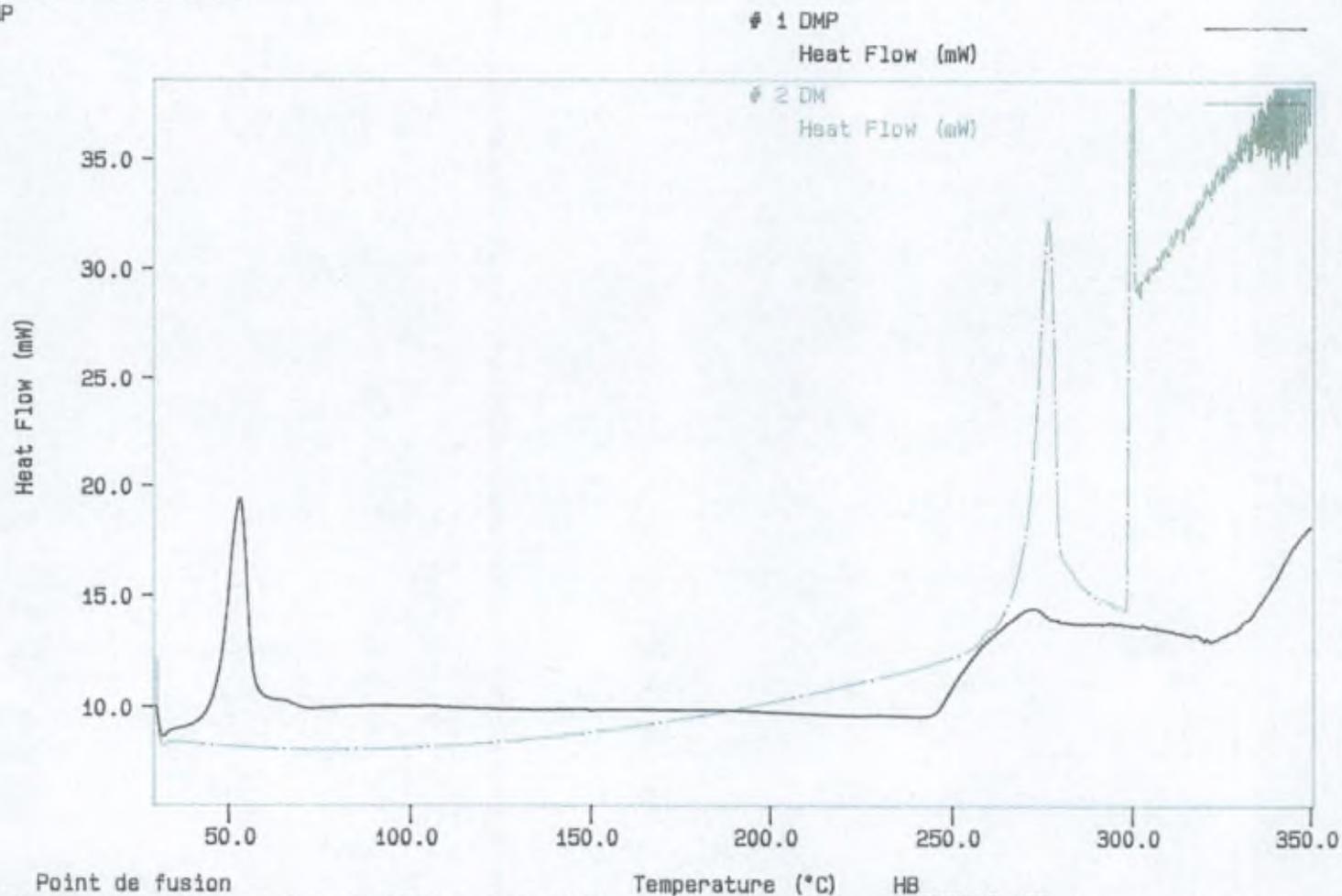


Fig 3.10 Chromatogramme HPLC Pureté DMP

### 3.1.2 Analyse enthalpique différentielle (DSC) du DMP

La DSC a été utilisée afin de déterminer le point de fusion du DMP et de le comparer avec celui de la DXM, qui est de 253 °C (**Fig. 3.12**). Le point de fusion du DMP est de 53 °C, soit 200 °C de moins que celui de la DXM native. Cette différence n'est pas surprenante, car il est connu que les esters d'alcools primaires possèdent des points de fusion nettement inférieurs à ceux de la forme non estérifiée. De plus, nos résultats concordent avec ceux de *Mitsunobu et al.* (1989) qui ont comparé deux formes cristallines de DMP avec un endotherme compris entre 49°C et 68 °C pour une vitesse de balayage de 10°C/min.

Curve 1: DSC  
File info: DMP1PFA Mon Apr 25 21:26:49 1994  
Sample Weight: 5.640 mg  
DMP



Point de fusion  
TEMP: 30.0 C TIME: 0.0 min RATE: 10.0 C/min  
TEMP: 300.0 C TIME: 0.0 min

HB  
PERKIN-ELMER  
7 Series Thermal Analysis System  
Tue Apr 26 00:04:01 1994

Fig. 3.12. DSC de la DXM et du DMP.

### 3.1.3 Solubilité de la DXM et du DMP

#### 3.1.3.1 Méthode UV

##### a) Courbe étalon pour la DXM (Fig. 3.13)

La longueur d'onde de travail au pH 7,4 dans le tampon phosphate est de 239 nm. Cette longueur d'onde est une caractéristique de la dexaméthasone.  $\epsilon = 15150$ .

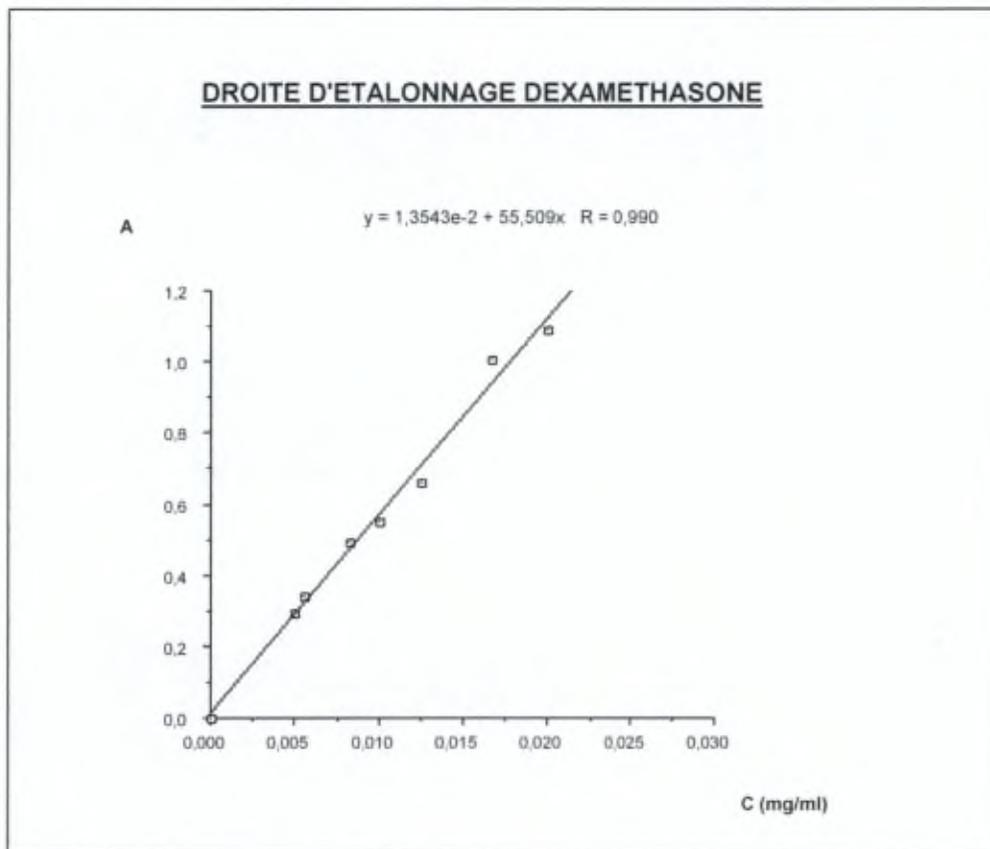


Fig. 3.13. Droite d'étalonnage de la dexaméthasone par méthode UV.

##### b) Mesure de solubilité de la DXM

La solubilité de la DXM est facilement estimée à la vue de la Fig. 3.14. On remarque une variation de la linéarité à partir de 60  $\mu\text{g/ml}$ . Par conséquent, on peut affirmer que la DXM est soluble dans le tampon phosphate jusqu'à une concentration de 60  $\mu\text{g/ml}$  maximum (la concentration saturante référencée est de 100  $\mu\text{g/ml}$  dans l'eau à 25°C).

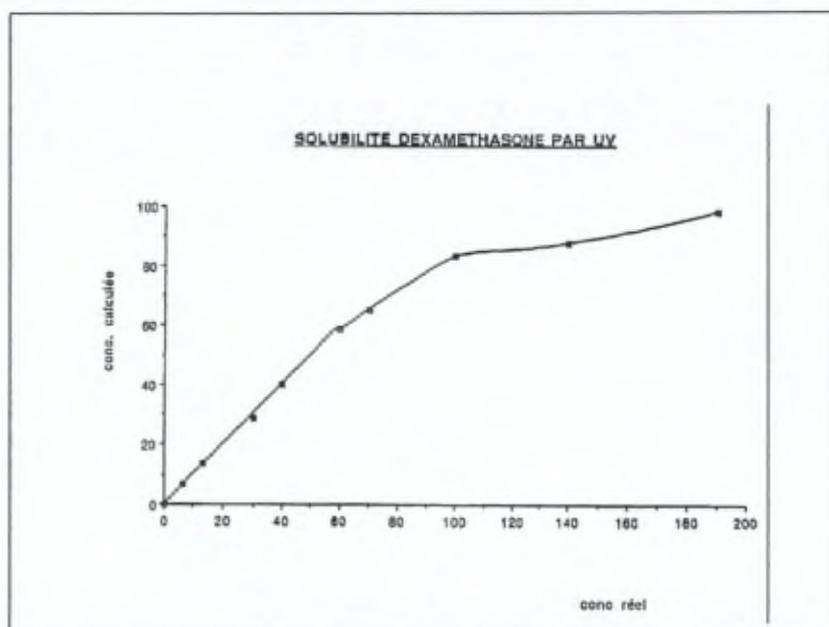


Fig. 3.14. Solubilité de la dexaméthasone par spectroscopie UV.

### 3.1.3.2 Comptage $\beta$

Cette deuxième méthode de dosage (Fig. 3.15) confirme les résultats obtenus par la méthode spectrométrique. La DXM a une solubilité maximum de 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

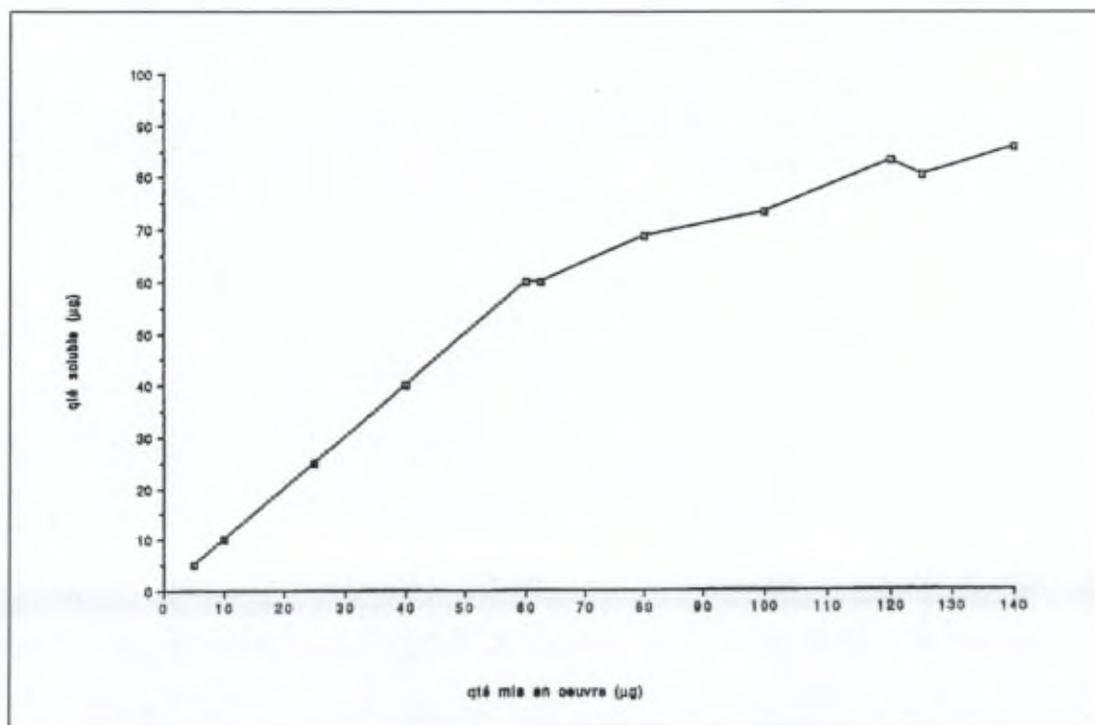


Fig. 3.15. Solubilité de la dexaméthasone par comptage  $\beta$ .

### 3.1.3.3 Solubilité du DMP

La méthode UV et la méthode par comptage  $\beta$  ont été appliquées à la détermination de la solubilité maximale du DMP. Celle-ci s'est montrée très faible, de l'ordre de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , c'est à dire mille fois moins que celle de la DXM. Par conséquent, nous ne pouvons pas débiter les essais d'encapsulation dans ces zones de concentration. Le DMP devra donc être dissous dans la phase organique lors de la préparation des films lipidiques. Pour cela, nous devons connaître le coefficient de partage octanol-eau du DMP.

### 3.1.4 Coefficient de partage *n*-octanol-eau

Le coefficient de partage octanol -tampon a été choisi parce qu'il peut représenter la lipophilie de la molécule. Il a été déterminé selon le mode opératoire développé dans matériel et méthode p. 129(**Tableau 3.1**).

**Tableau 3.1.** Coefficient de partage octanol-eau du DMP.

<i>Phase organique (cpm)</i>	<i>Phase aqueuse (cpm)</i>	<i>Qté dans l'eau (%)</i>	
7006,42	122,51	1,75	
7307,80	99,06	1,36	
7126,96	84,56	1,19	
6989,04	113,88	1,63	
7196,57	118,31	1,64	
7287,22	101,55	1,39	
7076,87	88,03	1,24	
6729,14	111,10	1,65	
7313,80	116,29	1,59	
7274,85	95,84	1,32	
7273,45	87,35	1,20	
<b>MOYENNE</b>	<b>MOYENNE</b>	<b>MOYENNE</b>	<b>Déviation standard</b>
<b>7089,59</b>	<b>101,37</b>	<b>1,43</b>	<b>0,26</b>

De plus grâce à la dexaméthasone-21-palmitate obtenue de Roussel Uclaf dont une copie du certificat d'analyse du 21-palmitate de dexaméthasone RU 42297, recontrôlé en 1995, est présenté dans la section « MATERIEL ET METHODES » nous avons confirmé que notre composé migre avec un  $R_f$  identique au  $R_f$  à ce produit considéré comme référence.

Ce produit est utilisé dans les parties encapsulations et études biologiques. De plus nous avons obtenu de Roussel Uclaf les chromatogrammes suivants indiquant la pureté en acide gras HLC couplé à un spectre de masse et la pureté de la DMP par HPLC phase inverse. Les résultats sont montrés dans les **Figs. 3.9 et 3.10**. Pour des raisons de confidentialité nous n'avons pas obtenu la méthode et les produits utilisés pour la synthèse de la DMP de Roussel. Nous utiliserons donc la DMP de Roussel dans notre étude et la DMP radioactive synthétisée par nos soins suivant la méthode développée ci dessus.

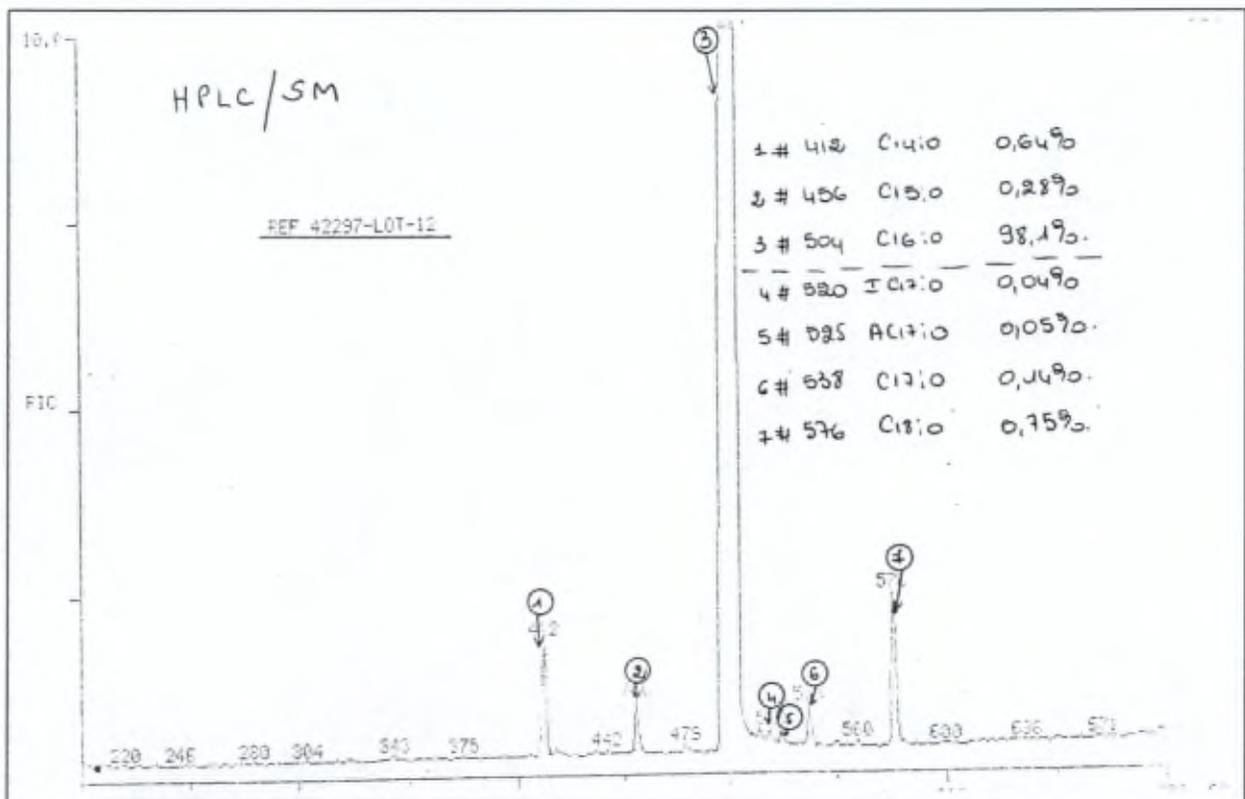


Fig 3.9 Chromatogramme HPLC – MS pureté de la DMP

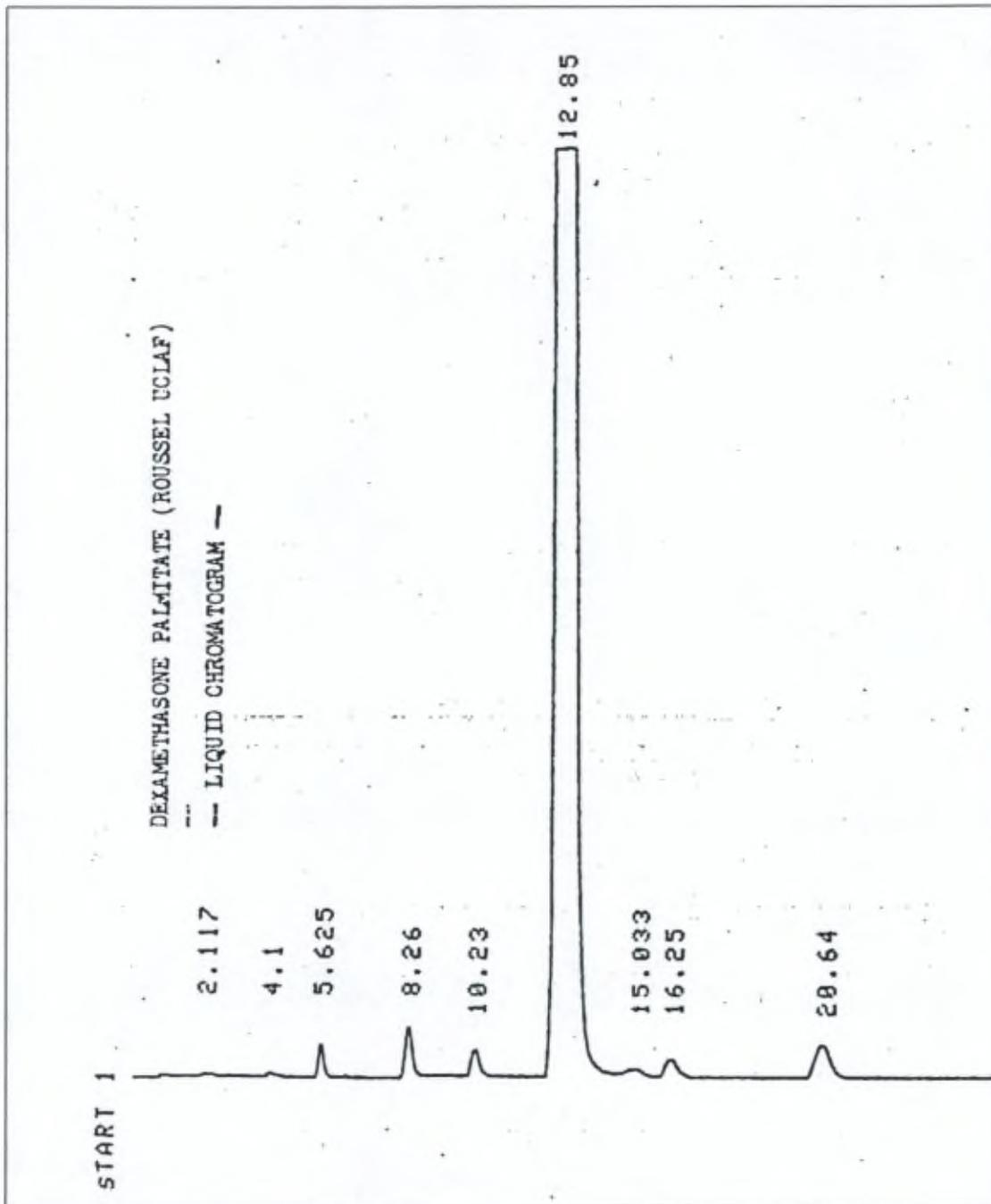
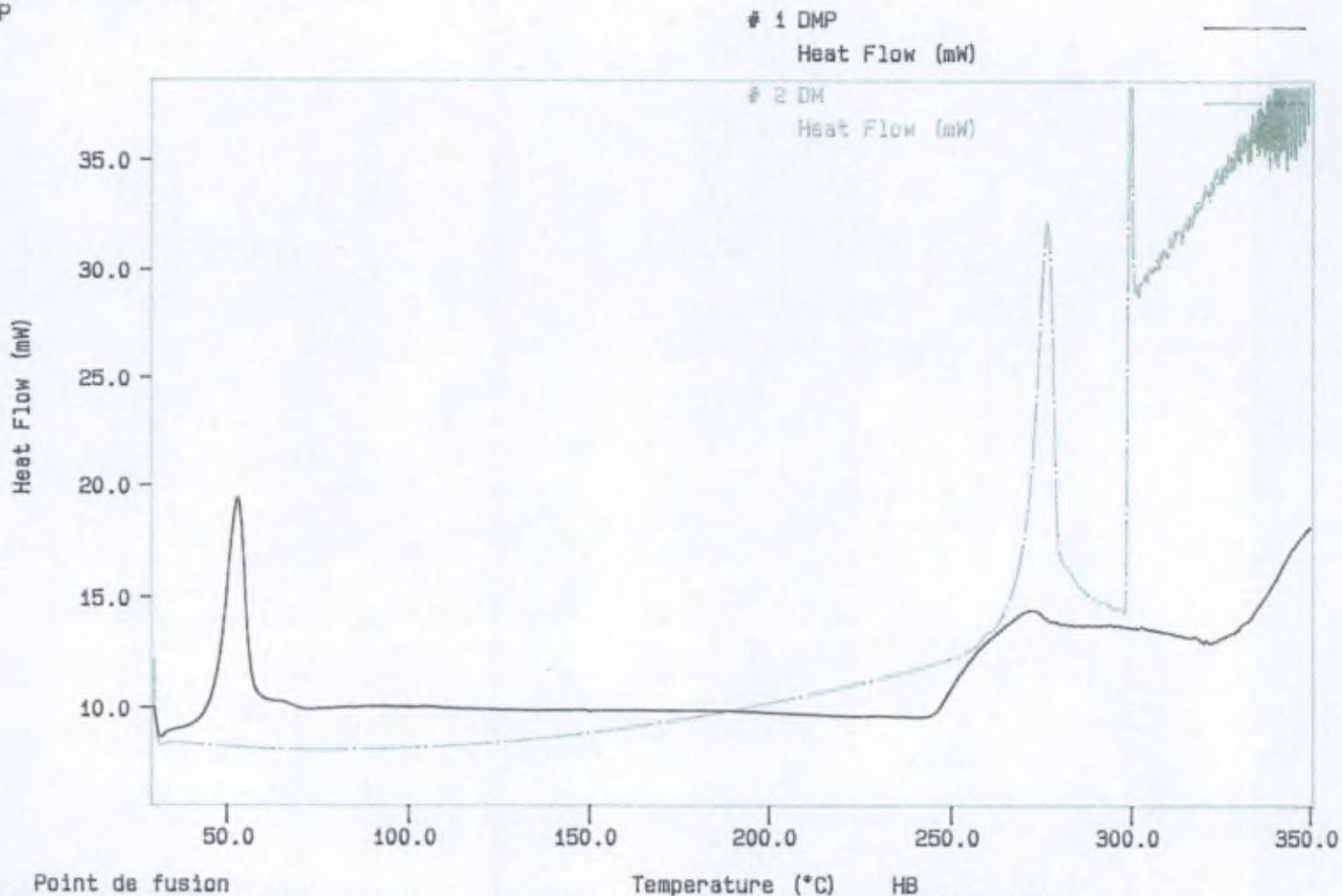


Fig 3.10 Chromatogramme HPLC Pureté DMP

### 3.1.2 Analyse enthalpique différentielle (DSC) du DMP

La DSC a été utilisée afin de déterminer le point de fusion du DMP et de le comparer avec celui de la DXM, qui est de 253 °C (**Fig. 3.12**). Le point de fusion du DMP est de 53 °C, soit 200 °C de moins que celui de la DXM native. Cette différence n'est pas surprenante, car il est connu que les esters d'alcools primaires possèdent des points de fusion nettement inférieurs à ceux de la forme non estérifiée. De plus, nos résultats concordent avec ceux de *Mitsunobu et al.* (1989) qui ont comparé deux formes cristallines de DMP avec un endotherme compris entre 49°C et 68 °C pour une vitesse de balayage de 10°C/min.

Curve 1: DSC  
File info: DMP1PFA Mon Apr 25 21: 26: 49 1994  
Sample Weight: 5.640 mg  
DMP



Point de fusion  
TEMP1: 30.0 C TIME1: 0.0 min RATE1: 10.0 C/min  
TEMP2: 350.0 C TIME2: 0.0 min

HB  
PERKIN-ELMER  
7 Series Thermal Analysis System  
Tue Apr 26 00:04:01 1994

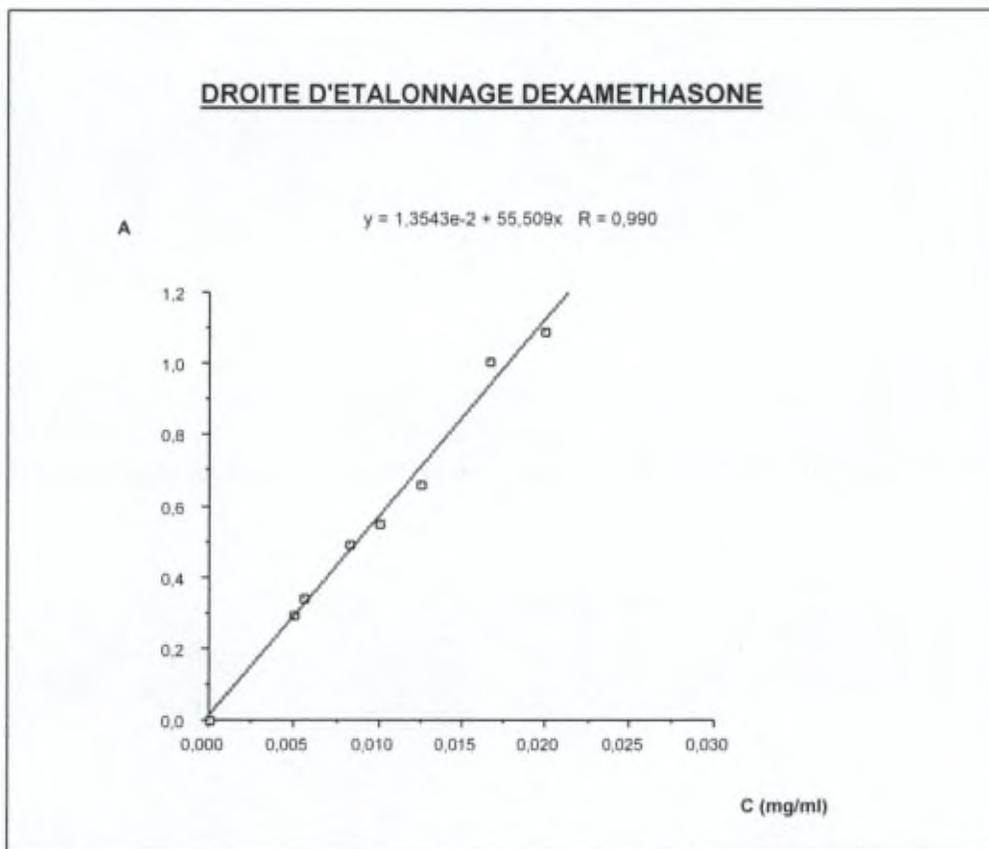
Fig. 3.12. DSC de la DXM et du DMP.

### 3.1.3 Solubilité de la DXM et du DMP

#### 3.1.3.1 Méthode UV

##### a) Courbe étalon pour la DXM (Fig. 3.13)

La longueur d'onde de travail au pH 7,4 dans le tampon phosphate est de 239 nm. Cette longueur d'onde est une caractéristique de la dexaméthasone.  $\epsilon = 15150$ .



**Fig. 3.13.** Droite d'étalonnage de la dexaméthasone par méthode UV.

##### b) Mesure de solubilité de la DXM

La solubilité de la DXM est facilement estimée à la vue de la **Fig. 3.14**. On remarque une variation de la linéarité à partir de 60  $\mu\text{g/ml}$ . Par conséquent, on peut affirmer que la DXM est soluble dans le tampon phosphate jusqu'à une concentration de 60  $\mu\text{g/ml}$  maximum (la concentration saturante référencée est de 100  $\mu\text{g/ml}$  dans l'eau à 25°C).

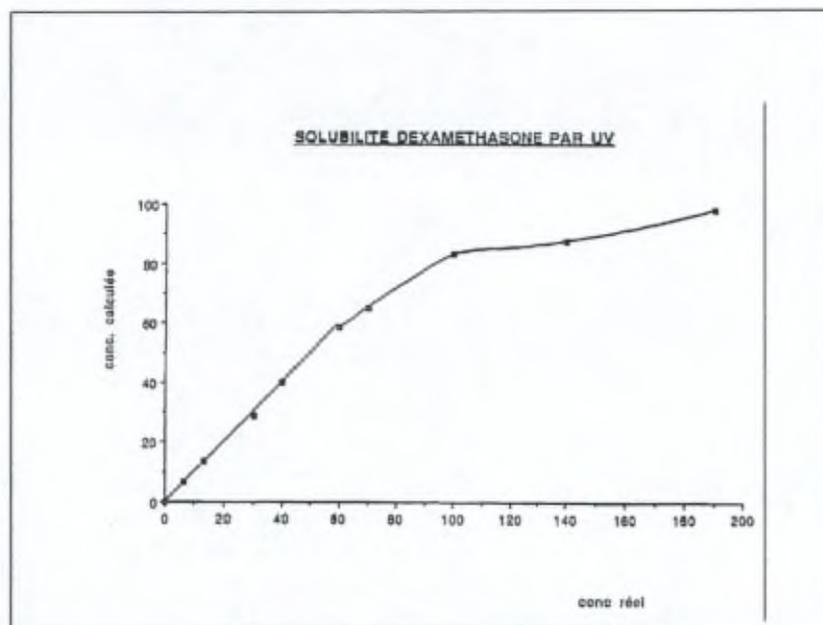


Fig. 3.14. Solubilité de la dexaméthasone par spectroscopie UV.

### 3.1.3.2 Comptage $\beta$

Cette deuxième méthode de dosage (Fig. 3.15) confirme les résultats obtenus par la méthode spectrométrique. La DXM a une solubilité maximum de 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

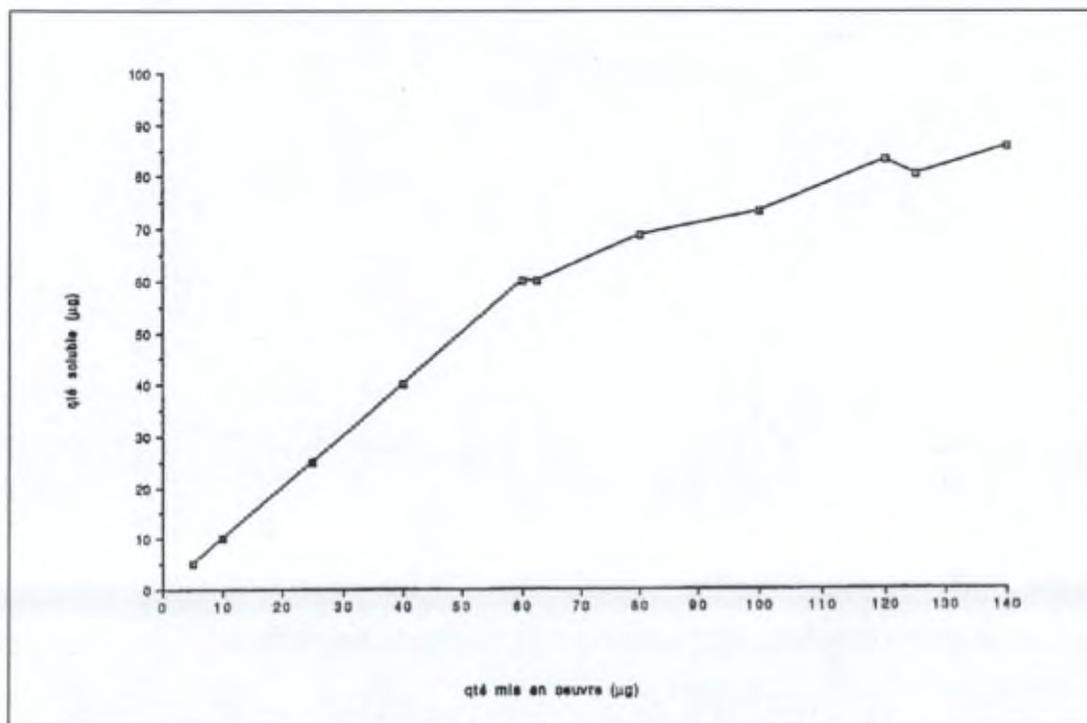


Fig. 3.15. Solubilité de la dexaméthasone par comptage  $\beta$ .

### 3.1.3.3 Solubilité du DMP

La méthode UV et la méthode par comptage  $\beta$  ont été appliquées à la détermination de la solubilité maximale du DMP. Celle-ci s'est montrée très faible, de l'ordre de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , c'est à dire mille fois moins que celle de la DXM. Par conséquent, nous ne pouvons pas débiter les essais d'encapsulation dans ces zones de concentration. Le DMP devra donc être dissous dans la phase organique lors de la préparation des films lipidiques. Pour cela, nous devons connaître le coefficient de partage octanol-eau du DMP.

### 3.1.4 Coefficient de partage *n*-octanol-eau

Le coefficient de partage octanol -tampon a été choisi parce qu'il peut représenter la lipophilie de la molécule. Il a été déterminé selon le mode opératoire développé dans matériel et méthode p. 129(**Tableau 3.1**).

**Tableau 3.1.** Coefficient de partage octanol-eau du DMP.

<i>Phase organique (cpm)</i>	<i>Phase aqueuse (cpm)</i>	<i>Qté dans l'eau (%)</i>	
7006,42	122,51	1,75	
7307,80	99,06	1,36	
7126,96	84,56	1,19	
6989,04	113,88	1,63	
7196,57	118,31	1,64	
7287,22	101,55	1,39	
7076,87	88,03	1,24	
6729,14	111,10	1,65	
7313,80	116,29	1,59	
7274,85	95,84	1,32	
7273,45	87,35	1,20	
<b>MOYENNE</b>	<b>MOYENNE</b>	<b>MOYENNE</b>	<b>Déviation standard</b>
<b>7089,59</b>	<b>101,37</b>	<b>1,43</b>	<b>0,26</b>

L'examen du Tableau 3.1 montre qu'environ 1,4 % du DMP se trouve dans le tampon phosphate à pH 7,4 et 98,6 % dans l'octanol. Cette valeur très élevée du coefficient de partage ( $K_p$ ) pour la phase organique  $P_{oct}$  laisse envisager que le DMP sera incorporé de façon efficace et durable dans la bicouche lipidique. Toutefois, une valeur élevée de  $P_{oct}$  ne garantit pas automatiquement l'insertion du principe actif dans la bicouche lipidique. En effet, la référence au coefficient de partage octanol-tampon ne tient pas compte de la structure très anisotrope de la bicouche lipidique, qui contraste fort avec celle d'un liquide isotrope comme l'octanol. Ainsi, des molécules comme le squalène possèdent un  $P_{oct}$  élevé, mais elles s'accommodent mal des restrictions stériques imposées par l'organisation des bicouches et ne s'y dissolvent pas. De plus, la solubilité de la DMP dans l'eau étant de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  les valeurs 1000 supérieures trouvées dans la phase aqueuse nous indique que la DMP a un comportement différent en présence d'une phase lipophile. Le log de P de la DMP calculé à partir des résultats obtenus est de 1,95 et de 1,85 pour la DXM. Ce qui confirme le comportement différent de la DMP en présence d'une phase lipophile et suggère des propriétés aux interfaces.

### 3.1.5 Conclusion des mesures physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques du DMP analysés ci-dessus ne permettent pas de prédire entièrement son type d'encapsulation liposomale. Pour cela, il est nécessaire de connaître le ou les types d'interaction du DMP avec les lipides constituant les bicouches membranaires. Cette question nous a conduit à effectuer une analyse conformationnelle, réalisée en collaboration avec le professeur R. Brasseur au Laboratoire de Chimie des Macromolécules aux Interfaces de l'Université Libre de Bruxelles. Avant d'en discuter les résultats, nous présentons ci-dessous un résumé des propriétés physico-chimiques du DMP.

### 3.1.6 Monographie succincte du DMP

---

<u>Formule brute</u> :	$\text{C}_{38}\text{H}_{59}\text{FO}_6$
<u>Masse moléculaire</u> :	630.88 (g/mol)
<u>Caractère</u> :	Poudre cristalline blanche, inodore.
<u>Identité (IR, RMN)</u> :	Conforme.

---

<u>Pouvoir rotatoire spécifique à 20 °C, sur substance sèche :</u>	Non déterminé
<u>Pourcentage d'eau :</u>	Non déterminé
<u>Acide palmitique libre :</u>	2 %
<u>Substances apparentées (CCM) :</u>	2 %
<u>Solubilité :</u>	Soluble dans le chloroforme La solubilité maximale du DMP dans du tampon phosphate à pH 7,4 et à 300 mOsm/kgH <sub>2</sub> O (λ : 239 nm) est de 0,1 µg/ml.
<u>Log P(octanol-eau) :</u>	1,84

---

### 3.2 Analyse conformationnelle

L'insertion du DMP entre les phospholipides a été étudiée par une analyse conformationnelle réalisée sur ordinateur par les programmes PC-TAMMO+ (Theoretical Analysis of Molecular Membrane Organization) et PC-MSA+ (Molecular Structure Analysis) développés par le professeur R. Brasseur (*Brasseur et al., 1981*).

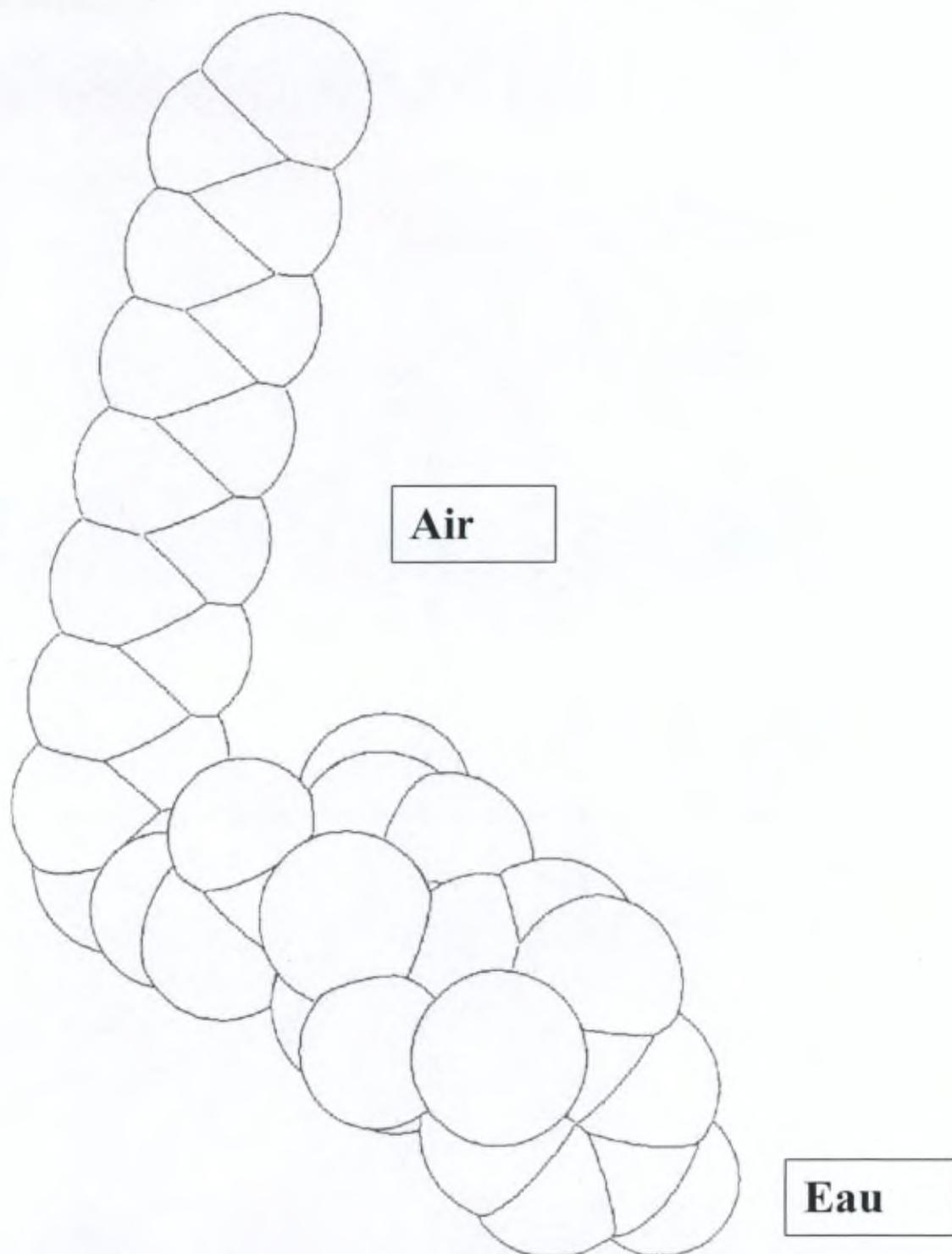
Ces logiciels permettent de calculer tout d'abord la balance hydrophobe/hydrophile ( $\Phi$ ) du DMP, selon la formule :

$$\Phi = \log \frac{E_{pho}}{E_{phi}}$$

où  $E_{pho}$  et  $E_{phi}$  représentent respectivement les énergies de transfert hydrophobes et hydrophiles.

La valeur de  $\Phi$  pour le DMP dans une monocouche lipidique de diphosphatidylcholine (DPPC) est de 0,73 (73%), ce qui confirme l'hydrophobie du DMP. Ce résultat concorde avec la valeur élevée du coefficient de partition octanol-eau 98% dans la phase lipophile et nous indique une forte probabilité d'encapsulation dans la bicouche lipidique.

La **Fig. 3.16** représente la conformation du DMP à l'interface air-eau, calculée à partir d'un spectre PXRD (*Powder X-Ray Diffraction*). Cette figure montre l'orientation de la DMP dans une interface air-eau, en présentant le groupement carbonyle vers la phase aqueuse polaire ( $\epsilon= 80$ ) et le palmitate vers l'aire apolaire ( $\epsilon= 2$ )



**Fig. 3.16.** Conformation du palmitate de dexaméthasone (DMP) à l'interface air-eau d'après un spectre PXDR (Powder X-Ray Diffraction).

Le programme, utilisant la méthode « Hypermatrix », a ensuite permis de calculer les énergies d'interaction moyennes entre le DMP et le DPPC, ainsi qu'entre le cholestérol et le

DPPC et les molécules de DPPC entre elles (**Tableau 3.2**). Ces résultats montrent que le DPPC s'associe de préférence à une autre molécule de DPPC, plutôt qu'à une molécule de DMP. Ils montrent aussi une association encore plus favorable entre le DPPC et le cholestérol. Ces résultats suggèrent que la présence de cholestérol réduise l'encapsulation de DMP.

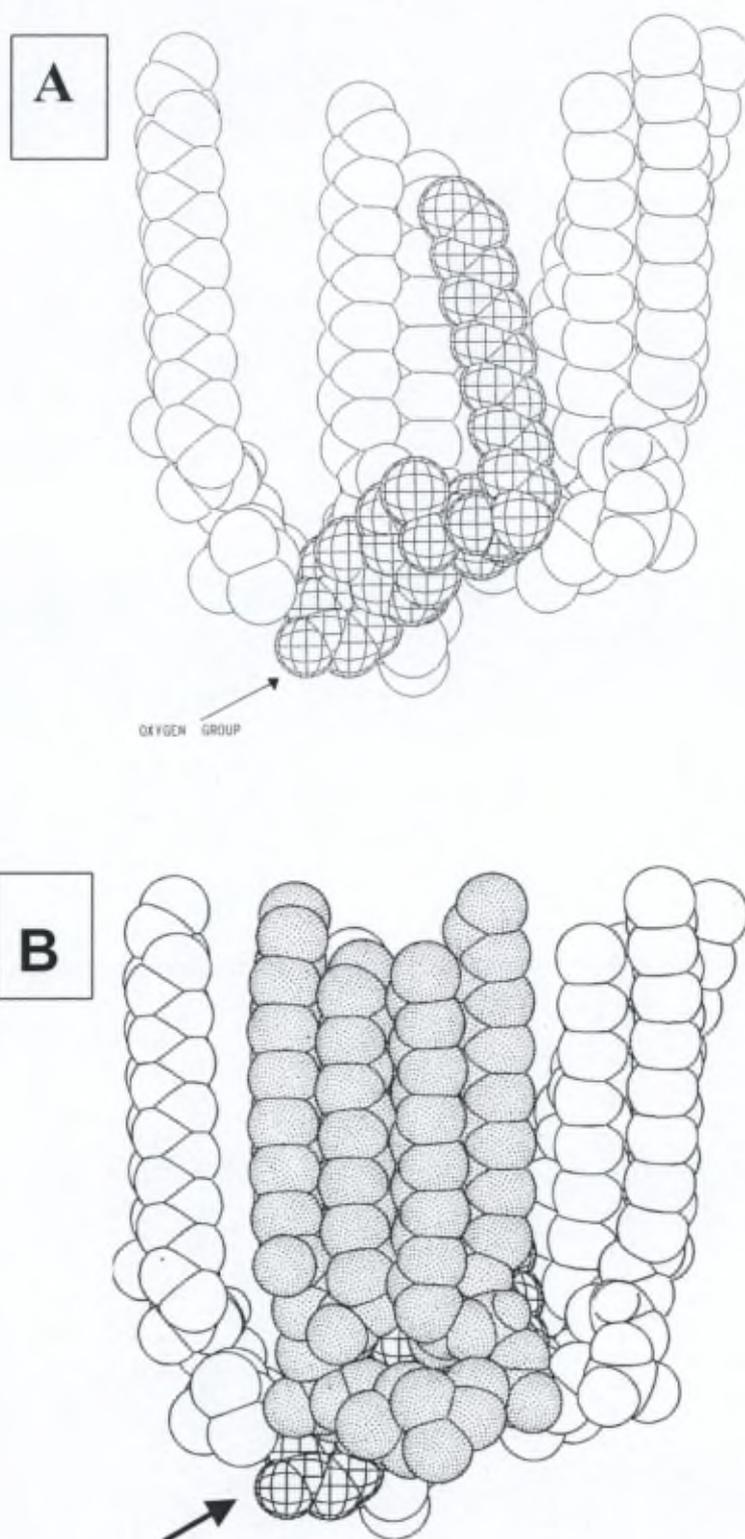
L'aire occupée par la tête polaire de ces différentes molécules a également été calculée. La surface occupée par le DMP est du même ordre de grandeur que celle de la DPPC et du cholestérol. Ce qui suggère un bon enchâssement dans la couche lipidique (**Tableau 3.2**).

**Tableau 3.2.** Energies d'interaction moyennes et aires occupées par les têtes polaires des différentes molécules du liposome.

	<i>DPPC-DPPC</i>	<i>DPPC-DMP</i>	<i>DPPC-cholestérol</i>
<i>Energie d'interaction (kJ/mol)</i>	- 54,3	- 33,4	- 58,9
<i>Aire moléculaire (nm<sup>2</sup>/mol)</i>	7	6	5

La procédure de calcul « Hypermatrix » a permis de déterminer que six molécules de DPPC étaient requises pour entourer le DMP au sein de la monocouche **Fig. 3.17**. Dans la partie non polaire de la monocouche, les phospholipides et le DMP s'organisent en présentant leurs chaînes hydrocarbonées de manière parallèle. En revanche, dans la partie polaire de la monocouche, il se forme un espace relativement large entre les têtes polaires de la DPPC et du DMP, où peuvent s'insérer de petites molécules polaires telles que l'eau.

Ensuite, le mécanisme potentiel d'insertion du DMP dans la monocouche de DPPC a été examiné. Comme le montre la **Fig. 3.17**, le groupement cétonique (oxygène) situé en C<sub>3</sub> du DMP fait partie de la zone polaire délimitée par les têtes de la DPPC qui sont solvatées au contact de l'eau. Ce mode d'insertion dans la monocouche lipidique est une caractéristique des molécules amphiphiles. L'arrangement moléculaire DMP-DPPC est ainsi stabilisé.

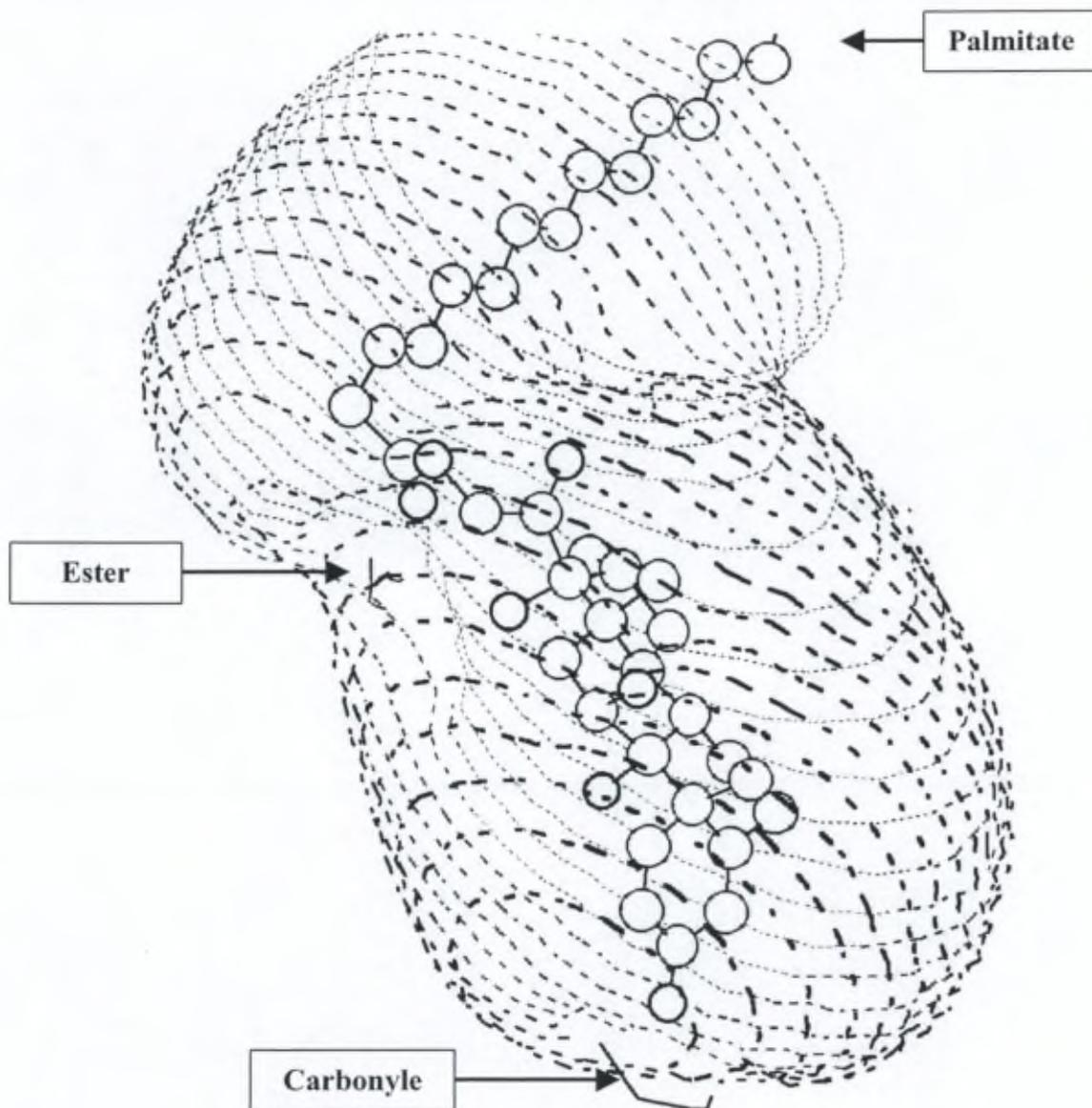


**Fig. 3.17.** Insertion de la molécule de DMP (en gaufré) au sein d'une monocouche de DPPC (en blanc ou en pointillé). La molécule de DPPC devant la DMP est illustrée en **B** [en pointillé] mais pas en **A**. La flèche indique la position du groupement cétonique en C<sub>3</sub> (premier cycle stéroïdien).

Il faut rappeler que les stérols, et en particulier le cholestérol, sont une composante indispensable des membranes cellulaires ; ils en assurent la stabilité et le contact avec la phase aqueuse, ils réduisent le volume vide entre les chaînes acyles, et ils contrôlent la perméabilité membranaire globale (*Ohvo-Rekilä et al., 2002*). La sélection des stérols « actifs dans la membrane » chez les eucaryotes est considérée par certains comme une étape majeure de l'évolution, car elle a permis la constitution du « milieu intérieur » et donc l'affranchissement de la vie aquatique (*Barenholz, 2002*).

Pour en revenir à l'analyse conformationnelle du DMP, celle-ci permet également de prédire que le DMP a une haute probabilité d'être hydrolysé *in vivo* par les estérases. En effet, l'énergie hydrophobe schématisée par les enveloppes entourant la molécule (**Fig. 3.18**) laisse apparaître un site spécifique hydrophile à hauteur de la liaison ester et carbonyle (trait continu).

De par sa structure et son insertion aux interfaces de type amphiphile, le DMP pourrait aussi s'auto-associer sous forme de micelles ou de micelles inverses, en fonction des contraintes d'empilement, c'est-à-dire des conditions opératoires lors de sa formulation.



**Fig. 3.18.** Perspective de l'hydrophobicité moléculaire potentielle du DMP. Les enveloppes hydrophobes sont indiquées par des lignes discontinues ; les enveloppes hydrophiles, par des lignes continues.

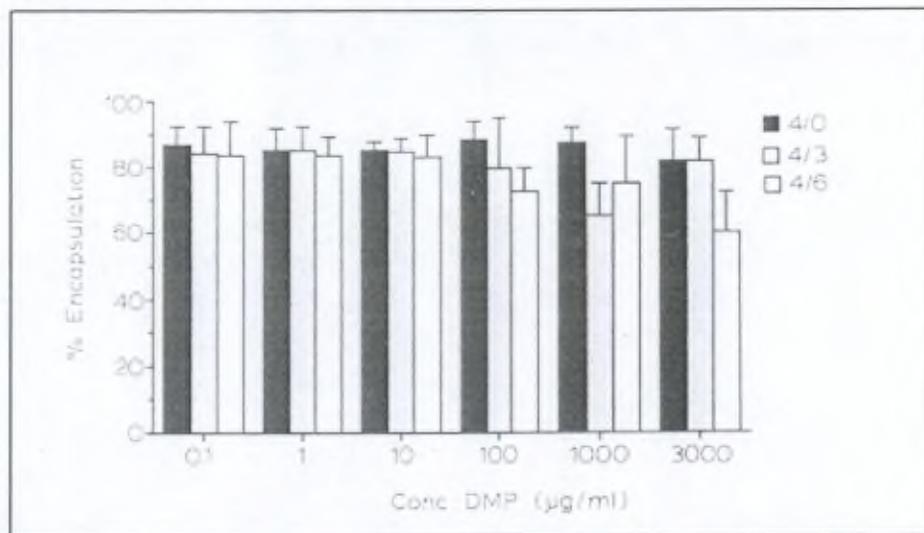
### 3.3 Préparation des liposomes DMP

Après caractérisation physico-chimique du DMP, et fort des résultats de l'analyse conformationnelle, nous avons décidé de préparer, selon la méthode adaptée de Bangham (cf.1.3.4), différentes formulations liposomales de DMP, puis de les tester. La formulation de base a été choisie en fonction de l'expertise du laboratoire de Physiologie et Physiopathologie de l'Université Libre de Bruxelles, où la partie « biologique » de ce travail a été réalisée. Dans le laboratoire, il avait été démontré (données non publiées) que les liposomes constitués d'un rapport molaire EPC/cholestérol 4:3 (soit 1,33) présentent une stabilité optimale dans le plasma. Il est cependant intéressant de noter que la composition lipidique membranaire des érythrocytes humains révèle un rapport phospholipides/cholestérol assez proche, soit d'environ 1,25 (*van Deenen & de Gier, 1974 ; Piazza Garnica et al., 1994*).

#### 3.3.1 Essai d'encapsulation du DMP en MLV

Nous avons préparé des suspensions de liposomes EPC/cholestérol, à raison de 20 mg d'EPC par ml de solvant, avec des rapports molaires 4:0, 4:3 et 4:6. A cela ont été ajoutées des concentrations de DMP s'échelonnant de 0,1 à 3000 µg/ml. Le choix de la formulation EPC/cholestérol 4:0 nous est dicté par le fait que le DMP peut s'enchâsser dans les bicouches à la place du cholestérol, comme démontré par l'analyse conformationnelle. Par conséquent, la présence de cholestérol pourrait créer une compétition d'arrangement moléculaire avec le DMP lors de la formulation des liposomes. Certains liposomes ont été constitués avec du D<sup>\*</sup>MP tritié.

Les résultats des essais d'encapsulation du DMP dans les MLV sont représentés dans la **Fig. 3.19**. Les résultats bruts complets sont donnés dans l'Annexe II.



**Fig. 3.19.** Efficacité d'encapsulation du DMP à des concentrations croissantes dans des MLV constitués de EPC/cholestérol à 3 rapports molaires différents (4:0, 4:3 et 4:6). Pour chaque condition, les moyennes et les déviations standard de  $n = 5$  expériences sont montrées.

De ces résultats, nous tirons les constatations suivantes :

1. La valeur des standards (« cpm st », en Annexe), c'est-à-dire des aliquotes prélevés avant lavage, montre une très grande variabilité. Par conséquent, le pourcentage d'encapsulation calculé est soumis à une large erreur.
2. Quelle que soit la concentration de DMP, le pourcentage d'encapsulation n'est pas statistiquement différent entre les films 4:0 et 4:3. Cela ne s'explique pas facilement, sauf en tenant compte de l'observation suivante.
3. L'efficacité d'encapsulation est de l'ordre de 80 % pour les trois compositions des films lipidiques, quelle que soit la concentration en DMP, excepté pour les films 4:6 à 3000 µg/ml, où l'on constate que l'efficacité d'encapsulation tombe à 60 %. Il est possible que le DMP ait atteint là sa concentration limitante. D'après *Shaw et al. (1976)*, la concentration limitante du 21-palmitate de cortisol en MLV s'élève à 13 moles pour 100 moles de lipides. Dans notre cas, cela équivaudrait à une concentration de DMP de 2600 µg/ml, calculée par rapport à l'EPC, soit assez proche de 3000 µg/ml. Toutefois, si la concentration limitante est vraiment atteinte, on peut se demander pourquoi la diminution d'efficacité d'encapsulation n'est pas beaucoup plus importante, et pourquoi elle ne se révèle pas avec les liposomes 4:0 et 4:3. Deux réponses sont possibles : soit la concen-

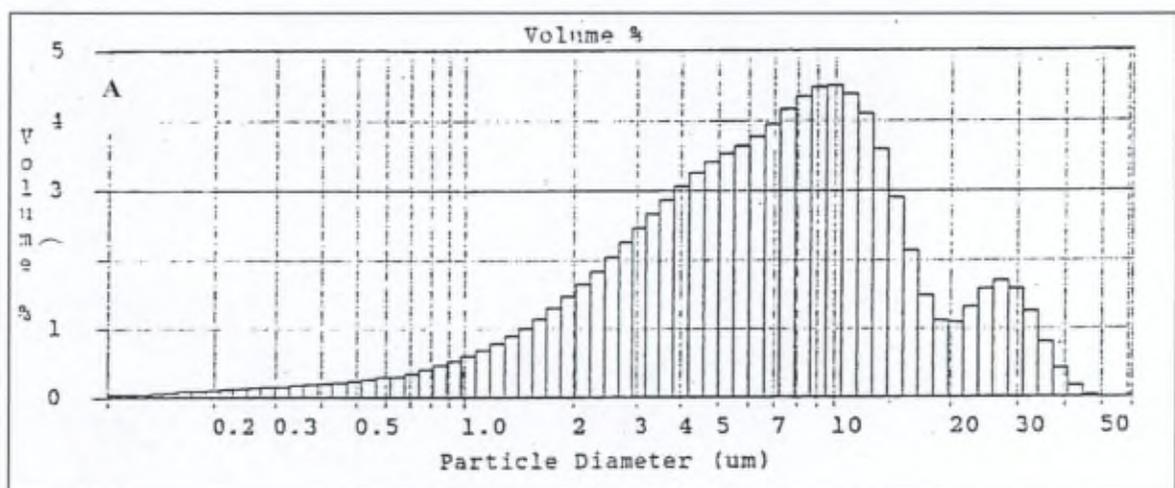
tration limitante de DMP n'est pas atteinte dans les conditions opératoires, soit des agrégats de DMP ont été sédimentés en même temps que les MLV. L'examen de culots au microscope optique à contraste de phase et lumière polarisée ont confirmé la présence des ces cristaux. En effet, les substances amorphes ne diffractent pas la lumière polarisée.

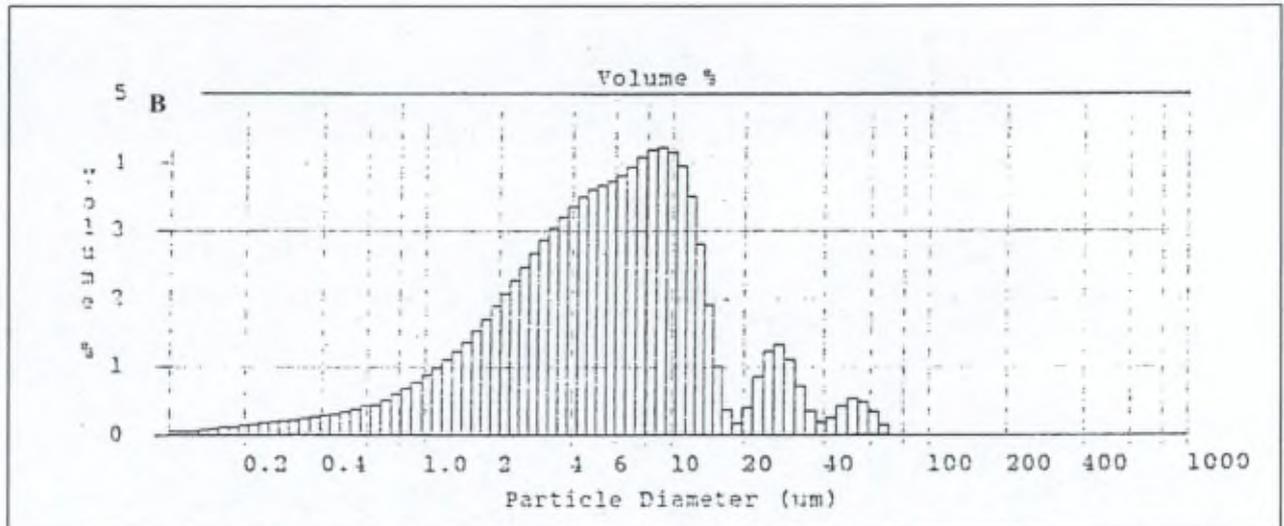
#### MLV-DMP + DMP AGGREGAT

#### MLV VIDE



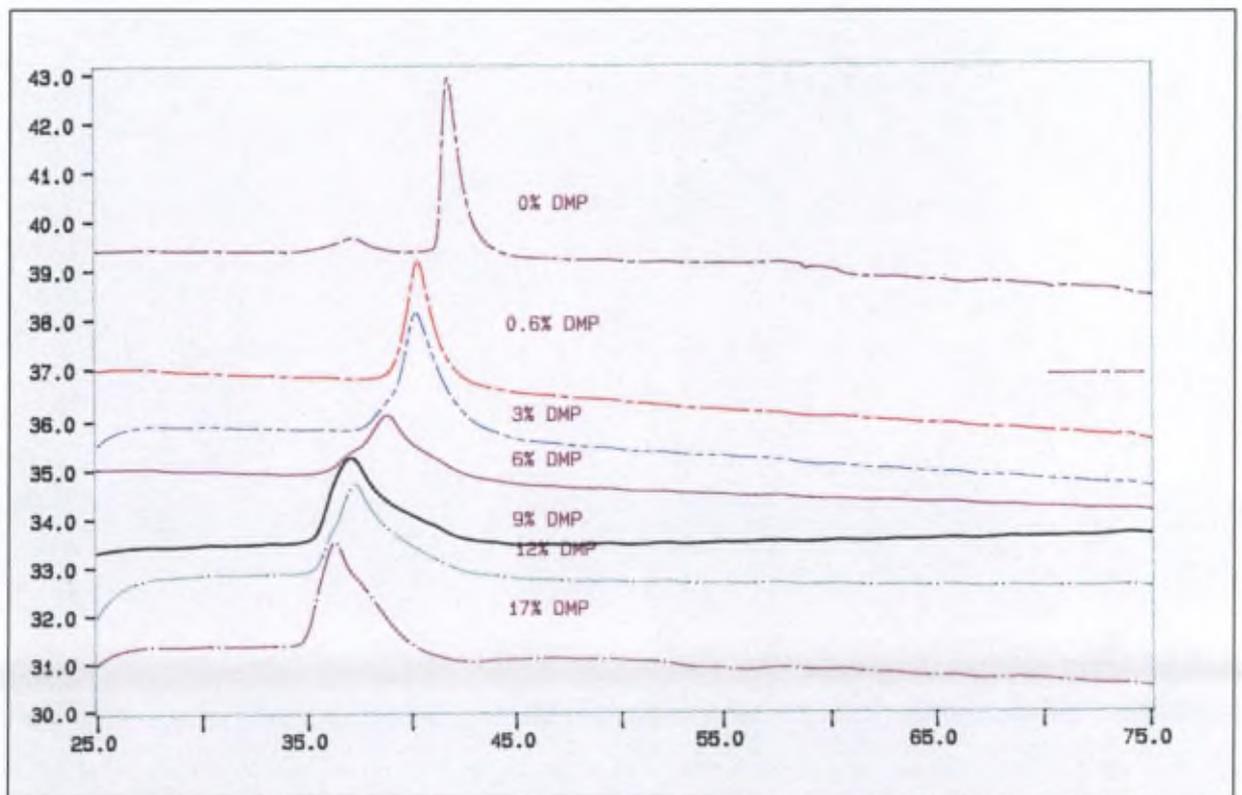
De plus, nous ne distinguons pas de différence de tailles entre les MLV 4 :3 rincé par centrifugation puis lavage de ceux non rincé (**Fig. 3.20 A&B**). La méthode de rinçages successifs par centrifugation des liposomes est couramment utilisée pour la purification des liposomes (*New 1990*).





**Fig 3.20** A Diffraction laser des MLV 4 :3 non rincé. **B** Diffraction laser des MLV 4 :3 rincé.

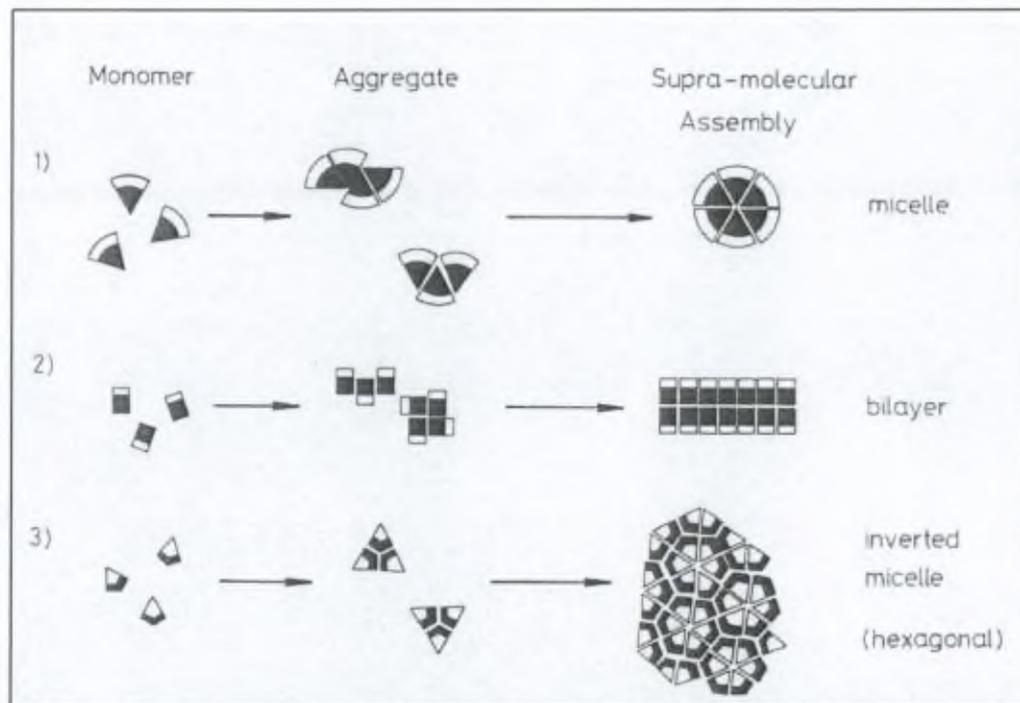
Pour savoir si la concentration limitante de DMP a été atteinte, une expérience de DSC sur des liposomes d'EPC contenant des concentrations croissantes de DMP (0 à 17 % mole/mole) a été réalisée (**Fig. 3.21**). Cette méthode est utilisée pour déterminer la concentration maximale de cholestérol à ajouter aux phospholipides (*New 1990*).



**Fig 3.21** Courbe DSC de MLV contenant de 0 à 17% de DMP

La déformation du pic et le recul de la température de transition de phase sont surtout marqués au-delà d'une concentration en DMP d'environ 6 %. Cela implique que la concentration limitante de DMP pour des liposomes EPC devrait être largement atteinte à 3000 µg/ml ce qui correspond à 13 % (mole/mole).

Pour expliquer les problèmes d'encapsulation, l'hypothèse d'une agrégation de molécules de DMP est plus probable. En effet, la préparation du film lipidique est hydratée avec une phase aqueuse insuffisante à la solubilisation du DMP (cf. 3.1.3.3). Dès lors, deux complexes pourraient se former : soit un complexe lipide-DMP, soit un précipité insoluble de DMP-DMP ou les deux. On sait que la nature amphiphile du DMP favorise la formation de micelles inverses (**Fig. 3.22**). Il faut à présent séparer efficacement ces différents complexes.



**Fig. 3.22.** Types d'association des molécules amphiphiles (d'après New, 1990).

### 3.3.2 *Choix de la méthode de séparation*

Les méthodes les plus fréquemment utilisées pour la séparation de principe actif non encapsulé sont la chromatographie sur gel, l'ultrafiltration, l'ultracentrifugation et la dialyse. Mais il s'agit là de méthodes pour molécules soit entièrement hydrosolubles (soluté), soit possédant une certaine hydrosolubilité telles les molécules amphiphiles. Notre problème est plus complexe : les formulations liposomales préparées contiennent des particules insolubles (aggrégats, complexes) de tailles très diverses, ainsi que des micelles. La centrifugation fait sédimer les complexes avec les MLV comme vu au microscope. Seule la chromatographie par exclusion de taille paraît adéquate pour séparer les différents constituants des formulations MLV. Nous avons pensé à une séparation par tamisage moléculaire sur gel Sépharose, modifiée par l'ajout d'un filtre qui n'arrêterait que les agrégats, et pas les MLV. Un filtre Whatman GF/C a été choisi, car il avait été utilisé pour recueillir les cristaux de DMP lors de l'étude PXRD.

Afin de valider cette méthode, nous avons préparé des MLV contenant à la fois du D<sup>3</sup>MP tritié (membranaire) et de l'inuline radiomarquée au <sup>14</sup>C marqueur de la phase aqueuse encapsulée dans les liposomes. En effet, nous devons aussi nous assurer que les SUV sont filtrés sans perte d'encapsulation.

Les résultats (**Tableau 3.3**) montrent que le filtre arrête aussi bien les agrégats que les MLV.

**Tableau 3.3.** Récupération de D\*MP tritié dans le filtrat et sur le filtre Whatman GF/C, après tamisage moléculaire sur Sépharose suivi de filtration des liposomes MLV-D\*MP et des SUV-D\*MP. Toutes les données sont en cpm.

Concentration de DMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	Filtrat	Filtre GF/C
<i>Filtration des MLV</i>		
100	$52.5 \pm 1.05$	$208\ 643 \pm 6\ 809$
500	$53.3 \pm 1.00$	$203\ 745 \pm 8\ 404$
3000	$49.3 \pm 1.09$	$208\ 928 \pm 7\ 308$
<i>Filtration des SUV</i>		
100	$227\ 809 \pm 9\ 608$	$43\ 193 \pm 5\ 050$
500	$207\ 504 \pm 10\ 508$	$37\ 146 \pm 7\ 908$
3000	$232\ 441 \pm 7\ 568$	$48\ 240 \pm 7\ 608$

Il nous fallait dès lors changer la méthode de séparation ou opter pour un autre type de liposome que les MLV. L'objectif final étant la formulation d'un nouveau médicament à visée pulmonaire, le choix de petits liposomes de type SUV s'imposait. Ceux-ci ont été obtenus par sonication des MLV. Des expériences initiales ont montré que, même après sonication, le filtre GF/C arrêtait bien les agrégats mais pas les SUV étant donné leur taille colloïdale de l'ordre de 60 nm.

### 3.3.3 Essais d'encapsulation du DMP en SUV

Ces essais se sont limités à des formulations EPC/cholestérol 4:0 et 4:3, car l'addition de plus de 50 % de cholestérol en SUV déstabilise ces structures (Puisieux, 1985 ; New, 1990). De même, seules trois concentrations en DMP ont été testées (100, 500 et 3000  $\mu\text{g/ml}$ ). Contrairement aux MLV, les SUV sont purifiés par chromatographie sur un gel de Séphadex G50 préalablement placé en tampon phosphate à pH 7,4 dans des seringues de 5 ml, dont la sortie est munie d'un filtre en microfibrilles de verre (Whatman GF/C). En effet, comme démontré ce système permet d'éliminer les agrégats, les complexes lipides-DMP, ainsi que les micelles qui interfèrent avec les liposomes.

La concentration d'EPC (20 mg/ml), les caractéristiques du tampon et le mode opératoire de la préparation des MLV-DMP ont été conservées. Dans le **tableau 3.4.** ci-dessous sont résumées les moyennes des données d'encapsulation obtenues pour les deux composition SUV et les concentrations 100, 500 et 3000  $\mu\text{g/ml}$  en DMP après purification (cf. 2.3.4). Les résultats détaillés sont donnés en annexe II.

**Tableau 3.4** Encapsulation des SUV 4/0 et 4/3 contenant 100, 500 et 3000  $\mu\text{g/ml}$  de DMP

<b>Film 4/0</b>		
<b>CPM Standard</b>	<b>CPM culot</b>	<b>Encapsulation %</b>
33014,58	41625, 52	126
26953,33	34740,23	129
25390,33	24616,90	97
<b>Film 4/3</b>		
25567,70	27036,28	106
25183,45	26946,29	107
19839,77	17087,06	86

Les résultats des essais d'encapsulation de DMP en SUV appellent les commentaires suivants :

1. Les standards (prélèvements avant lavage) sont reproductibles au sein d'un même groupe d'essai, ce qui contraste avec les résultats précédents des MLV discutés ci dessus.
2. L'encapsulation augmente proportionnellement à la quantité de DMP, mais chute pour une concentration limitante en DMP (3000  $\mu\text{g/ml}$ ).
3. Pour des concentrations inférieures à cette concentration limitante, l'efficacité d'encapsulation est supérieure à 100 %. Il peut s'agir :
  - a) d'une erreur de manipulation ;
  - b) d'une erreur de mesure au comptage  $\beta$ , car lors de la prise du standard, il subsiste dans la suspension liposomale des traces de titane provenant de la tête

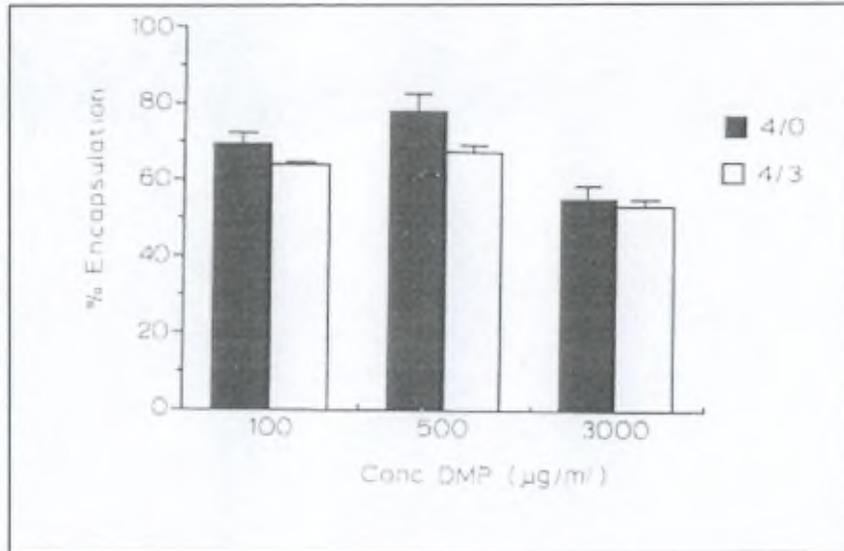
de sonication de l'appareil. Celles-ci pourraient induire des interférences appelé « quenching », lors des mesures.

- c) d'une concentration de la suspension lors du passage dans la colonne.

Les hypothèses a) et b) peuvent être écartées car :

- a) l'expérience « 4:3 ; 100 µg/ml » a été répétée par un investigateur différent, travaillant en aveugle. Le résultat obtenu (108,2 %) est équivalent, aux erreurs expérimentales près, à la valeur obtenue précédemment (106,15 %).
- b) les expériences ont été répétées en utilisant la méthode du standard interne, par ajout d'une quantité connue et reproductible de principe actif radioactif après chaque comptage  $\beta$ . Les valeurs résultantes sont effectivement et précisément augmentées de la valeur ajoutée.

En revanche, l'hypothèse c) peut être retenue. En effet, nous avons pesé la suspension liposomale avant et après séparation sur gel de Sephadex G50 par la méthode de microcentrifugation. En déposant exactement 1 g de suspension liposomale, on en récolte exactement 0,6 g. Par conséquent, les suspensions SUV DMP se concentrent lors de la purification. Nous avons dès lors corrigé notre pourcentage d'encapsulation en tenant compte du facteur correctif de  $0,60 \pm 0,03$ . Les valeurs corrigées sont présentées dans l'annexe II. De plus nous avons répété cette expérience en pesant tous les échantillons **Fig. 3.23.**



**Fig. 3.23.** Efficacité d'encapsulation du DMP à des concentrations croissantes dans des SUV constitués de EPC/cholestérol à 2 rapports molaires différents (4:0 et 4:3). Pour chaque condition, les moyennes et les déviations standard de  $n = 5$  expériences sont montrées

En conclusion, nous sommes parvenus à séparer les agrégats et autres complexes des liposomes DMP-SUV. De plus, l'efficacité d'encapsulation du DMP est de l'ordre de 65 % pour les compositions lipidiques avec ajout de cholestérol(4/3) et de 75 % pour compositions sans ajout de cholestérol (4/0). Dans les deux cas, on observe une diminution de l'efficacité d'encapsulation à la concentration limitante en DMP (3000 µg/ml). Ces résultats expérimentaux sont conformes à l'analyse conformationnelle.

Il s'agit maintenant de choisir un type de liposome pour en tester l'activité biologique. Le premier choix serait le liposome qui présente le plus grand pourcentage d'encapsulation, soit la formulation liposomale EPC/cholestérol 4:0 contenant 500 µg de DMP par millilitre. Cependant, il faut tenir compte de l'avantage potentiel d'un ajout de cholestérol pour stabiliser les vésicules, comme le démontre l'expertise du laboratoire, ainsi que de l'hypothèse conformationnelle selon laquelle l'affinité du DMP pour la DPPC, en l'absence de cholestérol, empêcherait son relarguage.

Dès lors, la préférence a été donnée à un SUV-DMP constitué d'un mélange EPC/cholestérol 4:3 et contenant 500 µg de DMP par millilitre. La reproductibilité de cette formulation a été validée par sept essais supplémentaires d'encapsulation, en pesant chaque échantillon après purification.

### 3.4 *Activité biologique des liposomes SUV-DMP*

#### 3.4.1 *Choix de la méthode*

Afin de prouver que le DMP liposomal retient l'activité pharmacologique de la molécule-parent, la DXM, nous nous sommes tournés vers un test biologique *in vitro* bien standardisé, suffisamment simple et fiable pour être libre d'artéfacts. Il s'agit du test d'activation lymphocytaire, ou **test de transformation lymphoblastique (TTL)**, grâce auquel on peut mesurer l'activité immunosuppressive des glucocorticoïdes (Heilmann *et al.*, 1973 ; Fauci & Dale, 1975). Le test consiste à cultiver *in vitro* une population de cellules sanguines mononucléées d'origine humaine (donneurs sains), puis à les stimuler avec un mitogène, dans le cas présent la concanavaleine A (**Con A**), et à évaluer leur réponse proliférative au moyen de l'incorporation de thymidine tritiée. L'incorporation se mesure généralement, mais pas nécessairement, 48 heures après l'ajout de Con A. Dans ce test quantitatif, il est connu que la DXM inhibe l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine de façon dose-proportionnelle, avec un  $\text{ED}_{50}$  compris entre  $2 \cdot 10^{-9}$  M et  $5 \cdot 10^{-9}$  M et un effet maximal à  $10^{-7}$  M ou  $10^{-6}$  M (Fauci & Dale, 1975 ; Braun *et al.*, 1997).

L'activation des lymphocytes par le mitogène, et l'effet inhibiteur de la DXM, peuvent aussi être évalués par la mesure de la sécrétion d'interféron- $\gamma$  dans le milieu (Corrigan *et al.*, 1991 ; Braun *et al.*, 1997). La production de cette cytokine par les lymphocytes en culture est une mesure très précise de leur état d'activation.

Dans tous les cas, l'effet des SUV-DMP sera comparé à celui de la DXM libre, en tenant compte des quantités de DMP ou de DXM dans le milieu de culture au contact des cellules.

### 3.4.2 Expériences préliminaires

Ces expériences ont permis de s'assurer que le TTL fonctionnait correctement entre nos mains, et que les cellules restaient viables à plus de 90 %, même après 3 jours d'incubation avec des SUV vides ou des SUV-DMP aux plus fortes concentrations. Mais nous avons constaté, lors de ces expériences, que l'effet antiprolifératif des SUV-DMP ne pouvait être mis en évidence qu'en préincubant les cellules mononucléées avec les liposomes chargés de principe actif pendant 24 heures avant l'ajout du mitogène (Tableau 3.4, Fig. 3.24 & 3. 25). L'ajout de SUV-DMP au contact des cellules de façon simultanée à la stimulation par la Con A n'entraînait aucune diminution de la réponse proliférative au mitogène, contrairement à l'ajout simultané DXM libre, qui, à  $10^{-6}$  M, bloquait presque complètement la réponse mitogénique à la Con A, comme décrit dans la littérature. La quantité de SUV-DMP utilisée dans ces expériences était calculée de façon à apporter dans le milieu de culture une quantité de DMP (incorporée en SUV) équivalente, mole à mole, à la quantité de DXM nécessaire pour atteindre  $10^{-6}$  M. Des quantités 10 fois plus élevées de DMP en SUV ont aussi été testées, sans modifier les observations du Tableau 3.4.

**Tableau 3.4.** Prolifération lymphocytaire, mesurée par l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine (exprimée en pmoles), 48 h après stimulation par la concanavaline A, ajoutée soit simultanément, soit 24 heures après, l'addition de : a) un contrôle ; b) dexaméthasone libre à  $10^{-6}$  M ; c) liposomes SUV "vides" (sans DMP) à raison de 4  $\mu\text{g}$  de lipides par puits ; d) liposomes SUV-DMP à raison de 4  $\mu\text{g}$  de lipides et de 126 ng de DMP par puits. Cette quantité de DMP incorporée en SUV correspond à une « concentration » en DMP dans le puits de  $10^{-6}$  M.

	<i>Stimulation simultanée à la Con A</i>	<i>Stimulation à la Con A retardée de 24 h</i>
Contrôles	182 ± 27	234 ± 20
SUV vides	154 ± 31	204 ± 30
SUV-DMP	138 ± 36	36 ± 5
Dexaméthasone	35 ± 16	14 ± 2

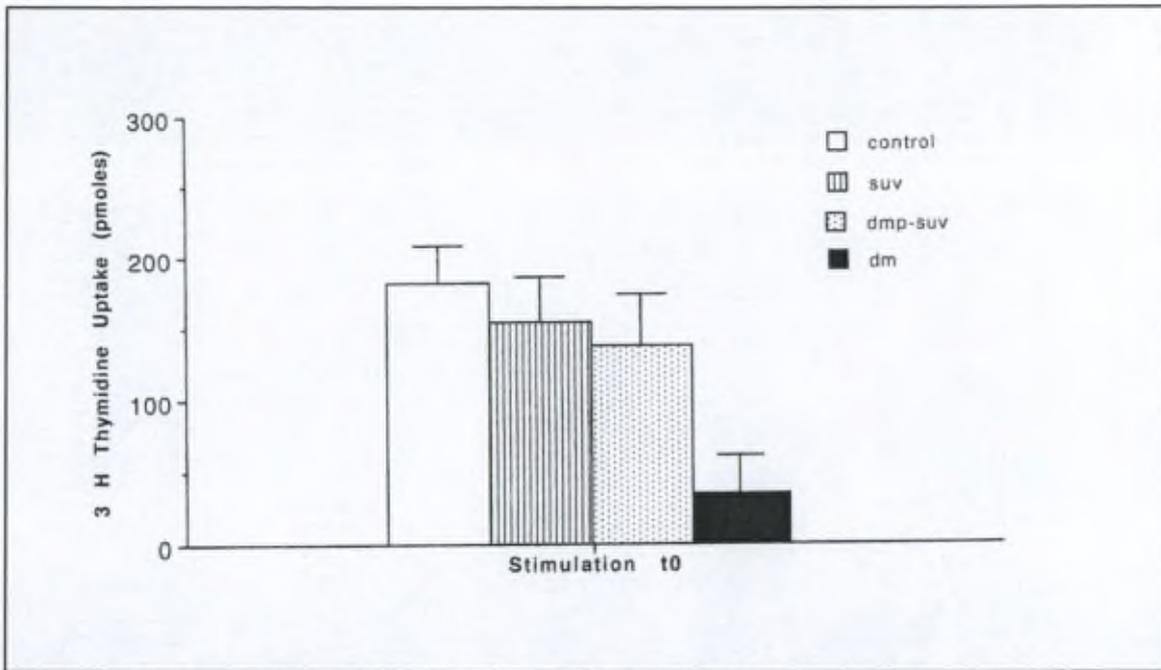


Fig. 3.24 Prolifération lymphocytaire, mesurée par l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine, après stimulation par la concanavoline A simultanément à l'ajout de dexaméthasone (dm) ou de liposomes (suv ou dmp-suv)..

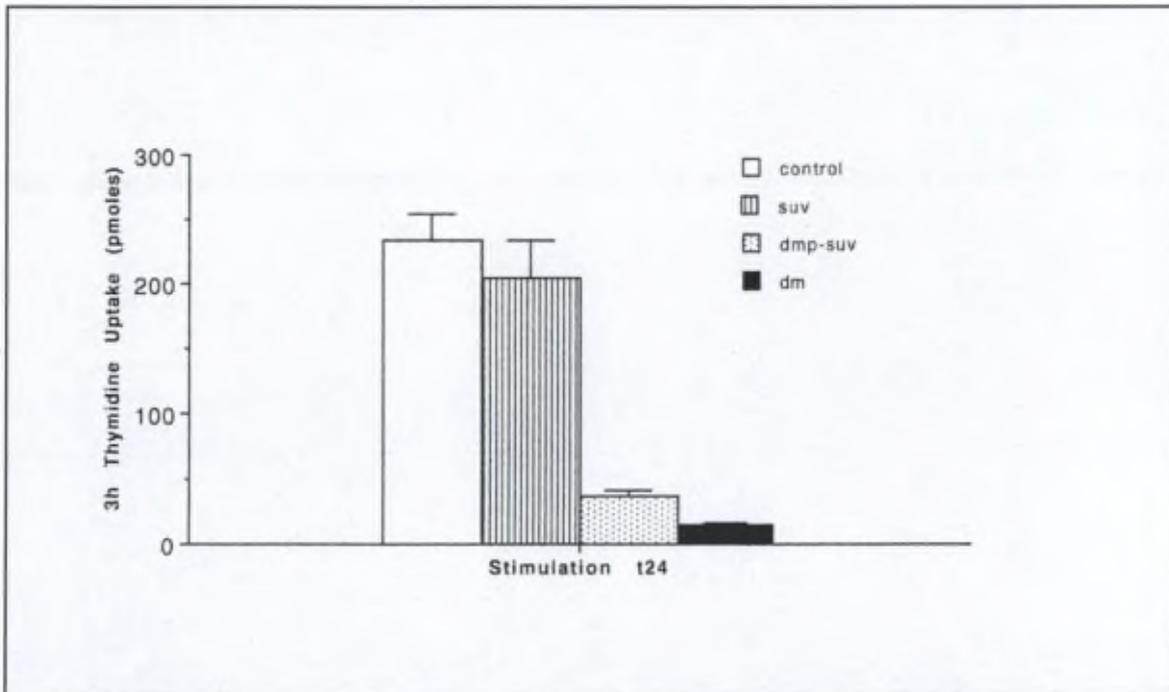
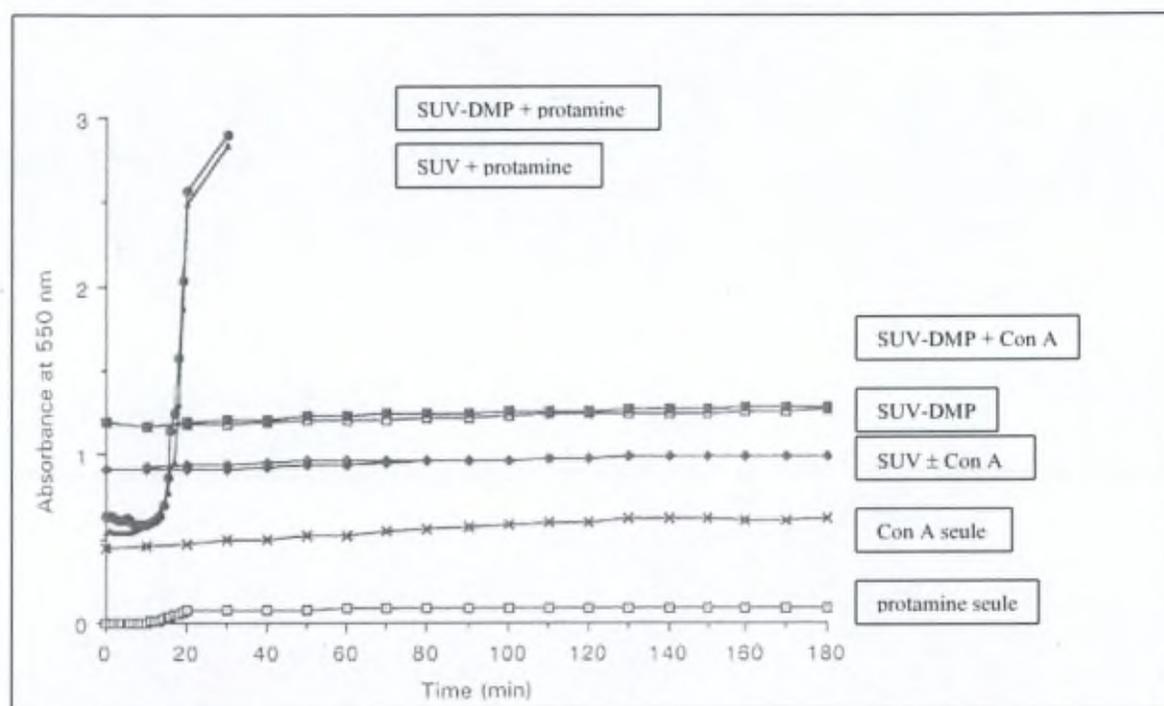


Fig. 3.25 Prolifération lymphocytaire, mesurée par l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine, lorsque la dexaméthasone (dm) ou les liposomes (suv ou dmp-suv) sont ajoutés 24 h avant l'addition de concanavoline A.

La première question que nous nous sommes posée était : « Pourquoi est-il nécessaire de préincuber les cellules avec les SUV-DMP avant d'ajouter la Con A, afin d'observer un effet antiprolifératif des liposomes chargés de principe actif ? »

On pourrait imaginer que la Con A induit une agrégation rapide des SUV, les empêchant d'interagir efficacement avec les cellules. Pour évaluer cette hypothèse, des expériences de turbidimétrie ont été menées, en incubant des SUV et des SUV-DMP dans du tampon phosphate à 37 °C avec ou sans addition de Con A à 10 µg/ml, la dose utilisée dans les expériences cellulaires. Selon la littérature, la technique turbidimétrique permet de révéler l'agrégation de liposomes SUV induite par la protamine, par exemple (*Defrise-Quertain et al., 1984*). Comme le montre la **Fig. 3.26**, seule la protamine, mais pas la Con A, provoque une augmentation d'absorption à 550 nm d'une solution de SUV chargés ou non de DMP.



**Fig. 3.26.** Mesures turbidimétriques de solutions liposomales incubées en tampon phosphate avec ou sans addition, au temps 0, de Con A à 10 µg/ml ou de protamine à 0,1 mg/ml. Une augmentation d'absorbance correspond à une agrégation ou une précipitation de liposomes. Les absorbances très élevées à 30 min le sont restées durant 3 heures.

De plus, la taille moyenne d'une population de SUV-DMP, mesurée par spectrophotométrie à corrélation de photon (Malvern zetasizer 3) incubés pendant 2 heures à 37 °C en absence de Con A ( $49.4 \pm 11.3$  nm) ne s'est pas révélée statistiquement différente de celle d'une population identique incubée en présence de 10 µg/ml de Con A ( $59.4 \pm 11.6$  nm) : **Figs. 3.27 et 3.28.**

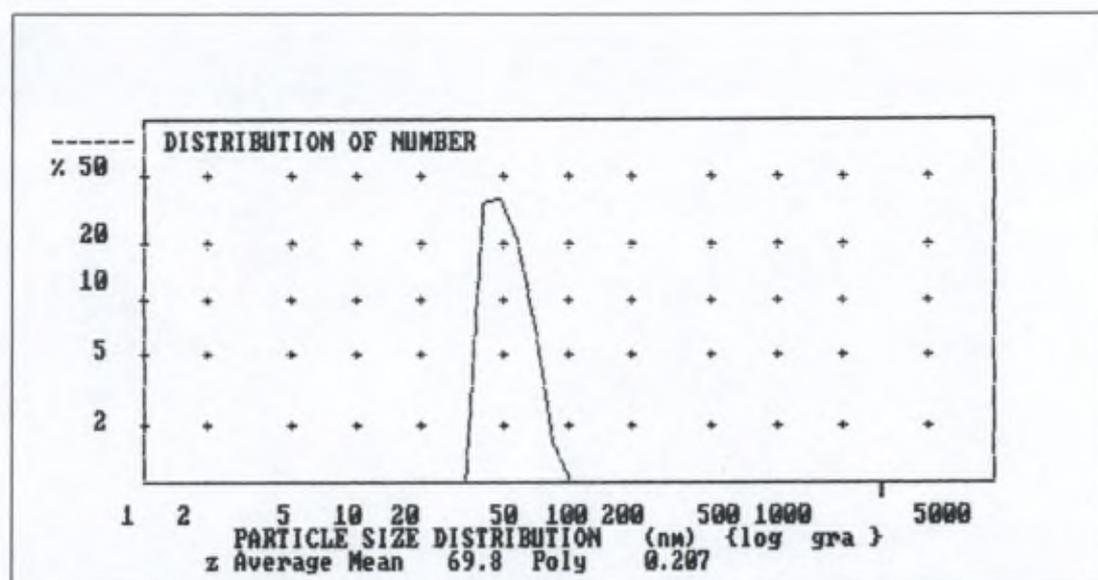


Fig 3.27 Distribution de taille des SUV en absence de Con A

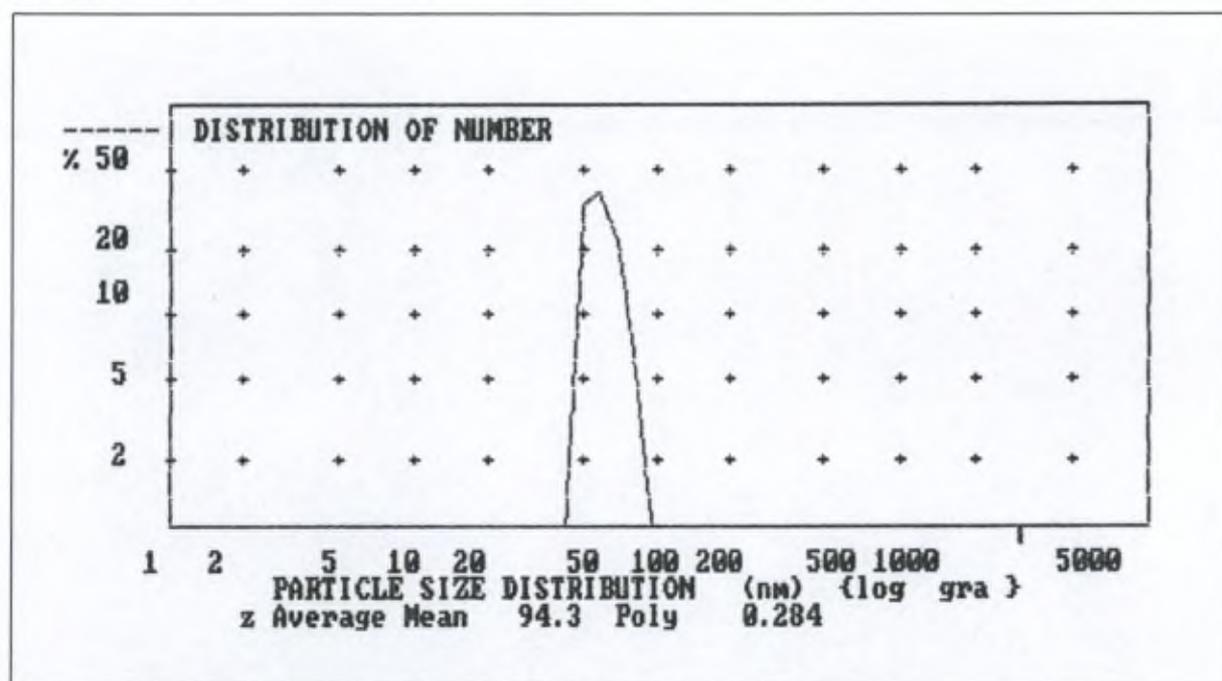
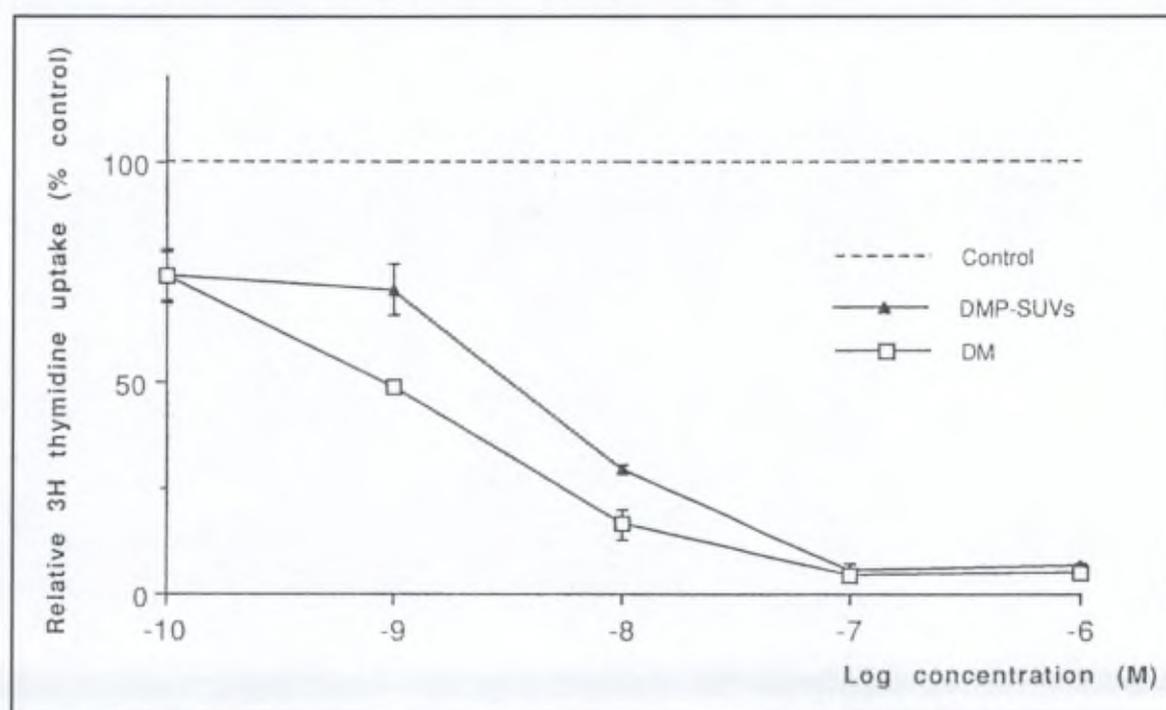


Fig 3.28 Distribution de taille des SUV avec ajout de Con A

Nous pouvons en conclure qu'il est fort peu probable que la Con A induit une agrégation rapide des SUV-DMP et les empêche par là d'interagir avec les lymphocytes. On pourrait imaginer d'autres types d'interférence négative entre la Con A et les SUV-DMP empêchant ces derniers d'agir, mais ces supputations ne reposent sur aucune donnée concrète. Il faudra donc chercher ailleurs une explication plausible à l'absence d'effet inhibiteur des SUV-DMP sur l'action mitogène de la Con A lorsque les liposomes sont placés au contact des cellules en même temps que la Con A (cf. plus loin).

### 3.4.3 Effet des SUV-DMP sur la prolifération lymphocytaire

Ayant défini les meilleures conditions du test, nous pouvons passer à l'examen de la relation dose-effet de la DXM libre et des SUV-DMP sur la transformation lymphoblastique. Pour la DXM libre, des concentrations de  $10^{-10}$  M à  $10^{-6}$  M (40 ng/l à 400  $\mu$ g/l) dans le milieu de culture sont utilisées. Pour la formulation liposomale, nous retenons des quantités de DMP (incorporée en SUV) ajoutées aux cellules qui vont de 12,6 pg à 126 ng par puits (63 ng/l à 630  $\mu$ g/l), ce qui correspond à des « concentrations » de DMP dans le milieu de culture allant de  $10^{-10}$  M à  $10^{-6}$  M. La Fig. 3.29 présente les résultats.



**Fig.3.29.** Effets de différentes concentrations de dexaméthasone (« DM » ; exprimées en  $\log[M]$ ) et de différentes quantités de SUV-DMP (exprimées sous forme de la « concentration » en DMP atteinte dans le milieu de culture) sur l'incorporation de thymidine tritiée par des lymphocytes stimulés à la concanavaleine A. L'incorporation de thymidine tritiée est exprimée en % des valeurs contrôles. Chaque point est la moyenne  $\pm$  ESM de 5 mesures indépendantes.

On constate qu'à des quantités élevées, les deux types de formulation de la DXM, soit libre, soit sous forme de pro-drogue liposomale, peuvent inhiber quasi complètement la prolifération lymphocytaire induite par un mitogène. Les effets de la DXM libre aux concentrations de 40 et 400  $\mu\text{g/l}$  (soit  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M) et ceux des SUV-DMP à des quantités correspondantes (expliquées ci-dessus) ne sont pas statistiquement différents (test de Student). De même, lorsque de faibles concentrations de DXM ( $10^{-10}$  M) ou de faibles quantités de SUV-DMP sont utilisées, les effets sont identiques (environ 25 % d'inhibition de la prolifération). Aux quantités intermédiaires (de 0.4 à 4  $\mu\text{g/l}$  de DXM, soit de  $10^{-8}$  à  $10^{-9}$  M), les SUV-DMP sont légèrement moins efficaces que la DXM libre. Les différences sont statistiquement significatives :  $p=0.03$  pour la comparaison entre 0.4  $\mu\text{g/l}$  de DXM et 0.63  $\mu\text{g/l}$  de DMP ( $10^{-9}$  M), et  $p=0.002$  pour la comparaison entre 4  $\mu\text{g/l}$  de DXM et 6.3  $\mu\text{g/l}$  de DMP ( $10^{-8}$  M).

L'effet du DMP liposomal à doses maximales a ensuite été évalué dans des préparations lymphocytaires provenant de 6 donneurs différents (**Tableau 3.5**). Bien que les niveaux individuels de prolifération lymphocytaire variaient nettement, ils étaient dans tous les cas fortement réduits par la DXM ou les SUV-DMP. Dans une autre série d'expériences (**Tableau 3.5**), on n'a pas constaté de différences significatives entre les effets inhibiteurs de la DXM à la concentration de  $10^{-6}$  M et ceux du DMP liposomal placé au contact des cellules à des quantités de DMP correspondantes (94 % d'inhibition dans les deux cas). D'autres séries d'expérience ont été réalisées avec un mitogène différent, le *Candida albicans* ; les résultats étaient similaires.

**Tableau 3.5.** Effet de la DXM et des SUV-DMP à  $10^{-6}$  M sur la prolifération lymphocytaire (tous les résultats sont donnés en pmoles de [ $^3$ H]thymidine incorporée). Les lettres A à F correspondent à des donneurs différents ; pour chacun, 5 expériences indépendantes ont été réalisées et les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM

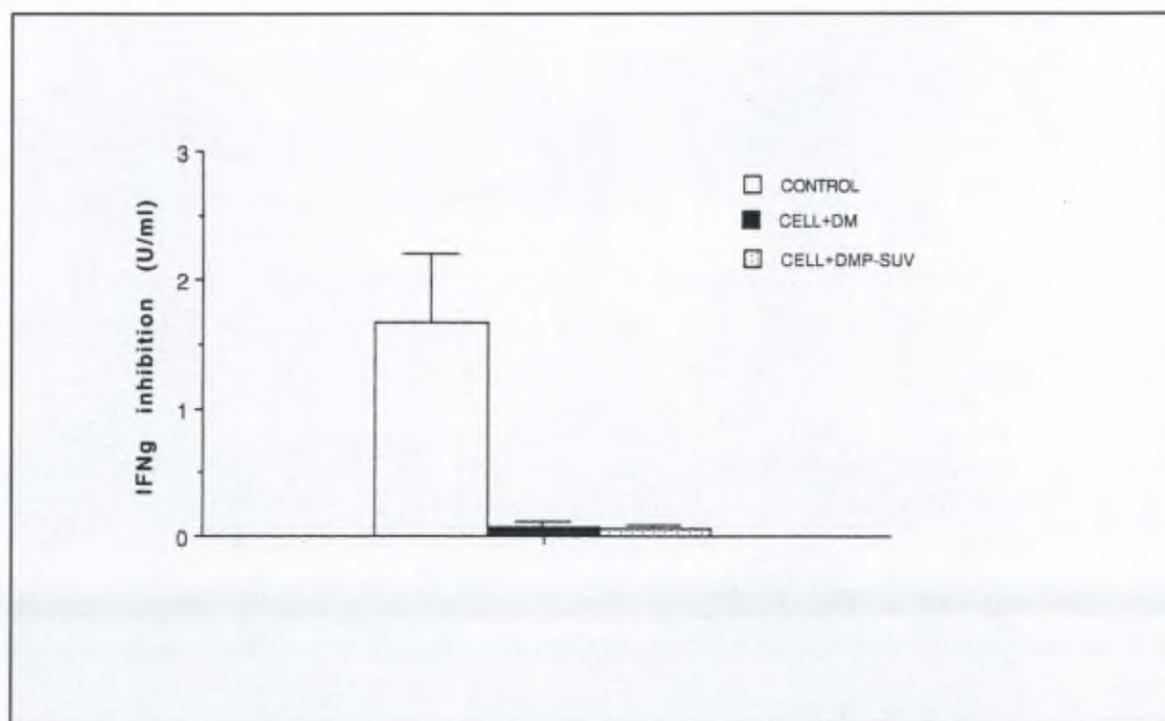
<i>Résultats de 6 donneurs différents</i>						
	A	B	C	D	E	F
Contrôle	363 $\pm$ 27	690 $\pm$ 68	457 $\pm$ 101	1033 $\pm$ 151	585 $\pm$ 53	674 $\pm$ 52
SUV-DMP	59 $\pm$ 7	168 $\pm$ 37	22 $\pm$ 4	34 $\pm$ 6	48 $\pm$ 5	21 $\pm$ 3
DXM	12 $\pm$ 2	46 $\pm$ 4	49 $\pm$ 21	46 $\pm$ 2	42 $\pm$ 2	35 $\pm$ 3
<i>Résultats d'une autre série moyennée (n = 6)</i>						
	<i>Incorporation de [<math>^3</math>H]thymidine</i>			<i>% d'inhibition par rapport au contrôle</i>		
Contrôle	633.8 $\pm$ 94.2			-		
SUV-DMP	36.1 $\pm$ 6.7			94 %		
DXM	38.3 $\pm$ 5.6			94 %		

#### 3.4.4 Effet des SUV-DMP sur la production d'interféron- $\gamma$

Les résultats de ces expériences sont montrés dans le **Tableau 3.6.** et **Fig. 3.30.**

Tableau 3.6. Effet de la DXM ou des SUV-DMP à  $10^{-6}$  M sur la production d'IFN $\gamma$ 

	Contrôle	Con A	Con A + DXM	Con A + SUV-DMP
<i>Série 1</i>	0.04	1.19	0.23	0.11
	0.00	2.43	0.33	0.08
	0.01	4.05	0.24	0.17
	0.07	3.44	0.08	0.16
	0.01	1.19	0.04	0.03
<b>Moyenne</b>	<b>0.03</b>	<b>2.46</b>	<b>0.19</b>	<b>0.11</b>
<b>ESM</b>	<b>0.01</b>	<b>0.58</b>	<b>0.05</b>	<b>0.03</b>
<b>% d'inhibition</b>			<b>92.5</b>	<b>95.5</b>
<i>Série 2</i>	0.00	1.54	0.03	0.00
	0.11	2.64	0.03	0.00
	0.00	1.19	0.04	0.01
	0.01	1.73	0.01	0.22
	0.01	2.32	0.00	0.00
<b>Moyenne</b>	<b>0.03</b>	<b>1.88</b>	<b>0.02</b>	<b>0.05</b>
<b>ESM</b>	<b>0.02</b>	<b>0.26</b>	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>
<b>% d'inhibition</b>			<b>98.9</b>	<b>97.5</b>
<i>Série 3</i>	0.01	0.29	0.01	0.00
	0.00	0.59	0.01	0.04
	0.07	1.03	0.03	0.10
	0.07	0.73	0.01	0.03
	0.00	0.73	0.01	0.00
<b>Moyenne</b>	<b>0.03</b>	<b>0.67</b>	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>
<b>ESM</b>	<b>0.02</b>	<b>0.12</b>	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>
<b>% d'inhibition</b>			<b>97.9</b>	<b>94.9</b>
<b>% d'inhibition moyen</b>			<b>96.0</b>	<b>96.0</b>

Fig.3.30 Effet de la DXM ou des DMP-SUV à  $10^{-6}$  M sur la production d'IFN $\gamma$ .

Seules les quantités maximales de DXM ( $10^{-6}$  M) et de DMP (630  $\mu\text{g/l}$  dans le milieu de culture) ont été utilisées, dans 3 séries différentes de cellules mononucléées. Les résultats confirment entièrement ceux du TTL, puisque l'inhibition est d'environ 96 % aussi bien avec la forme libre de DXM qu'avec la forme liposomale.

### **3.4.5 Conclusions sur l'activité biologique des SUV-DMP**

Les expériences ci-dessus confirment de façon convaincante le fait que la formulation liposomale de DMP conserve, *in vitro*, l'activité biologique de la molécule native, la DXM. Il n'est pas possible de tirer de conclusions biologiques plus fines sur l'activité relative de ces deux formulations, car aussi bien le TTL que la mesure de la production d'interféron- $\gamma$  sont des tests d'immuno-prolifération globaux qui ne sont pas destinés à explorer des mécanismes cellulaires précis.

Cependant, nous pouvons revenir sur le fait que l'effet inhibiteur des SUV-DMP a nécessité une préincubation de 24 heures des liposomes avec les cellules pour se révéler. Bien que nous n'ayons pas testé systématiquement des périodes de préincubation plus courtes, on peut penser que cette phase traduit un phénomène d'interaction particulier des vésicules liposomales avec les cellules. En effet, il serait très improbable que les SUV relâchent de la DXM libre en dehors des cellules, du moins de façon manifeste. Tout d'abord parce que les données de l'analyse conformationnelle montrent un enchâssement profond de la DMP dans la membrane liposomale. Ensuite parce que, dans le TTL, la DXM libre a un effet inhibiteur immédiat sur la prolifération cellulaire, ce qui n'est pas le cas des SUV-DMP, même à dose maximale.

Nous pouvons même pousser le raisonnement plus loin. Il faut se rappeler que les SUV-DMP n'ont montré absolument aucune activité lorsqu'ils étaient déposés en même temps que la Con A, même en continuant l'observation durant deux jours. Une hypothèse serait que la Con A a provoqué, lors de la blastogénèse, une modification membranaire des lymphocytes telle que les liposomes ne puissent plus s'y attacher et/ou s'y fondre. Cet effet rappellerait l'observation déjà ancienne que des liposomes chargés de quantités variables de cholestérol ne peuvent interagir avec les lymphocytes, et modifier leur prolifération, que s'ils sont ajoutés avant le stimulus mitogénique, et pas après (Alderson & Green, 1975 ; Chen &

*Keenan, 1977 ; Ip et al., 1980*). Cela n'étonne guère, quand on connaît l'importance des modifications de la composition membranaire qui accompagnent la blastogenèse des lymphocytes (*Anel et al., 1990*). Des études cellulaires plus poussées pourraient élucider ces aspects particuliers de l'interaction liposomes-cellules, mais elles ne sont pas du ressort du présent travail.

D'autre part, il est remarquable de constater que les SUV-DMP présentent une courbe dose-réponse assez semblable à celle de la DXM libre, lorsqu'on les compare en tenant compte de la quantité de principe actif (DXM) ou de prodrogue (DMP) présent dans le puits. Or, il est connu que l'association de liposomes non dirigés (comme le sont les SUV-DMP) avec des cellules mononucléées humaines en culture ne dépasse jamais 0,1 % de la quantité totale de liposomes déposée dans le puits (*Ozato et al., 1978 ; Weinstein et al., 1977*), ce qui amènerait à « corriger » les quantités effectives de DMP arrivant au contact des cellules en les divisant d'un facteur 100 ou 1000 ! Dès lors, on peut se dire que, dans ces conditions opératoires, les SUV ont apporté le principe actif (DXM) aux lymphocytes sous une forme particulièrement efficace. Est-ce dû à la forme estérifiée de la dexaméthasone ? Est-ce dû à une association de très longue durée, de type « dépôt », entre les liposomes et les cellules ? Ces questions intéressantes devront être abordées dans des études ultérieures. Nous pouvons ajouter, cependant, que des SUV-DMP fabriqués de façon strictement identique à celle du présent travail, mais dans un laboratoire et avec des investigateurs différents, ont montré une activité biologique irréfutable vis-à-vis de macrophages alvéolaires de rat stimulés aux lipopolysaccharides (*Krier, 1997*). La courbe « dose-réponse » de ces expériences, comparée à celle de quantités équivalentes de DXM, était semblable à celle du présent travail.

### **3.4 Production de liposomes stériles et apyrogènes à l'échelle de laboratoire**

Les SUV-DMP ayant démontré leur potentiel pharmacologique de façon probante, il convient de poursuivre les étapes de formulation du médicament par des études pré-cliniques puis cliniques de Phase I. Dans ce but, nous devons tout d'abord produire une quantité suffisante de SUV-DMP stériles et apyrogènes par un procédé validé. Pour cela, la méthode de préparation de *Bangham (1965)* a été utilisée en confinement stérile, dans un concept intégrant toutes les étapes de la production depuis la préparation du film lipidique jusqu'au conditionnement final sous forme de flacon pour lyophilisation (**Fig. 3.55**). Le mode opératoire et la validation du système sont décrits dans le chapitre 2.6.

Le caractère amphiphile de la DMP et la facilité d'encapsulation de ce type de composé dans les liposomes est proche de 100%. Nous avons utilisé comme substance encapsulée de contrôle le rouge ponceau (RP) à 103,5 mg/l. Ce produit hydrophile est utilisé comme marqueur de l'espace aqueux des liposomes et est facilement dosable par spectrophotométrie (New 1990). De plus le RP nous permettra de trouver les paramètres optimaux de la production dans le système décrit dans la **Fig. 3.55**, qui fonctionne sous hotte en confinement stérile. La stérilité de l'équipement de production a été vérifiée par le test de challenge et l'absence de pyrogène par le test du lysat d'amoebocyte de limule (L.A.L.).

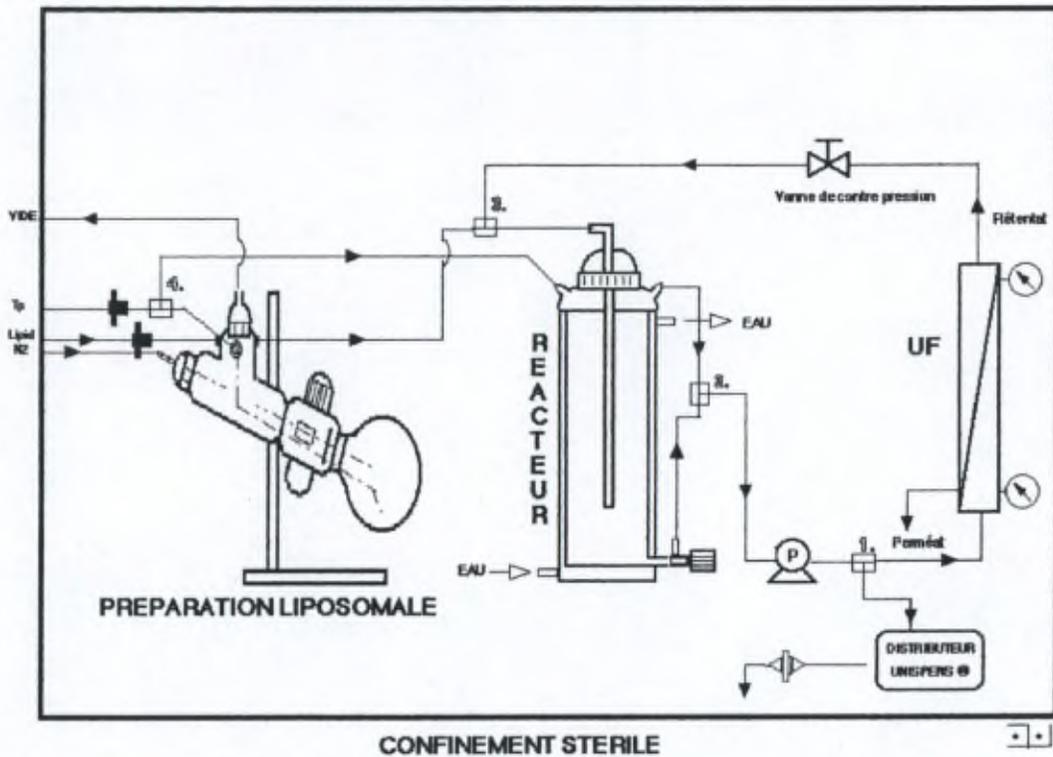


Fig. 3.55. Production de SUV en confinement stérile à l'échelle laboratoire.  
UF = UltraFiltration.

Les lipides dans une composition molaire EPC/cholestérol de 4:3 sont solubilisés à raison de 2 g de lipides pour 50 ml de chloroforme. Le film est séché sous un léger courant d'azote et une pression de 100 mmHg. Lorsque le film est sec après 24 heures sous vide, 120 ml de tampon phosphate contenant le rouge ponceau sont ajoutés et des liposomes MLV sont formés sous agitation lente durant 6 h. Les MLV sont transférés dans le réacteur à double paroi thermostaté à une température supérieure à la température de transition de phase. Ensuite, les MLV sont extrudés en SUV sur une membrane céramique (UF dans la Fig. 3.55) puis purifiés par filtration tangentielle sur la même membrane. La purification est arrêtée lorsque la concentration du rouge ponceau dans le perméat atteint le seuil de quantification. Cela indique que seul le rouge ponceau encapsulé dans les liposomes est présent dans le réacteur. Le remplissage des flacons peut alors débuter.

Les résultats de 3 essais de préparation de SUV, effectués en quintuplas selon la méthode ci-dessus, sont montrés dans le **Tableau 3.7**. Dans deux essais sur trois, l'efficacité d'encapsulation du rouge ponceau, qui est d'environ 9 %, confirme la qualité de la préparation de liposomes. La reproductibilité intra-essai est très bonne. Cependant, la faible encapsulation notée lors du premier essai semble indiquer que l'extrusion s'est poursuivie lors

de l'étape de purification, menant à une perte de principe actif. En effet, la purification est réalisée par la différence de pressions entre la chambre du rétentat et la chambre du filtrat. Une différence de pression trop grande non seulement extrude les liposomes mais détruit certaines vésicules avec perte du traceur.

**Tableau 3.7.** Pourcentages d'encapsulation du rouge ponceau dans des SUV produits en confinement stérile, lors de trois essais différents.

	<i>Essai 1</i>	<i>Essai 2</i>	<i>Essai 3</i>
	3,57	9,18	8,87
	5,29	9,81	9,11
	3,89	9,65	9,32
	3,91	9,15	9,50
	4,25	9,06	8,13
Moyenne ± DS	4,18 ± 0,67	9,37 ± 0,34	8,99 ± 0,54

Pour des raisons de disponibilité d'équipement, utilisé pour la production de lots cliniques de liposomes contenant un anesthésique local et de priorités, la caractérisation des vésicules produites n'a pas pu être poussée plus loin. De plus, la lenteur et la complexité de ce procédé limitent fortement son utilisation à l'échelle du laboratoire, et prohibent quasiment son utilisation à l'échelle pilote et industrielle.

Néanmoins, les idées brassées lors de la mise au point de ce système de production m'ont amené à imaginer un nouveau procédé de production de liposomes, décrit dans les paragraphes suivants.

### **3.5 Production de liposomes à l'échelle pilote et industrielle**

#### **3.5.1 Etat de l'art**

Comme nous l'avons discuté dans l'INTRODUCTION, quasiment tous les procédés de fabrication des liposomes souffrent d'un ou de plusieurs inconvénients lorsqu'il s'agit de les adapter à la fabrication en masse pour les applications pharmaceutiques, en particulier pour produire des populations de liposomes de grande taille (diamètre  $> 0,2 \mu\text{m}$ ) avec des granulométries étroites. Nous allons tenter de mettre au point un nouveau procédé de fabrication de liposomes qui ne présente pas les inconvénients des techniques actuelles. Pour cela, nous tiendrons compte des éléments suivants :

1. La morphologie et l'homogénéité de la population de liposomes et leur comportement *in vivo* sont déterminés par le procédé de fabrication, la composition des mélanges lipidiques et la nature de la solution aqueuse de dispersion. Une technique de préparation bien définie avec une composition lipidique fixe et des protocoles opératoires validés sont les conditions-clés pour produire une population de liposomes avec une reproductibilité acceptable, adaptée à une utilisation pharmaceutique.
2. Pour s'assurer d'une reproductibilité optimale des liposomes chargés en principes actifs *in vivo*, l'évaluation des paramètres physico-chimiques de la dispersion est essentielle telle que la taille, le nombre de bicouches lipidiques c'est à dire le type de liposomes SUV, MLV, et l'efficacité d'encapsulation. En général, les paramètres mentionnés dans les études publiées se réfèrent seulement aux données moyennes. Mais celles-ci ne sont pas suffisantes ; il faut également prendre en compte l'homogénéité des dispersions (*Martin, 1989*). Qui reste le point clé dans la production de tous les systèmes colloïdaux à ce jour, microémulsion, nanosphères, etc.
3. La taille des particules liposomales est essentielle pour leur utilisation thérapeutique. Dans l'arbre respiratoire, par exemple, les particules inhalées atteignent des sites différents

selon leur taille. Seules les particules de 0,2 à 1  $\mu\text{m}$  se logent dans les alvéoles et y restent stables. Par conséquent, pour certaines utilisations thérapeutiques, il est très important de fournir une population de liposomes ayant une granulométrie la plus étroite possible. En outre, une distribution homogène de la population de liposomes augmente la faisabilité et la reproductibilité de la composition pharmaceutique de liposomes caractérisés par la nature du produit actif et son efficacité d'encapsulation.

4. A l'heure actuelle, les procédés les plus directs pour produire des populations de liposomes à grande échelle sont basés sur l'homogénéisation à grand cisaillement. L'inconvénient majeur de ce procédé est qu'il ne permet de produire que de petits liposomes ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ) avec une granulométrie relativement restreinte. Pour la production de grands liposomes multilamellaires ( $> 1 \mu\text{m}$ ), on peut utiliser le procédé d'hydratation d'un film lipidique. Toutefois, ce procédé est difficile à extrapoler à l'échelle industrielle en raison des petites surfaces disponibles pour sécher le film lipidique mince avant l'étape d'hydratation. Dès lors, le procédé d'hydratation d'un film lipidique conduit à la formation des vésicules caractérisées par des granulométries larges et par une population bimodale ou même polymodale (Martin, 1989). De nos jours, aucun procédé n'est disponible pour la production à grande échelle de liposomes unilamellaires ou oligo-lamellaires avec une granulométrie étroite dans la gamme de 0,2 à 1  $\mu\text{m}$ .

### **3.5.2 Méthodes brevetées de préparation industrielle de liposomes**

Certains brevets intéressants relatifs à la préparation industrielle de liposomes au départ de la méthode de Bangham ont été déposés. Nous en examinerons deux, directement liés à la problématique que nous traitons.

#### **3.5.2.1 Production par extrusion de liposomes**

Le brevet US 4737323 (Martin et al., 1988) décrit un procédé de production d'une suspension de liposomes avec une taille à peu près uniforme et une taille moyenne choisie. Ce procédé comprend deux étapes : la première pour fournir une suspension de liposomes de taille homogène avec une proportion importante de liposomes de taille supérieure à 1  $\mu\text{m}$ , et

la seconde pour passer la suspension sous pression sur un filtre céramique asymétrique dont la taille des pores de la surface interne est supérieure à la taille moyenne désirée des liposomes.

Par conséquent, cette invention propose d'utiliser un filtre céramique asymétrique uniquement pour la filtration de liposomes déjà préparés. En outre, le procédé inventé est difficilement adaptable à l'obtention de liposomes dans un récipient unique, en grandes quantités et dans des conditions compatibles avec une production commerciale. En effet, dans ce procédé, les liposomes sont formés de façon traditionnelle, c'est-à-dire à l'aide d'un évaporateur rotatif. Or, la surface traditionnelle d'un ballon de 100 litres, capacité maximale à l'échelle industrielle, est d'environ 1 m<sup>2</sup>; elle pourrait augmenter d'environ 20 % si on ajoutait des microbilles de verre au ballon. Cette surface reste toutefois insuffisante pour produire des liposomes avec un coût de revient acceptable.

### **3.5.2.2 Production par un évaporateur adapté**

Dans le brevet US 5028297 (*Bracken, 1991*), l'auteur a proposé d'augmenter la surface d'évaporation grâce à un évaporateur fonctionnant de façon discontinue pour former un film de lipide amphiphile et pour la vésiculation de ce film en phase aqueuse. Ce dispositif comprend une pale de rotor fixée sur un arbre en rotation disposé dans une chambre où les liposomes sont préparés. Toutefois, ce procédé est compliqué et coûteux, il n'augmente pas suffisamment la surface de production de liposomes, et il n'assure pas l'homogénéité de la population produite. Une étape supplémentaire de calibrage de la population de liposomes obtenue est donc requise. Le procédé de calibrage comprend une filtration et/ou une extrusion sur une membrane ou sur un filtre céramique. Par conséquent, cette étape supplémentaire augmente la complexité de l'installation et ne garantit pas la stérilité du produit obtenu. De plus, cette invention ne prend pas en compte les exigences d'assurance-qualité et de Bonnes Pratiques de Fabrication liées à la production du médicament. En effet, la validation et la traçabilité des liposomes produits par cet appareil seront longues et coûteuses.

### 3.5.3 **Le Réactosome™**

#### 3.5.3.1 **Introduction**

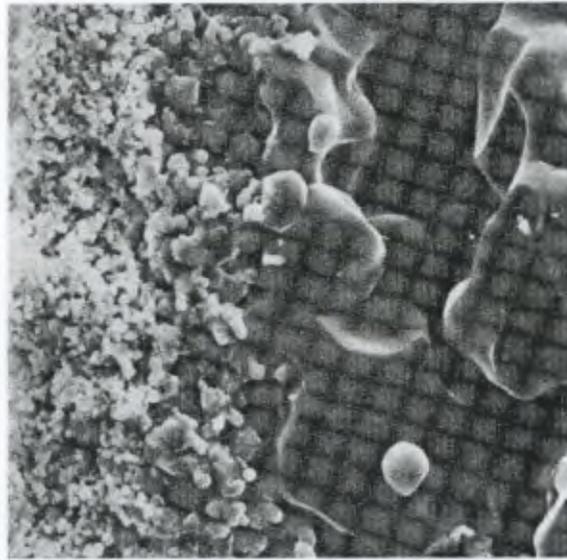
Le Réactosome que nous avons développé constitue un nouveau procédé et une nouvelle installation de préparation de liposomes qui ne présentent pas les inconvénients de ceux de l'état de l'art. Il a été développé afin de permettre la production de liposomes par une méthode qui remplisse les conditions suivantes :

1. Méthode simple et rapide basée sur l'évaporation de solvant.
2. Production à l'échelle laboratoire, pilote et industrielle.
3. Choix de la taille des liposomes (0,2 à 1  $\mu\text{m}$ ) et distribution monomodale.
4. Purification des liposomes.
5. Production stérile et apyrogène.
6. Reproductibilité du procédé de production en terme de granulométrie, d'efficacité d'encapsulation et de mode de libération.

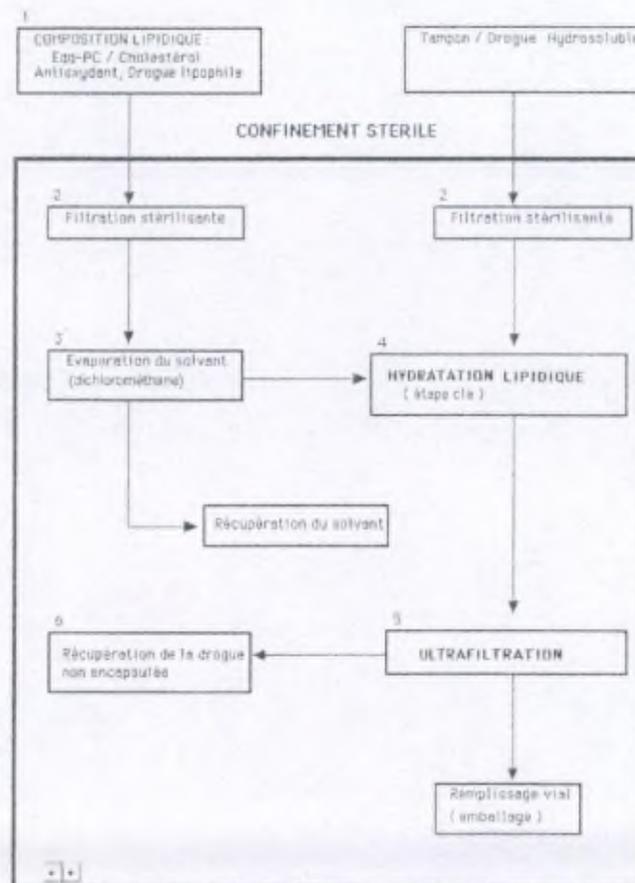
Pour répondre aux 6 conditions ci-dessus, nous avons développé le réacteur à liposomes (Réactosome). Ce réacteur est basé sur la méthode de fabrication de liposomes de Bangham, c'est-à-dire la dispersion physique de lipides en milieu aqueux qui conduit à la formation spontanée de bicouches phospholipidiques. Ce procédé peut être divisé en trois étapes : la première correspond à l'évaporation du solvant avec formation d'un film lipidique, la seconde à l'hydratation du film et la troisième à l'extrusion/purification. En prenant comme support d'évaporation des membranes en céramique inertes qui sont utilisées dans la filtration tangentielle (**Fig. 3.56**), nous avons répondu à deux problèmes majeurs de l'application industrielle de la méthode de Bangham, à savoir la faible surface spécifique des ballons et l'hétérogénéité des liposomes produits. Un brevet relatif au Réactosome a été déposé et vient d'être enregistré (*Benameur & Moës, 2001*).

#### 3.5.3.2 **Principe général de fabrication de liposomes dans le Réactosome**

Le principe général du Réactosome est schématisé dans la **Fig. 3.57**. Il comprend plusieurs étapes.



**Fig. 3.56.** Microscopie électronique à balayage de la membrane céramique.



**Fig. 3.57.** Schéma général du principe de préparation de liposomes à large échelle qui a été suivi dans la conception du Réactosome.

La première étape est celle de formation d'un film lipidique sur un filtre céramique (**Fig. 3.58A**). Celui-ci peut être symétrique ou asymétrique. Par filtre céramique asymétrique, on entend que la taille des pores diminue du côté interne au côté externe. Le film lipidique est formé d'un lipide ou d'un mélange de lipides tels que les phospholipides et/ou le cholestérol et éventuellement d'un principe actif lipophile, le tout dissous dans un solvant organique comme le dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ou dans un mélange de solvants organiques. La solution de lipides est filtrée sur une membrane PTFE de  $0,2 \mu\text{m}$  avant l'étape de formation de film sur le filtre céramique. La céramique étant poreuse nous appliquons une contre pression égale au point de bulles de la membrane afin de maintenir la solution lipidique dans le réacteur. Le gaz vecteur utilisé est de l'azote de qualité pharmaceutique. L'azote est préalablement filtré et chauffé par passage sur une résistance chauffante. Ce système permet d'atteindre les températures supérieures à la  $T_c$  des lipides et l'évaporation du dichlorométhane de façon contrôlée. Ce dernier est recyclé dans un piège à solvant pour être réutilisé. Lorsque tout le solvant est évaporé. Le film sera séché sur la surface du filtre céramique après l'élimination du solvant grâce à la dépression créée par la pompe à vide pendant une nuit. Le taux résiduel maximum de dichlorométhane dans le film lipidique est de 30 ppm.

La seconde étape est la phase d'hydratation du film lipidique obtenu par l'utilisation d'une solution aqueuse également filtrée (de préférence un tampon) dans lequel on dissout éventuellement des principes actifs hydrophiles. La phase aqueuse se présente du même côté que la solution lipidique. Le film hydraté se gorge d'eau et le caractère amphiphile des phospholipides forme des lambeaux de bicouches hétérogènes. Le confinement et la structure du filtre céramique oriente les structures et calibre les liposomes lors de leurs passages dans la lumière de la membrane (**Fig. 3.58B**).

La population de liposomes obtenue au moyen du Réactosome possède une distribution de tailles étroite : diamètre moyen dans la gamme de  $0,1$  à  $5 \mu\text{m}$ , ou plus précisément de  $0,2$  à  $1 \mu\text{m}$ . Le rapport [écart-type]/[diamètre moyen] de la population de liposomes est compris entre  $0,1$  et  $20 \%$ , ou plus précisément entre  $8$  et  $15 \%$ . Les conditions opératoires précises sont décrites plus loin.

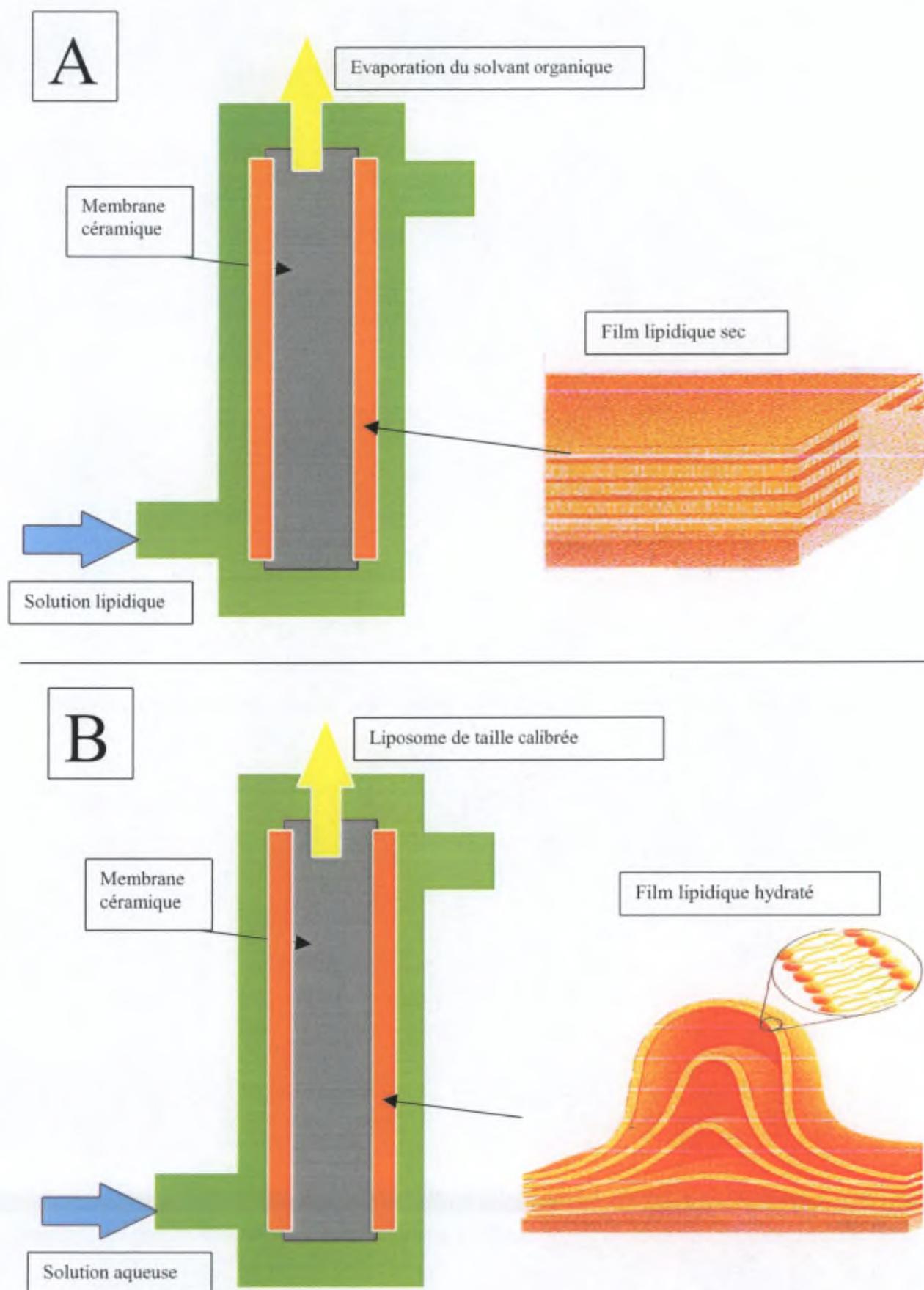


Fig. 3.58. Formation (A) et hydratation (B) du film lipidique dans le Réactosome.

### 3.5.3.3 *Description du Réactosome*

L'installation de production de liposomes est décrite dans les figures suivantes (**Figs. 3.59 à 3.62**).

Le schéma général de l'installation industrielle (**Figs. 3.59**) comprend le réacteur liposomal réactosome constitué du filtre céramique (11) dans lequel les liposomes sont formés, une unité de pompe de recirculation (3), des indicateurs de pression d'entrée et de sortie (4), un indicateur de débit (17), une pompe à vide (6), une unité de filtration stérilisante en inox des solutions aqueuse et organique contenant une membrane PTFE 0,2  $\mu\text{m}$  (8), des cuves inox de solution lipidiques pour la formation du film (9), et des cuves de milieux aqueux pour l'étape d'hydratation (10).

La figure 3.60 détaille le Réactosome lors des étapes de formation du film lipidique (fig .2) et lors de l'étape d'hydratation (fig.3) tel qu'utilisé dans le laboratoire pour nos essais d'encapsulation décrits ci-dessous.

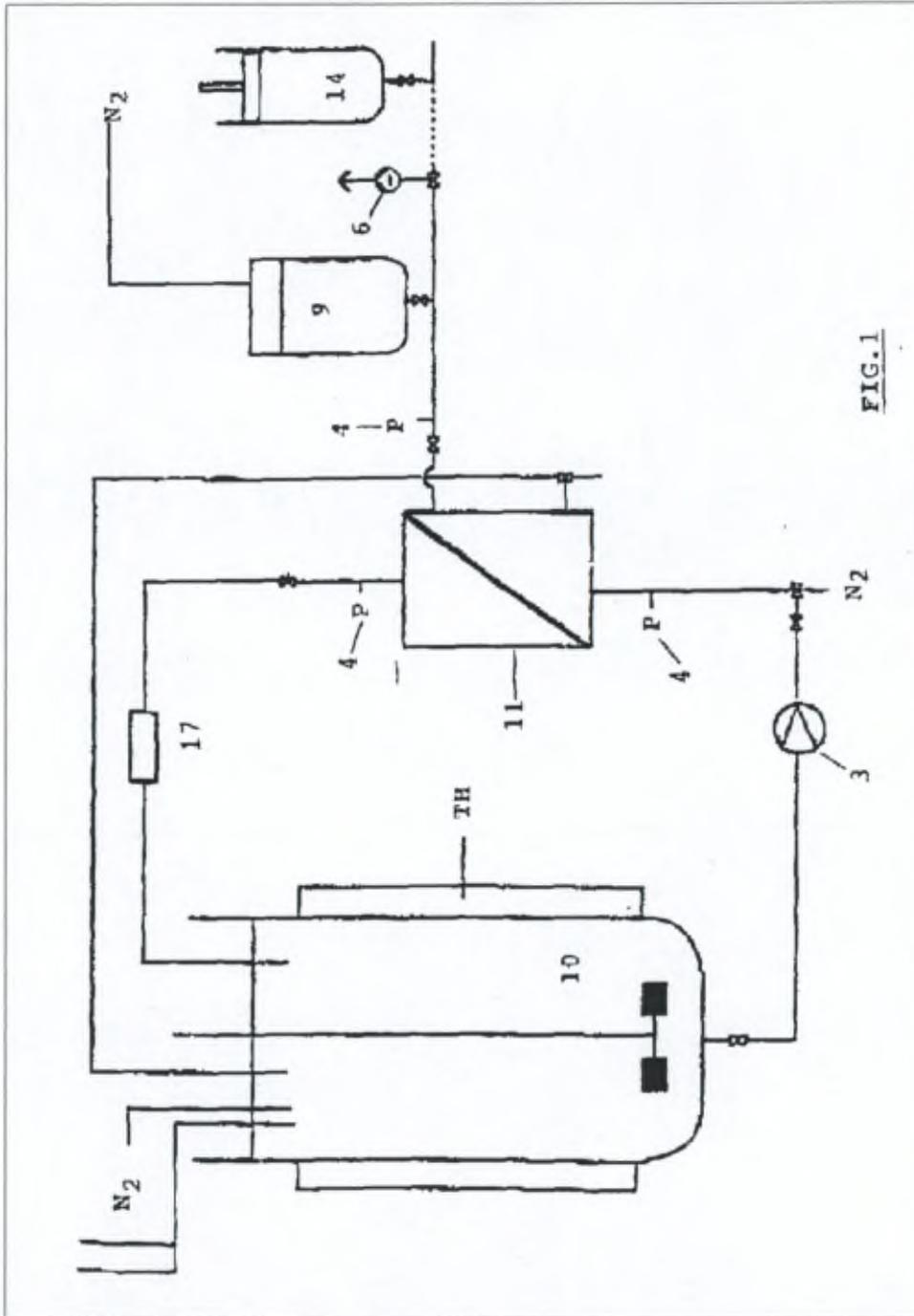
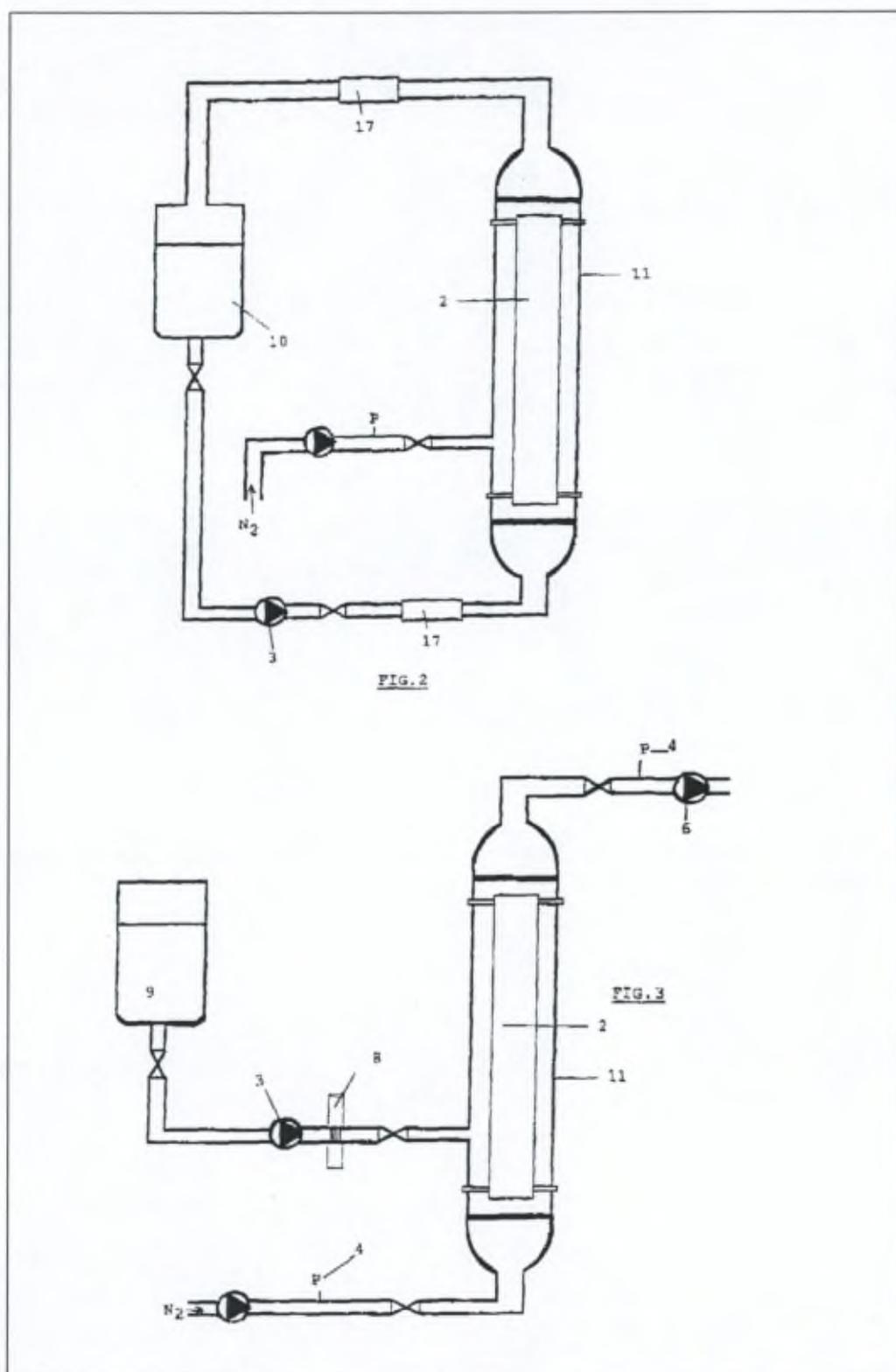


FIG. 1

**Fig. 3.59.** Vue d'ensemble du Réactosome, comprenant le réacteur liposomal (11), son pompage membranaire (3), ses indicateurs de pression d'entrée et de sortie (4), et son indicateur de débit (17). A gauche, les cuves de milieu aqueux (10) thermostatisées (TH) et baignées d'azote ( $N_2$ ) ; à droite, la cuve de lipides (9) également baignée d'azote et munie d'une pompe à vide (6).



**Fig. 3.60.** Détails du schéma du Réactosome, en particulier du réacteur (11) contenant le filtre céramique asymétrique (2), avec d'un côté la cuve de lipides (9) et son pompage membranaire (3) muni d'un filtre (8), et de l'autre la cuve de milieu aqueux (10) également sous pompage (3), avec des indicateurs de débit (17).

Le Réactosome comprend un filtre céramique poreux symétrique ou asymétrique qui se présente sous la forme d'une canne cylindrique percée de plusieurs canaux principaux longitudinaux, dans lesquels s'ouvrent des micro canaux plus étroits disposés transversalement (**Fig. 3.61**). Le filtre céramique possède les caractéristiques suivantes :

♦ longueur	900 mm
♦ diamètre	25 mm
♦ diamètre des 19 canaux principaux	2,5 mm
♦ volume vide	90 ml (30 %)
♦ taille des pores du filtre céramique	8 à 100 $\mu\text{m}$
♦ taille de pores de la membrane	< 1 $\mu\text{m}$

Les avantages de l'utilisation du filtre céramique sont la grande surface obtenue, l'utilisation d'une matière inerte ayant une haute résistance chimique et une forte résistance mécanique, et dont l'échelle est choisie par assemblage modulaire. Le Réactosome industriel peut comprendre différents réacteurs liposomaux disposés en parallèle (**Fig. 3.62**).

A l'échelle du laboratoire, la capacité du Réactosome est de 100 ml de dispersions de liposomes contenant au minimum 10 mg de lipides par millilitre. En augmentant le volume du réacteur liposomal, la capacité de production peut facilement être amenée à des valeurs de 1 à 10 litres. On pourrait même utiliser une installation de production à une échelle supérieure, pour des lots industriels de 100 à 200 litres de liposomes fortement concentrés. L'augmentation de l'échelle de production permet d'utiliser des équipements industriels (pompes, capteurs, cuves...) de mieux en mieux adaptés.



Fig. 3.61. Vue du filtre céramique poreux de type MicroKerasesp (Rhône Poulenc).

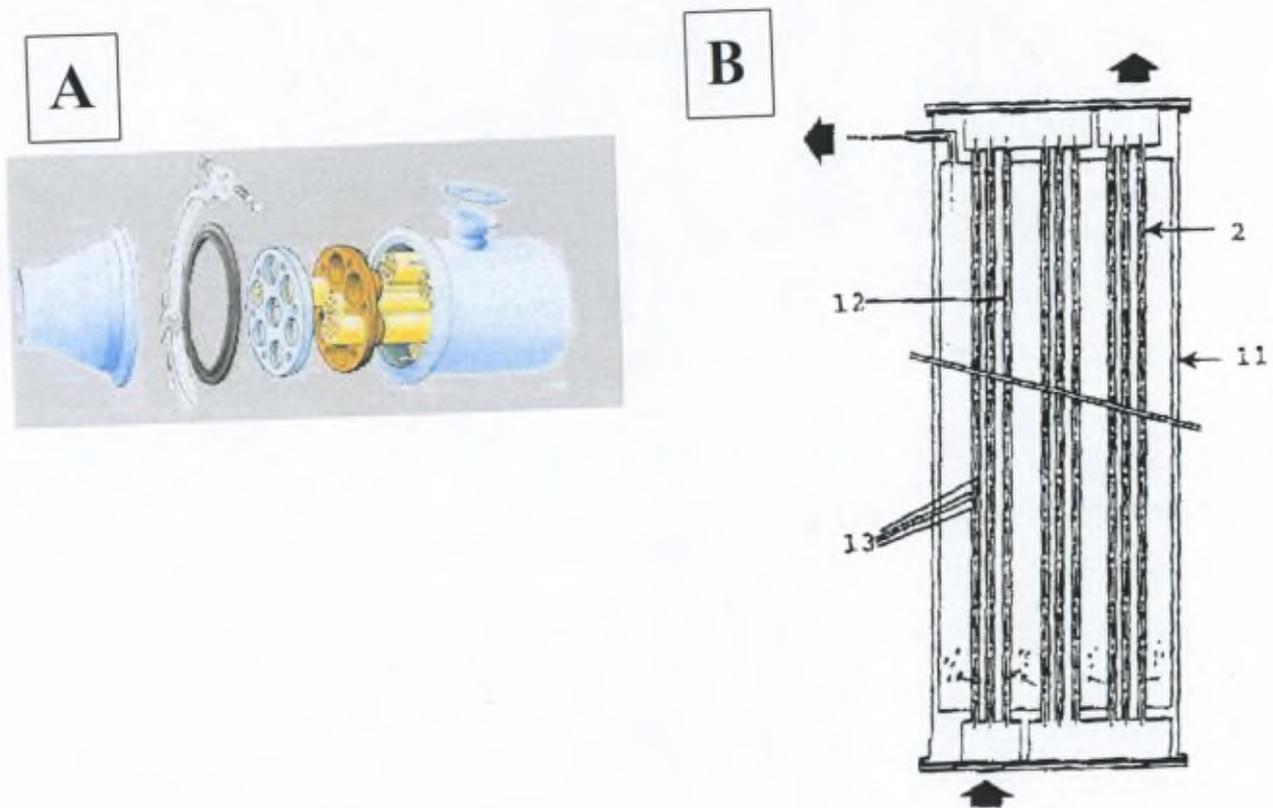


Fig. 3.62. Assemblage parallèle de plusieurs membranes céramiques (A, modèle commercial) et de plusieurs réacteurs liposomaux (B). Le schéma B peut faire partie du Réactosome.

### 3.5.4 Production de liposomes avec le Réactosome

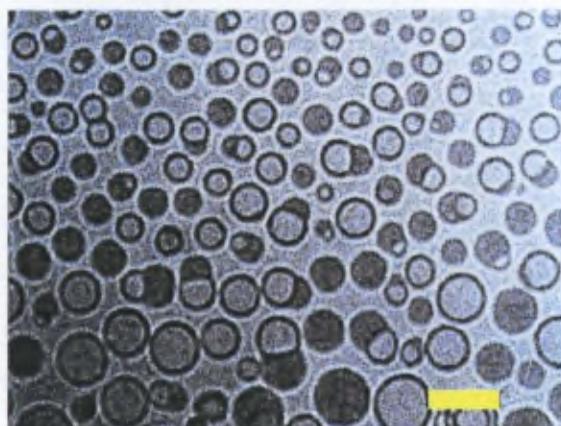
#### a) Formation du film

Les lipides (phospholipides, cholestérol), et éventuellement les principes actifs lipophiles sont solubilisés dans le solvant organique. Nous avons pris environ 40 g de lipides (30 g d'EPC et 10 g de cholestérol) dissous dans 100 ml de dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) dans la cuve de lipides (n° 9 dans la Figs. 3.60). Cette solution de lipides est filtrée sur une membrane PTFE de 0,2  $\mu\text{m}$  et transférée dans le réacteur liposomal (11) à l'aide de l'unité de pompage membranaire débit de 10 ml/min (3).

Afin d'éviter la percolation de la solution lipidique, une contre-pression est appliquée au moyen d'azote filtré sur un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  et chauffé à une température 20°C supérieure à la température de transition de phase des phospholipides utilisés. Dans notre cas la EPC à une transition de phase comprise entre -7°C et -15°C, par conséquent, nous utiliserons une température de  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , contrôlée par la double paroi chauffée par recirculation d'un fluide caloporteur. Ces bonnes conditions opératoires permettent non seulement l'évaporation du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  mais également de contre carrer le refroidissement du réacteur dû à l'évaporation. En effet, la température minimale atteinte à l'intérieur du réactosome est de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . La contre-pression choisie correspond au point de bulle de la membrane pour du dichlorométhane. Elle maintient la solution de lipides dans les microcanaux (13) du filtre céramique. Cette solution est déposée sur la surface du filtre céramique asymétrique (2) sous pression réduite de 262 mm Hg. Le dichlorométhane résiduel est éliminé sous haut vide grâce la pompe à vide à  $10^{-7}$  torr pendant une nuit (12 à 18 h). On obtient un film lipidique sec contenant au maximum 30 ppm de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

#### b) Hydratation

L'hydratation du film lipidique sec déposé sur le filtre en céramique asymétrique (2) est réalisée avec une solution tampon phosphate à pH 7,4 dans lequel on a dissous du rouge ponceau à 0,1 mg/ml comme molécule-traceur (New, 1990). Comme expliqué plus haut, les phospholipides gonflent et se détachent du filtre céramique (2) pour former des vésicules hétérogènes qui sont en même temps "extrudés" grâce à la membrane filtrante (cf fig 3.56). Au cours de cette étape, des liposomes présentant une granulométrie étroite sont formés. Il ne s'agit pas d'une vraie extrusion, mais d'une formation calibrée de petites vésicules unilamellaires (SUV, pour *small unilamellar vesicles*) comme révélé en microscopie électronique (Fig. 3.63).



**Fig. 3.63.** Microscopie électronique à transmission des SUV obtenus avec le Réactosome bar = 2  $\mu\text{m}$ .

#### *c) Purification*

L'élimination du rouge ponceau non encapsulé est effectuée en utilisant une microfiltration tangentielle. En effet, nous pouvons utiliser le réactosome lorsque les liposomes sont formés comme système de purification en mode diafiltration, comme expliqué au point 3.5.

#### *d) Résultats expérimentaux*

Les déterminations analytiques ont été réalisées sur 5 lots différents de produits finaux. Le taux d'encapsulation du rouge ponceau a été déterminé par colorimétrie après l'extraction des lipides par la méthode de Bligh-Dyer. Les phospholipides ont été dosés par la méthode de Stewart. La taille des liposomes et la distribution de la taille des vésicules ont été déterminées par spectrophotométrie à corrélation de photons (PCS, Malvern).

Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 3.8**. Le taux d'encapsulation moyen du rouge ponceau dans les SMLV est d'environ 10 %. Ces données sont conformes à celles trouvées dans la littérature pour les composés hydrosolubles encapsulés dans des liposomes préparés par le procédé de film mince (New, 1990).

**Tableau 3.8.** Mesures d'encapsulation du rouge ponceau dans 5 lots différents de SUV produits au moyen du Réactosome.

## QUANTITE ENGAGEE LORS DE LA PRODUCTION

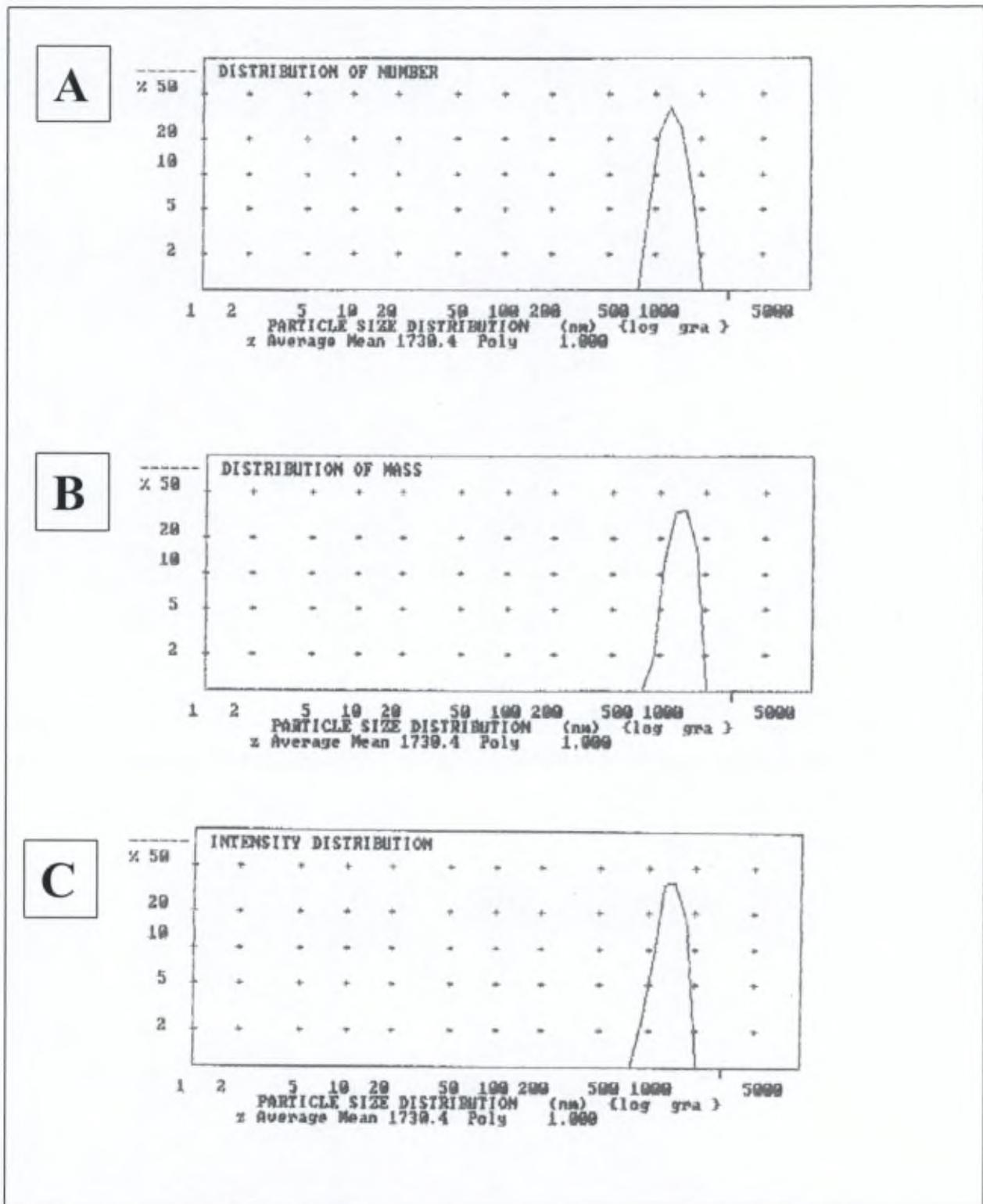
LOT N°	EPC (mg/ml)	CH (mg/ml)	RP (mg/ml)
94G05	30,250	11,580	0,118
94G28	29,440	11,480	0,118
94H02	29,800	11,650	0,100
94H08	29,280	11,560	0,100
94H18	10,089	3,853	0,100

## QUANTITE MESUREE APRES LA PRODUCTION

LOT N°	EPC (mg/ml)	CH (mg/ml)	RP (mg/ml)	% Encapsulé	% Encapsulé (mg RP/mg EPC)	% Rendement	Taille (nm)
94G05	27,982	N.D.	0,012	10,3	0,043	92,5	1505
94G28	24,581	N.D.	0,011	9,0	0,043	83,5	1730
94H02	26,890	N.D.	0,014	14,2	0,053	90,8	1400
94H08	25,487	N.D.	0,010	10,0	0,039	87,1	1208
94H18	6,400	N.D.	0,007	6,8	0,107	63,5	1720

Les composés lipophiles, par contre, sont encapsulés avec une efficacité de 100 % s'ils ne sont pas présents en quantité dépassant la capacité d'encapsulation de la bicouche lipidique, comme démontré précédemment.

Les distributions des tailles des vésicules formées dans deux lots différents, représentées en nombre, en masse et en intensité, sont montrées dans les **Fig. 3.64 et 3.65**. La taille moyenne est identique quel que soit le mode de présentation utilisé. Nous pouvons en conclure que nous avons produit une distribution homogène de liposomes d'un diamètre moyen de l'ordre de 1600 nm.



**Fig. 3.64.** Résultats des mesures de taille, par l'appareil Zetasizer (Malvern), d'un premier lot de SUV produits au moyen du Réactosome. Les distributions en nombre (A), en masse (B) et en intensité (C) sont montrées.

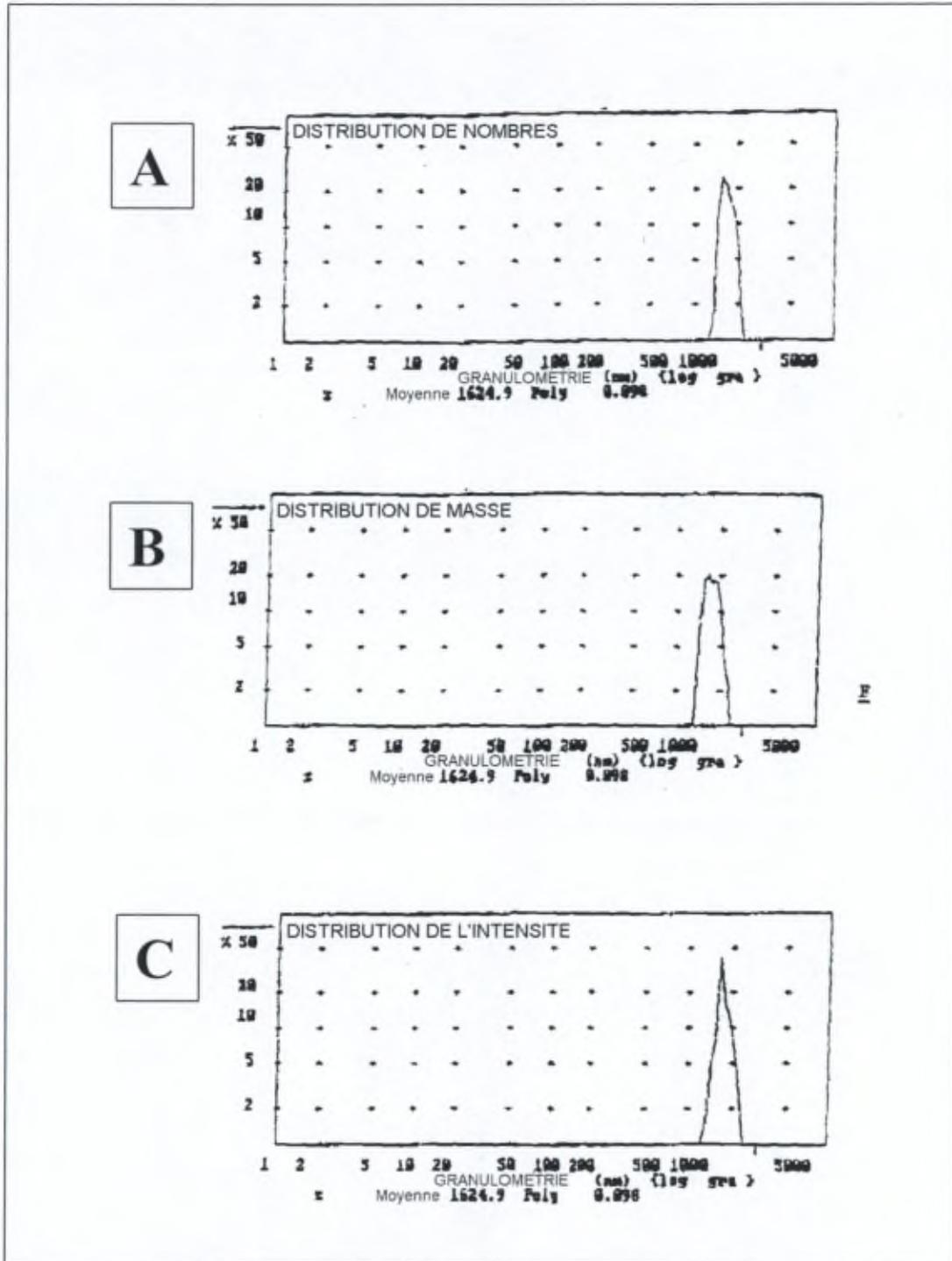


Fig. 3.65. Résultats des mesures de taille, par l'appareil Zetasizer (Malvern), d'un deuxième lot de SUV produits au moyen du Réactosome. Les distributions en nombre (A), en masse (B) et en intensité (C) sont montrées.

Il resterait maintenant à produire des SUV-DMP par le procédé industriel que nous avons inventé, et à les contrôler. Dans le contexte du présent travail, et tout en restant dans l'idée de fabriquer un médicament liposomal efficace et sûr, nous nous sommes aussi interrogé sur la conservation des liposomes ainsi produits. Des études préliminaires ont été menées dans cette optique ; elles seront discutées dans les paragraphes suivants, qui représentent la dernière partie de ce travail.

### **3.6 Etudes préliminaires des conditions de lyophilisation des liposomes**

#### **3.6.1 Lyophilisation en conditions standard**

Pour obtenir une meilleure conservation des liposomes, ceux-ci devraient être lyophilisés. La lyophilisation est une technique qui permet de retirer l'eau des systèmes biologiques ou non par sublimation de la glace. Elle est divisée en trois étapes : la congélation, la sublimation et la désorption thermique. Cependant, comme rappelé dans l'INTRODUCTION (1.4.3.2), les conditions de lyophilisation des liposomes sont loin d'avoir été optimisées, et l'aspect galénique et pharmaceutique du problème reste trop peu exploré, en dehors de l'effet des cryoprotecteurs, qui sont généralement considérés indispensables. Nous avons commencé l'étude de conservation des liposomes sous forme lyophilisée par des expériences simples.

Tout d'abord, des liposomes MLV ont été préparés avec et sans cryoprotecteur. Les cryoprotecteurs les plus utilisés étant les disaccharides (*Crowe & Crowe, 1988 ; Talsma et al., 1991*), nous avons choisi le tréhalose et le saccharose à une concentration de 10 % (m/m) par rapport à la masse lipidique engagée, c'est-à-dire à raison de 2 mg par ml de dispersion liposomale. De plus, les liposomes contenaient 10 mg/ml de rouge ponceau afin de suivre la rétention du principe actif lors de la lyophilisation dans le GT4.

Il est généralement admis qu'à une température suffisamment basse ( $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), toutes les solutions sont congelées. En première approche, nous avons donc lyophilisé les liposomes sans tenir compte des paramètres contrôlant la lyophilisation (température de congélation totale, température de fusion commençante, température maximale de sublimation, vitesse de

congélation, etc). Le lyophilisateur GT4 étant équipé d'un système d'enregistrement graphique de la pression et de la température du condenseur, et de la température des plateaux et du produit, nous avons pu relever les conditions de lyophilisation suivantes :

Volume engagé:	5 ml
Température de congélation:	-37,5 °C
Vitesse de congélation :	2 °C/min
Température de sublimation	-37,5 °C
Pression de sublimation	0,2 mbar
Durée de sublimation :	66 heures
Température de désorption	-20 °C
Durée de désorption	40 heures

Les résultats des mesures de rétention du rouge ponceau en MLV lyophilisés dans ces conditions opératoires sont présentés dans le **Tableau 3.9**. Les phospholipides ont été dosés par la méthode de Stewart.

**Tableau 3.9.** Mesures de la rétention du rouge ponceau après lyophilisation des liposomes.

	Concentration du rouge ponceau (mg/ml)	Encapsulation (%)	Dosage des phospholipides (mg/ml)
<i>MLV sans tréhalose</i>			
Avant lyophilisation	8,3	9,7	12,98
Après lyophilisation	9,0	10,5	14,50
<i>MLV avec 10 % de tréhalose</i>			
Avant lyophilisation	10,6	11,2	13,51
Après lyophilisation	9,8	10,4	13,7

Nous constatons tout d'abord que l'efficacité d'encapsulation du rouge ponceau en MLV est identique à celle obtenue lors des essais préliminaires d'encapsulation, c'est-à-dire 8 à 12 %.

Pour les MLV sans tréhalose, le pourcentage de rétention du rouge ponceau après lyophilisation (108 %) dépasse 100 %. Un pourcentage de rétention supérieur à 100 % peut s'expliquer si, au cours de la lyophilisation, la texture poreuse du produit s'est affaissée, entraînant une déformation du réseau interstitiel, les réseaux de matières sèches confluent et forment une couche imperméable. Il est dès lors plus difficile de réhydrater le produit lyophilisé ; le rouge ponceau se concentre, ce qui se traduit par un pourcentage de rétention apparemment supérieur à 100 %.

Pour les MLV avec tréhalose, le pourcentage de rétention du rouge ponceau atteint 92%. On peut supposer que le cryoprotecteur a empêché un affaissement de texture et a permis une bonne réhydratation. Néanmoins, dans les deux cas (avec et sans cryoprotecteur), le pourcentage de rétention est fort élevé. On peut dès lors penser que le taux d'humidité résiduel n'est pas descendu assez bas pour entraîner une perte de produit encapsulé (*Talsma et al., 1991*).

### 3.6.2 Examen des conditions de lyophilisation

En observant la texture des lyophilisats de MLV lors de ces premières expériences, nous constatons que plusieurs phases solides sont présentes : les sels (cristaux blancs) et les liposomes (poudre rouge). Normalement, si la lyophilisation avait été menée dans les bonnes conditions, il n'y aurait qu'une seule phase solide ou du moins homogène (eutectique). Dès lors, il se peut que les échantillons n'aient pas été totalement congelés, c'est-à-dire que la **température de congélation totale ( $T_{cs}$ )** n'ait pas été atteinte au moment où la sublimation débutait.

De plus, la durée de lyophilisation est beaucoup trop longue (plus de 4 jours). Cela s'explique par le fait que les températures de sublimation et de désorption thermique n'ont pas été optimisées. En effet, la vitesse de lyophilisation est proportionnelle à la différence de pression de vapeur entre le front de sublimation et le condenseur, ces pressions de vapeur augmentant avec la température. Comme la température au niveau du condenseur est fixe, on

ne peut jouer que sur la température au niveau des plateaux. Pour augmenter la vitesse de lyophilisation, il faut essayer de travailler à la température la plus haute possible sans jamais dépasser la **température de fusion commençante** ( $T_{im}$ ) du produit, sous peine d'un affaissement de texture. La vitesse de lyophilisation optimale sera obtenue pour une température inférieure de quelques degrés à la  $T_{im}$  du produit à lyophiliser.

Si l'on souhaite optimiser les conditions de lyophilisation des liposomes et procurer par là un gain de temps et d'énergie, il est donc nécessaire de déterminer  $T_{cs}$  et  $T_{im}$  avant d'entamer le processus. Une technique qui permet de déterminer ces températures est la mesure de la résistance électrique des produits (ou inversement de leur **conductivité**) au cours de leur congélation et décongélation. Pour bénéficier de cette technique, il faut trouver l'appareil adéquat, l'étalonner et vérifier la reproductibilité des mesures au moyen de solutions dont on connaît la température eutectique. Ce n'est qu'à la fin de notre travail que nous avons pu disposer d'un « moniteur eutectique » qui permettait de réaliser ces mesures avec une précision de 1 °C. Auparavant, nous avons effectué une série d'essais préliminaires de mesure des conditions de lyophilisation avec un conductimètre et un lyophilisateur GT3.

### 3.6.3 *Mesure de la conductivité de solutions de référence*

Nous avons d'abord réalisé une étude de faisabilité de la mesure de  $T_{cs}$  et  $T_{im}$  par conductimétrie. Au cours de la congélation, une forte augmentation de résistance signale un début de cristallisation eutectique (= point eutectique ou TE) ; lorsque cette augmentation ralentit, tout le liquide interstitiel est cristallisé. La température à laquelle la totalité du produit est congelé est le  $T_{cs}$ . Au cours de la décongélation, une nette diminution de résistance indique un début de fusion interstitielle. La température à laquelle la première goutte de liquide apparaît est le  $T_{im}$ .

Les mesures ont été effectuées au moyen d'un conductimètre Hanna HI 9032 (cf. 2.1.13). Nous relevons la conductivité des solutions au cours de leur congélation et de leur décongélation, en fonction de la température. Les valeurs de résistance sont données par l'inverse de la conductivité.

Nous avons d'abord effectué des mesures pour différentes solutions représentant les phases d'hydratation possible des liposomes :

1. Solution standard NaCl 1 % (TE attendu =21,6°C)
2. Solution tampon phosphate isotonique
3. Solution tampon phosphate isotonique + 5 % de tréhalose
4. Solution tampon phosphate isotonique + 10 % de tréhalose
5. Solution tampon phosphate isotonique + 5 % de saccharose
6. Solution tampon phosphate isotonique + 10 % de saccharose

Vingt ml de la solution à étudier sont déposés dans un flacon de lyophilisation. La sonde de conductivité et la sonde de température sont plongées dans le tube. Le tout est placé dans le bain de congélation du lyophilisateur GT3. Pour la décongélation, le tube est exposé à l'air ambiant.

Les résultats sont exprimés en portant en graphique semi-logarithmique la résistance en fonction de la température. Les **Figs. 3.66 à 3.68** montrent les courbes de congélation-décongélation obtenues pour les différentes solutions 1,2 et 3. On peut déjà signaler que les profils de l'ensemble de ces courbes sont similaires à ceux décrits dans la littérature. Ainsi, le  $T_{im}$  de l'eau pure vaut exactement 0 °C et celui du NaCl 1 %, -21,2 °C (au lieu de -24 °C attendu).

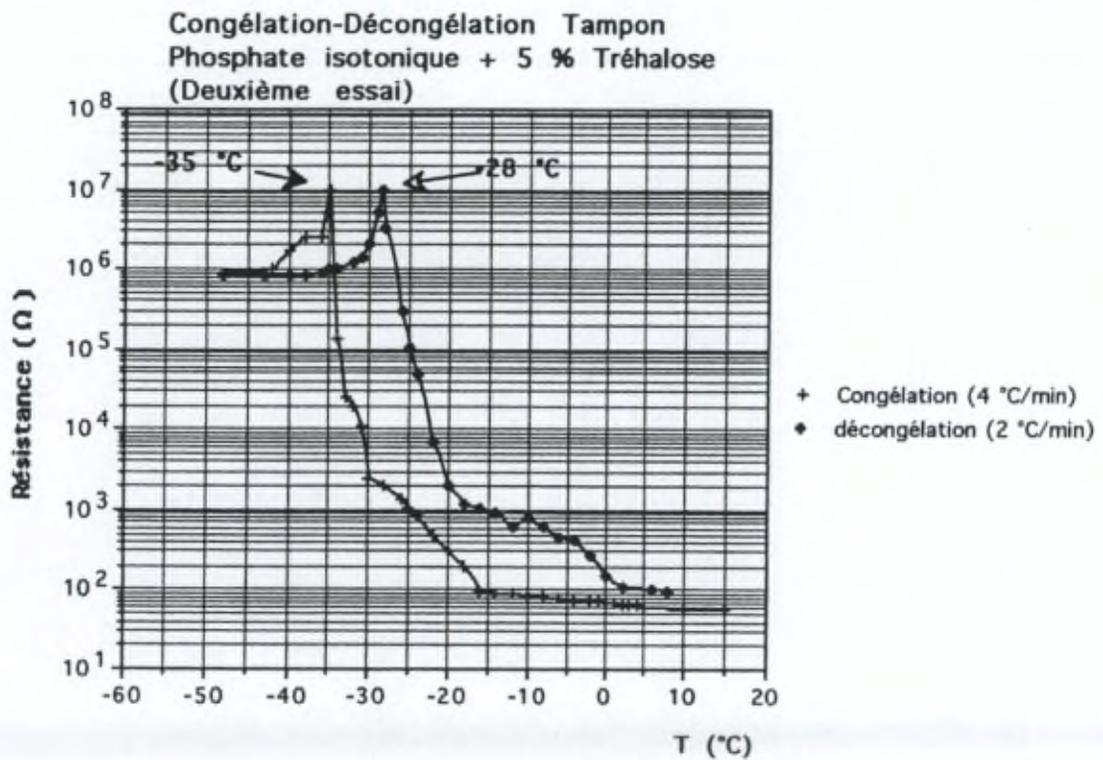
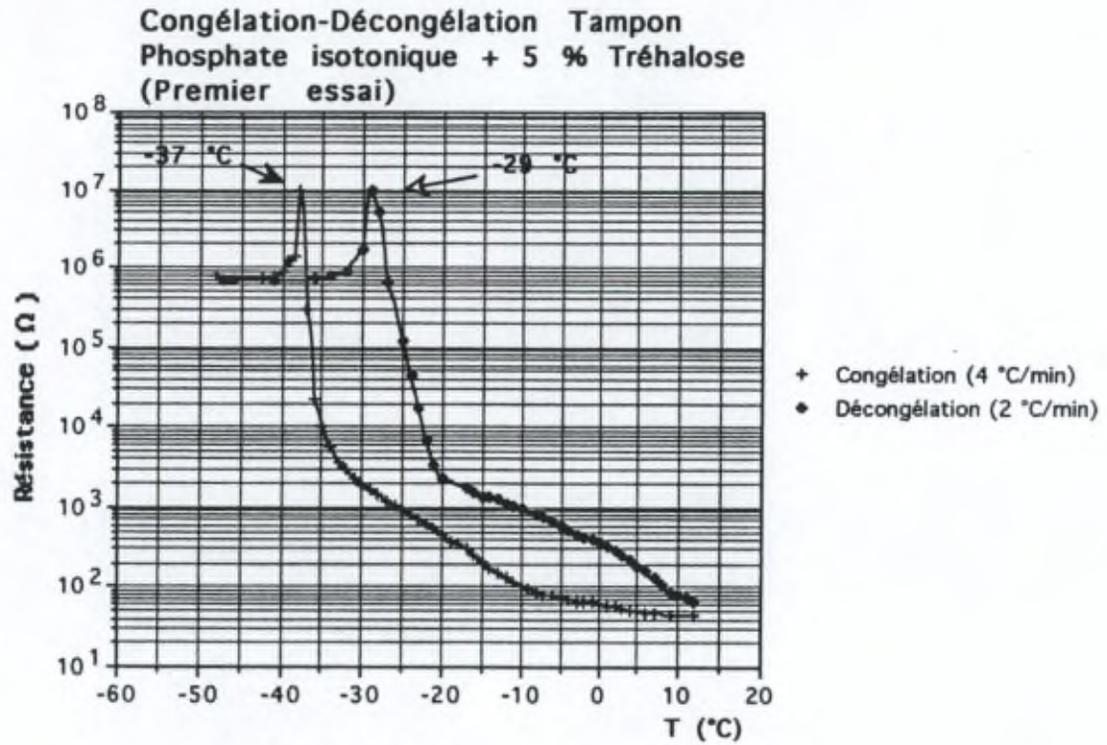
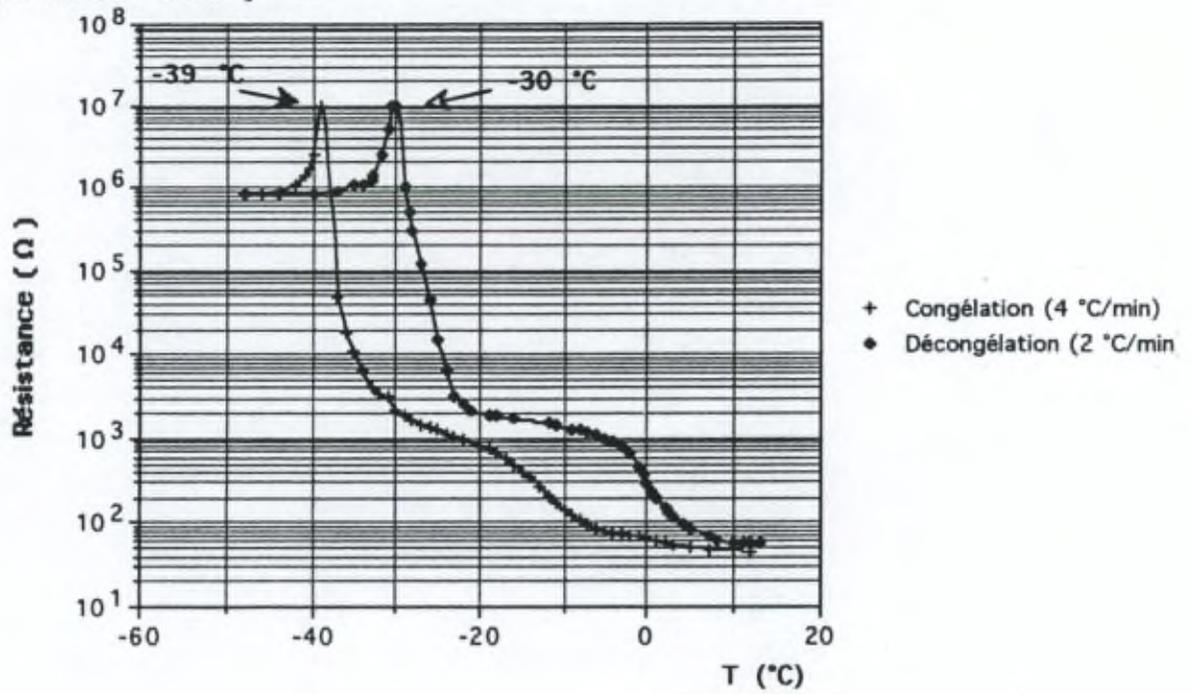


Fig 3.66 Congélation/décongélation d'une solution tampon phosphate isotonique additionnée de 5% de tréhalose.

### Congélation-Décongélation Tampon Phosphate isotonique (Premier essai)



### Congélation-décongélation Tampon phosphate isotonique (Deuxième essai)

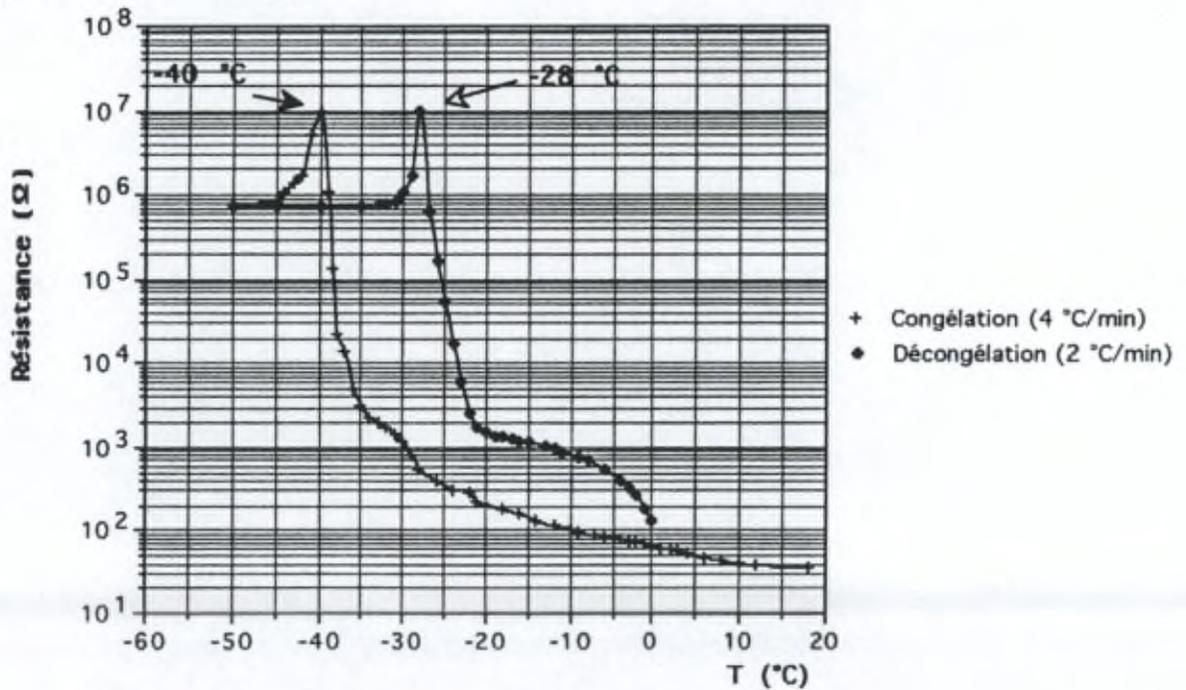


Fig 3.67 Congélation/décongélation d'une solution tampon isotonique

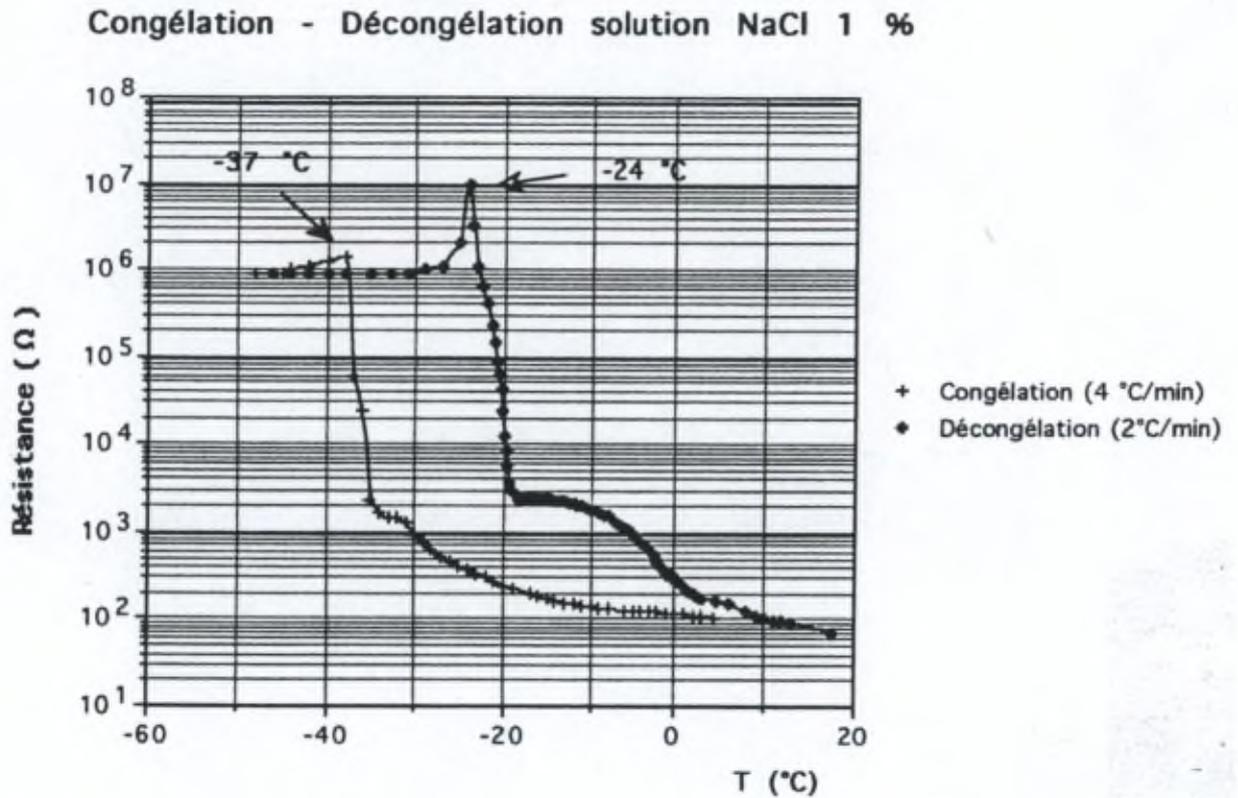


Fig.3.68 Congélation/décongélation de la solution NaCl 1%

A titre d'exemple, les courbes de conductimétrie de la solution NaCl 1 % peuvent s'analyser comme suit :

*a) courbe de congélation*

Lorsque la solution est refroidie, la résistance électrique augmente lentement : il y a formation de cristaux de glace d'eau pure. A la température de  $-35^{\circ}\text{C}$ , la résistance augmente brusquement. C'est à cette température que le premier cristal de soluté apparaît : c'est le *point eutectique*. La résistance continue à croître fortement jusqu'à la température de  $-37^{\circ}\text{C}$ , où elle vaut  $1\text{ M}\Omega$ . En fait, le conductimètre indique à ce moment une valeur de conductivité nulle car l'appareil est hors d'échelle. Nous avons considéré comme dernier point la valeur limite de l'échelle de mesure de l'appareil, qui est de  $0,1\ \mu\text{S}$ , donc de  $10\text{ M}\Omega$ . On fait l'hypothèse qu'à cette température, tout est congelé. Le  $T_{cs}$  a donc été estimé à  $-37^{\circ}\text{C}$ .

Lorsqu'on continue à refroidir, la valeur de la résistance diminue, probablement parce que le conductimètre passe à une valeur de "stand-by".

#### *b) courbe de décongélation*

Lorsque l'échantillon est ôté du bain de congélation, sa température augmente, mais la valeur de la résistance reste constante car elle est hors d'échelle. Une fois atteint  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la valeur de la résistance revient dans la zone de travail du conductimètre ; l'appareil quitte la position "stand-by" et affiche la dernière limite de son échelle qui est de  $10\text{ M}\Omega$ . A cette température, la résistance diminue fortement. Nous émettons l'hypothèse que cette température est égale au  $T_{im}$ .

L'allure des autres courbes de congélation-décongélation, obtenues avec le tampon phosphate isotonique avec ou sans disaccharides, est semblable. On peut observer que le plafond de mesure de résistance reste de  $10\text{ M}\Omega$ . Les résultats seront reproductibles à  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  près, sauf pour le tréhalose 10 % et le saccharose 5 %, ce qui empêche de tirer des conclusions valables à propos des cryoprotecteurs sur base de ces expériences. A quelques exceptions près, les  $T_{cs}$  sont compris entre  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  et  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , et les  $T_{im}$  entre  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  et  $-31\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6.4 Mesure de la conductivité des dispersions liposomales**

Deux dispersions liposomales différentes sont utilisées, l'une en milieu tamponné isotonique, l'autre dans ce même milieu additionné de 10 % de tréhalose. Les conditions sont identiques à celles choisies lors de l'étude des solutions de référence : volume engagé, 20 ml ; vitesse de congélation,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ; vitesse de décongélation,  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

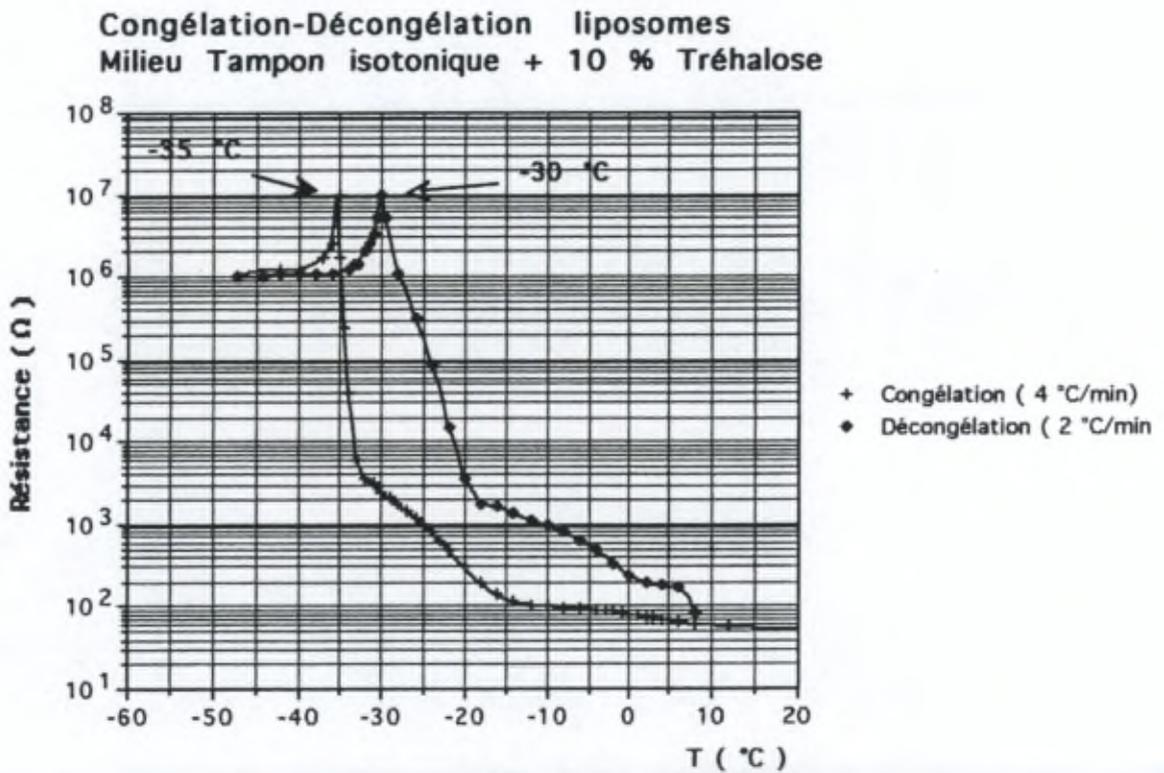
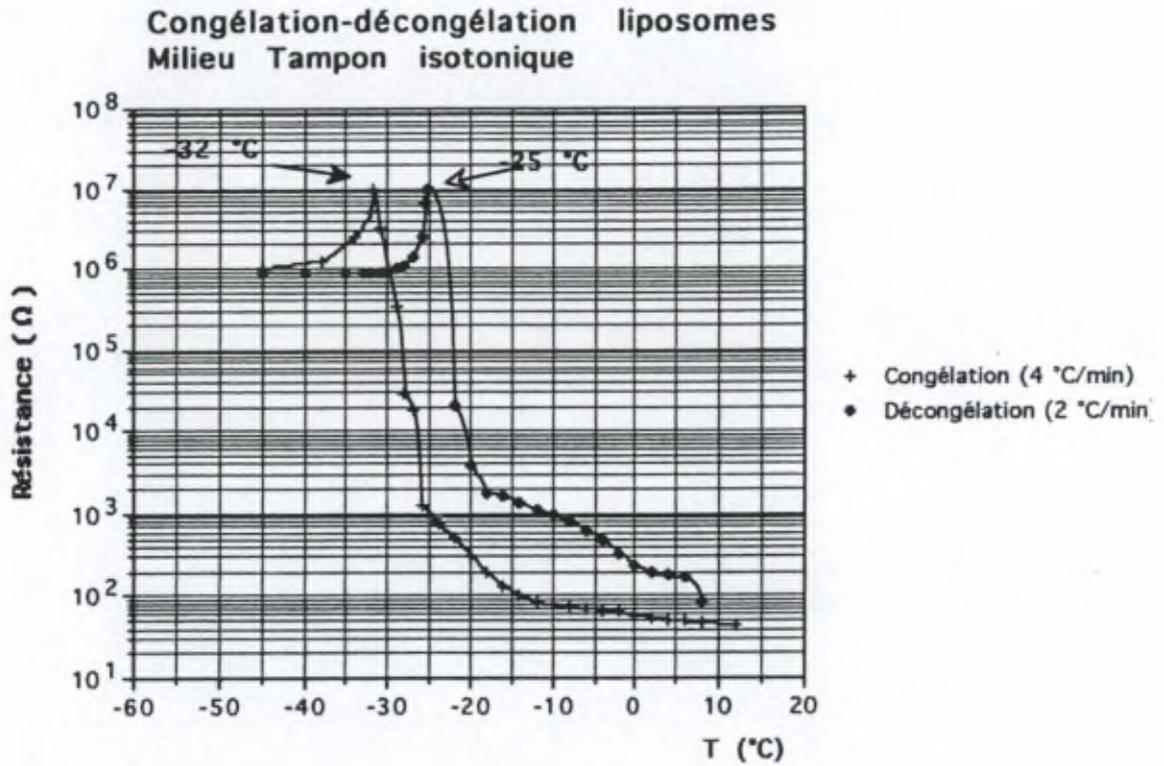


Fig. 3.69 Congélation/décongélation liposomes

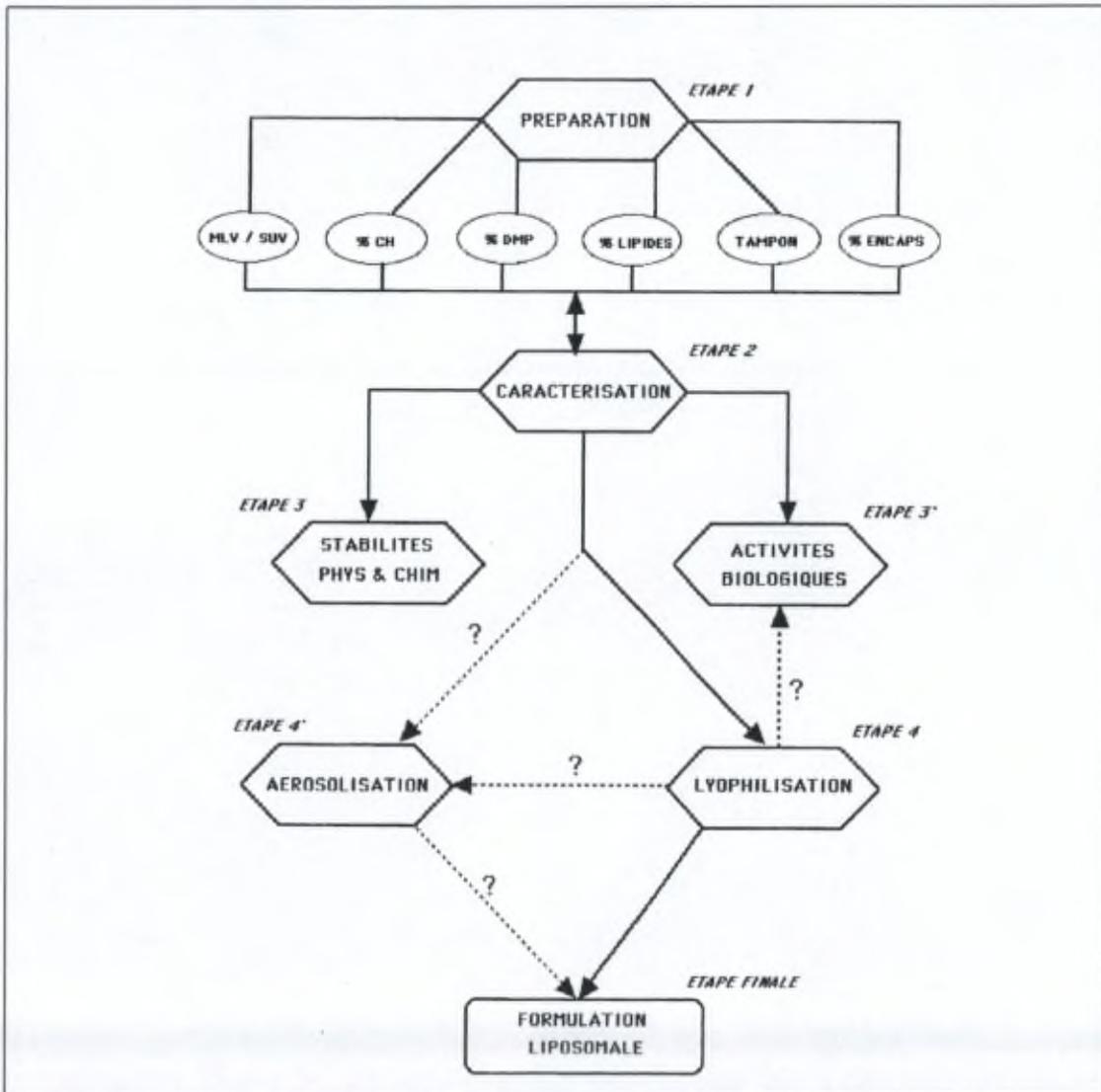


---

lyophilisation des dispersions liposomales, y compris celle qui a été développée dans ce travail et dont l'intérêt clinique reste intact.

## 4. Conclusions et perspectives

L'objectif initial de cette thèse était la préparation d'une nouvelle forme galénique à visée pulmonaire de la dexaméthasone (DXM). La DXM reste un des plus puissants corticoïdes anti-inflammatoires, mais son utilisation est limitée par des effets indésirables systémiques, et sa vectorisation est donc souhaitable. Nous avons cherché à constituer une formulation liposomale de DXM. Tout au long de ce travail, il nous a fallu franchir, une à une, les étapes qui mènent au développement d'un nouveau médicament. Ces étapes sont schématisées dans la **Fig. 4.1**.



**Fig. 4.1.** Schéma des étapes de développement du DMP liposomal qui ont été suivies dans ce travail (en traits pleins) ou qui devraient être suivies pour le compléter (en pointillés avec « ? »).

En premier lieu, les propriétés physico-chimiques de la DXM native n'ont pas permis de réaliser sa vectorisation de façon simple. La solution a été de synthétiser une prodrogue lipophile, le palmitate de dexaméthasone (DMP), et de l'incorporer dans des liposomes. Une analyse conformationnelle au moyen de programmes développés par le professeur Brasseur (U.L.B.) permet de visualiser une insertion stable, énergétiquement favorable, du DMP dans la couche lipidique membranaire. Ces analyses prédisent également une attaque aisée de la prodrogue par les estérases, avec libération de la molécule de dexaméthasone (pour autant que le DMP ne puisse pas agir lui-même sur les récepteurs corticoïdes, un point qui n'a pas été exploré dans ce travail). L'enchâssement de principes actifs dans la paroi liposomale grâce à la constitution d'une prodrogue lipophile, une idée avancée par Knight il y a près de vingt ans (Knight, 1981), est une stratégie pharmaceutique très prometteuse, à condition de se souvenir qu'il ne suffit pas de rendre le principe actif lipophile, mais qu'il faut aussi considérer les contraintes de son insertion membranaire (Gulati et al., 1998). Pour cela, l'adjonction de palmitate est une technique qui nous a semblé judicieuse. Récemment, Heiati et al. (1997 & 1998), en se référant à nos articles publiés, ont synthétisé du palmitate de 3'-azido-3'-déoxythymidine (palmitate d'AZT) pour l'incorporer dans des nanoparticules à base de lipides.

Relevons que, pendant le déroulement de notre étude, le palmitate de dexaméthasone a été commercialisé sous forme d'une émulsion pour injection intraveineuse [huile de soja 10%, phospholipides de jaune d'œuf 1,2%, DMP 0,4%, glycérol, eau], et cela, au Japon (Limethason®, Welfide Corp.) et en Allemagne (Lipotalon®, Merckle). Ce produit, proposé dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, n'est pas applicable à la voie pulmonaire.

Dans notre travail, le développement galénique de la forme liposomale de DMP a été poursuivi afin d'obtenir une forme biologiquement active. C'est une forme SUV-DMP, faite de « *small unilamellar vesicles* » avec un rapport phospholipides/cholestérol de 4:3, qui a été préférée pour des raisons d'efficacité d'incorporation et de stabilité. Ensuite, le test de transformation lymphoblastique *in vitro* nous a permis de montrer que les SUV-DMP retenaient toute l'activité pharmacologique de la DXM native, et qu'ils pouvaient même présenter des avantages en terme de présentation du principe actif aux cellules (du moins *in vitro*). L'activité biologique de ces SUV-DMP a été corroborée dans un laboratoire différent par des expériences sur des macrophages alvéolaires (Krier, 1997).

L'activité pharmacologique des SUV-DMP étant démontrée, la difficulté et le manque de reproductibilité de la production industrielle des liposomes ont dicté la suite de notre

développement. En effet, comme souligné dans l'INTRODUCTION, le frein majeur au développement pharmaceutique des formes liposomales réside dans la faiblesse des équipements de laboratoire, qui ne sont pas aisément transposables à l'échelle pilote et encore moins à l'échelle industrielle. Le Réactosome que nous avons inventé, et pour lequel un brevet a été déposé, est une réponse à cette demande académique et industrielle. Ce procédé de préparation basé sur une membrane céramique combine l'étape d'hydratation du film lipidique et la filtration/extrusion des liposomes, et il fonctionne à grande échelle. La fabrication du Réactosome automatisé et adapté aux normes CE est actuellement envisagée par une société qui fabrique des équipements industriels pour l'industrie pharmaceutique.

Finalement, la conservation et la stabilité physique des liposomes doivent être envisagées de préférence sous forme de lyophilisat. Des expériences préliminaires ont été réalisées en ce sens, notamment en tenant compte de l'utilisation de cryoprotecteurs. Nous pensons que le suivi des différentes étapes de la lyophilisation à l'aide du « Moniteur Eutectique » devrait permettre une compréhension et un contrôle des phénomènes de congélation et de sublimation de la forme liposomale nécessaires à la reproductibilité du procédé. La recherche menée dans ce domaine montre qu'une fois de plus, la formulation et le procédé sont imbriqués pour l'obtention de la forme finale.

La technique d'aérosolisation n'a pas été étudiée dans le cadre actuel.

A l'issue de ce travail, nous pouvons conclure que des SUV-DMP biologiquement actifs ont été produits à l'échelle laboratoire et pilote. Cette activité devrait être confirmée sur un modèle animal avant d'entamer les études cliniques. De plus, le développement et la validation d'une méthode HPLC de dosage de la DMP devraient être envisagés, afin de garantir les contrôles de qualité et la stabilité de ce médicament selon les procédures BPF.

## 5. Bibliographie

- 1 **Aarts PA, Gijeman OL, Kremer JM, Wiersema PH.** (1977) Dynamics of phospholipid aggregation in ethanol-water solutions. *Chem Phys Lipids*. 19:267-274.
- 2 **Adcock IM.** (2001) Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther*. 14:211-219.
- 3 **Aileen P, Bruford-Mason G, Gyte ML.** (1979) An alternative method of expressing results of lymphocyte transformation experiments. *J Immunol Methods*. 28:391-394.
- 4 **Albertini G, Rustichelli F.** (1993) Effects of gamma irradiation on liposomal structure. *In* : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 399-428.
- 5 **Alderson JCE, Green C.** (1975) Enrichment of lymphocytes with cholesterol and its effect on lymphocyte activation. *FEBS Lett*. 52:208-211.
- 6 **Alino SF, Garcia Sanz M, Irruarrizaga A, Alfo J, Hernandez J.** (1990) High encapsulation efficiencies in sized liposomes produced by extrusion of dehydration-rehydration vesicles. *J Microencapsul*. 7:497-503.
- 7 **Allen TM.** (1984) Removal of detergents and solvent traces from liposomes. *In* : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 109-122.
- 8 **Allen TM.** (1994) Long-circulating (sterically stabilized) liposome for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol Sci*. 15:215-220.
- 9 **Allen TM, Hansen C.** (1991) Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta*. 1068:133-141.
- 10 **Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A.** (1991) Liposomes containing synthetic lipid derivatives of polyethylene glycol show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 1066:29-39.
- 11 **Alving CR, Steck EA, Chapman WL, Waits VB, Hendricks LD, Swartz EM, Hanson WL.** (1978) Therapy of leishmaniasis : superior efficacies of liposome-incorporated drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75:2959-2963.
- 12 **Amselem S, Gabizon A, Barenholz Y.** (1993) A large-scale method for the preparation of sterile and non-pyrogenic liposomal formulations of defined size distributions for clinical use. *In* : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 399-428.
- 13 **Anel R, Naval J, Gonzalez B, Torres JM, Mishal Z, Uriel J, Pineiro A.** (1990) Fatty acid metabolism in human lymphocytes. I. Time-course of changes in fatty acid composition and membrane fluidity during blastic transformation of peripheral blood lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1044:323-331.

- 14 **Arrowsmith M, Hadgraft J, Kellaway IW.** (1983) Thermodynamics of steroid partitioning in dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 750:149-156.
- 15 **Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M.** (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science.* 270:286-290.
- 16 **Axelsson BI, Brattsand RL, Dahlback CMO, Kallstrom LA, Trofast JW.** (1987) Liposomes containing steroid esters. *US Patent # 4,693,999.*
- 17 **Bachmann D, Brandi M, Gregoriadis G.** (1993) Preparation of liposomes using a mini-lab 8.30H high-pressure homogenizer. *Int J Pharm.* 91:69-74.
- 18 **Baillie AJ, Florence AT, Hume LR, Muirhead GT, Rogerson A.** (1985) The preparation and properties of niosomes--non-ionic surfactant vesicles. *J Pharm Pharmacol.* 372:863-868
- 19 **Bangham AD, Standish MM, Watkins JC.** (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 13:238-252.
- 20 **Barenholz Y.** (1992) Liposome production : historic aspects. *In : Liposome Dermatics,* Brown-Falco O, Korting HC, Maibach HI, Eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 69-81.
- 21 **Barenholz Y.** (2002) Cholesterol and other membrane active sterols : from membrane evolution to "rafts". *Progress Lipid Res.* 41:1-5.
- 22 **Barenholz Y, Amselem S.** (1993) Quality control assays in the development and clinical use of liposome-based formulations. *In : Liposome Technology,* Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 527-616.
- 23 **Barenholz Y, Crommelin DJA.** (1994) Liposomes; *In : Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* Swarrbick J, Boylan JC, Eds. Marcel Dekker, New York. pp. 1-39.
- 24 **Barnes PJ.** (1995) Inhaled glucocorticoids for asthma. *N Engl J Med.* 332:868-875.
- 25 **Barnes PJ.** (1998) Antiinflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clin Sci.* 94:557-572.
- 26 **Barnes PJ, Adcock I.** (1993) Anti-inflammatory actions of steroids : molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 14:436-441.
- 27 **Bartlett GR.** (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem.* 254:466-468.
- 28 **Basworth ME, Hunt CA.** (1982) Liposome disposition in vivo. II. Dose dependency. *J Pharm Sci.* 71:100-104.
- 29 **Batzri S, Korn ED.** (1973) Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim Biophys Acta.* 298:1015-1019.
- 30 **Beato M.** (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56:335-344.

- 31 **Beaulac C, Clement-Major S, Hawari J, Lagace J.** (1996) Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 40:665-669.
- 32 **Beaulac C, Sachtelli S, Lagace J.** (1999) Aerosolization of low phase transition temperature liposomal tobramycin as a dry powder in an animal model of chronic pulmonary infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Drug Target.* 7:33-41.
- 33 **Belvisi MG, Brown TJ, Wicks S, Foster ML.** (2001) New glucocorticoids with an improved therapeutic ratio ? *Pulm Pharmacol Ther.* 14:221-227.
- 34 **Benameur H, De Gand G, Brasseur R, Van Vooren JP, Legros FJ.** (1993) Liposome-incorporated dexamethasone palmitate : chemical and physical properties. *Int J Pharm.* 89:157-167.
- 35 **Benameur H, Latour N, Schandene L, Van Vooren JP, Flamion B, Legros FJ.** (1995) Liposome-incorporated dexamethasone palmitate inhibits in vitro lymphocyte response to mitogen. *J Pharm Pharmacol.* 47:812-817.
- 36 **Benameur H, Moës A.** (2001) Liposomes preparation method and plant. *US Patent # 6,217,899.*
- 37 **Betageri GV, Parsons DL.** (1993) Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. *Int J Pharm.* 81:235-241.
- 38 **Bickermann HA, Itkin SE.** (1963) Aerosol steroid therapy and chronic bronchial asthma. *JAMA.* 184:533-538.
- 39 **Biola A, Pallardy M.** (2000) Mode d'action des glucocorticoïdes. *Presse Med.* 29:215-223.
- 40 **Bonanomi MH, Vervart M, Stimpel M, Roos KM, Fehr K, Weder HG.** (1987) Studies of pharmacokinetics and therapeutic effects of glucocorticoids entrapped in liposomes after intraarticular application in healthy rabbits and in rabbits with antigen-induced arthritis. *Rheumatol Int.* 7:203-212.
- 41 **Boyum A.** (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Invest.* 21(Suppl. 97):77-89.
- 42 **Bracken KR.** (1991) Film-forming evaporation apparatus. *US Patent # 5,028,297.*
- 43 **Brandl M, Bachmann D, Drechsler M, Bauer KH.** (1990) Liposome preparation by a new high pressure homogenizer Gaulin Micron Lab 40. *Drug Devel Industr Pharm.* 16: 2167-2191.
- 44 **Brasseur R.** (1991) Differentiation of lipid-associating helix by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations. *J Biol Chem.* 266:16120-16127.
- 45 **Brasseur R, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM.** (1981) Theoretical conformational analysis of phospholipid bilayers. *Biochem Biophys Res Commun.* 103:301-310.

- 46 **Brattstand R, Thalen A, Röpke K, Kallström L, Gruvstad E.** (1982) Development of new glucocorticoids with a very high ratio between topical and systemic activities. *Eur J Respir Dis.* 63(Suppl.122):62-73.
- 47 **Braun CM, Huang SK, Bashian GG, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Essayan DM.** (1997) Corticosteroid modulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses. *J Allergy Clin Immunol.* 100:400-407.
- 48 **Bridges PA, Taylor KM.** (2001) The effects of freeze-drying on the stability of liposomes to jet nebulization. *J Pharm Pharmacol.* 53:393-398.
- 49 **British Thoracic Society.** (1997) The British guidelines on asthma management : 1995 review and position statement. *Thorax.* 52:S1-S24.
- 50 **Brown-Falco O, Korting HC, Maibach HI.** (1992) *Liposome Dermatics.* Springer-Verlag, Berlin.
- 51 **Brunner DE.** (1989) Liposomal encapsulation : making old and new drugs do new tricks. *J Natl Cancer Inst.* 81:436-438.
- 52 **Brunner J, Skrabal P, Hauser H.** (1976) Simple bilayer vesicles prepared without sonication : physico-chemical properties. *Biochim Biophys Acta.* 455:322-331.
- 53 **Canonico AE, Conary JT, Meyrick BO, Brigham KL.** (1994) Aerosol and intravenous transfection of human  $\alpha_1$ -antitrypsin gene to lungs of rabbits. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 10:24-29.
- 54 **Carlstedt-Duke J.** (1999) Glucocorticoid Receptor beta: View II. *Trends Endocrinol Metab.* 10:339-342.
- 55 **Chanez P, Vachier I, Michel FB, Bousquet J, Godard P.** (2000) Corticothérapie de l'asthme. *Presse Med.* 29:1469-1478.
- 56 **Chapman D.** (1975) Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and membranes. *Quart Rev Biophys.* 8:185-235.
- 57 **Chek WA, Kaliner MA.** (1990) Pharmacology and pharmacokinetics of topical corticosteroid derivatives used for asthma therapy. *Am Rev Respir Dis.* 141:S44-S51.
- 58 **Chen CM, Alli D.** (1987) Use of fluidized bed in proliposome manufacturing. *J Pharm Sci.* 76:419-22.
- 59 **Chen SSH, Keenan RM.** (1977) Effet of phosphatidylcholine liposomes on the mitogen-stimulated lymphocyte activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 79:852-858.
- 60 **Cippitelli M, Sica A, Viggiano V, Ye J, Ghosh P, Birrer MJ, Young HA.** (1995) Negative transcriptional regulation of the interferon-gamma promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun. *J Biol Chem.* 270:12548-12556.
- 61 **Cleland LG, Vermont RB, Garrett R, Allen TM.** (1982) Cortisol palmitate liposomes : enhanced antiinflammatory effect in rats compared with free cortisol. *Agents Action.* 12:348-352.

- 62 **Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A.** (1993) Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*. 261:472-475.
- 63 **Committee on Safety of Medicines.** (1998) Focus on corticosteroids. *Curr Probl Pharmacovigil*. 24 :5-10.
- 64 **Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ, Kay AB.** (1991) Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood T lymphocyte activation and comparison of the T lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin A. *Am Rev Respir Dis*. 144:1026-1032.
- 65 **Couvreur P, Malvy C, Dubernet C, Fattal E.** (2000) Liposomes for the delivery of oligonucleotides. In: *Pharmaceutical Aspects of Oligonucleotides*. Couvreur P, Malvy C, Eds. Taylor & Francis, UK. Pp. 146-171.
- 66 **Crosasso P, Brusa P, Dosio F, Arpicco S, Pacchioni D, Schuber F, Cattel L.** (1997) Antitumoral activity of liposomes and immunoliposomes containing 5-fluorouridine prodrugs. *J Pharm Sci*. 86:832-839.
- 67 **Crowe JH, Crowe LM.** (1988) Factors affecting the stability of dry liposomes. *Biochim Biophys Acta*. 939:327-334.
- 68 **Crowe JH, Crowe LM.** (1993) Preservation of liposomes by freeze-drying. In : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 229-252.
- 69 **Crowe LM, Crowe JH, Rudolph A, Womersley C, Appel L.** (1985) Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. *Arch Biochem Biophys*. 242:240-247.
- 70 **Crowe LM, Womersley C, Crowe JH, Reid D, Appel L, Rudolph A.** (1986) Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates. *Biochim Biophys Acta*. 861:131-140.
- 71 **Cullis PR, de Kruijff B.** (1979) Lipid polymorphism and the functional role of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta*. 559:399-420.
- 72 **Cullis PR, Hope MJ, Bally MB, Madden TD, Mayer LD.** (1987) Liposomes as pharmaceuticals. In: *Liposomes. From Biophysics to Therapeutics*. Ostro MJ, Ed. Marcel Dekker, New York. pp. 39-72.
- 73 **Cullis PR, Hope MJ, Bally MB, Madden TD, Mayer LD, Fenske DB.** (1997) Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1331:187-211.
- 74 **Cullis PR, Mayer LD, Bally MB, Madden TD, Hope MJ.** (1989) Generating and loading of liposomal systems for drug-delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 3 :267-282.
- 75 **Cupps TR, Fauci AS.** (1982) Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol Rev*. 65:133-155.
- 76 **Darwis Y, Kellaway IW.** (2001) Nebulisation of rehydrated freeze-dried beclomethasone dipropionate liposomes. *Int J Pharm*. 215:113-121.

- 77 **Deamer D, Bangham AD.** (1976) Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta.* 443 :629-634.
- 78 **De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G.** (2000) Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids : negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J Neuroimmunol.* 109:16-22.
- 79 **Debs RJ, Straubinger RM, Brunette EM, Lin JM, Lin EJ, Montgomery AB, Friend DS, Papahadjopoulos D.** (1987) Selective enhancement of pentamidine uptake in the lung by aerosolization and delivery in liposomes. *Am Rev Respir Dis.* 135 :731-737.
- 80 **Defrise-Quertain F, Chatelain P, Delmelle M, Ruyschaert J.** (1984) Model studies for drug entrapment and liposome stability. *In: Liposome Technology (vol. 2) : Incorporation of Drugs, Proteins, and Genetic Material.* Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 183-204.
- 81 **Delattre J.** (1993) Liposomes et barrières endothéliales. *In : Les Liposomes. Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques.* Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R, Schuber F, Eds. Tec & Doc – Lavoisier, Paris. pp. 167-178.
- 82 **Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R, Schuber F.** (1993) *Les Liposomes. Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques.* Tec & Doc – Lavoisier, Paris.
- 83 **Desai TR, Finlay WH.** (2002) Nebulization of niosomal all-trans-retinoic acid : an inexpensive alternative to conventional liposomes. *Int J Pharm.* 241:311-317.
- 84 **de Silva M, Hozleman BL, Thomas DP, Wraight P.** (1979) Liposomes in arthritis : a new approach. *Lancet.* 8130:1320-1322.
- 85 **Devissaguet JP, Puisieux F.** (1993) Pharmacocinétique et potentialités thérapeutiques des liposomes. *In : Les Liposomes. Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques.* Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R, Schuber F, Eds. Tec & Doc – Lavoisier, Paris. pp. 223-245.
- 86 **DiMatteo M, Reasor MJ.** (1997) Modulation of silica-induced pulmonary toxicity by dexamethasone-containing liposomes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 142:411-421.
- 87 **Dingle JT, Gordon JL, Hozleman BL, Knight CG, Page E, Thomas DPP, Phillips NC, Shaw IH, Fildes FJT, Oliver JE, Jones G, Turner CH, Lowe JS.** (1978) Novel treatment for joint inflammation. *Nature.* 271:372-373.
- 88 **Douset N, Douste-Blazy L.** (1985) Méthodes de préparations des liposomes. *In : Les Liposomes. Applications Thérapeutiques.* Puisieux F, Delattre J, Eds. Tec & Doc – Lavoisier, Paris. pp. 31-72.
- 89 **Drummond DC, Zignani M, Leroux J.** (2000) Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog Lipid Res.* 39:409-460.
- 90 **Edwards DA, Langer RS, Vanbever R, Mintzes J, Wang J, Chen D.** (1999) Preparation of particles for inhalation. *US Patent # 5,985,309.*

- 91 **Egbaria K, Ramachandran C, Weiner N.** (1990) Liposomes as topical drug delivery system. *Adv Drug Deliv Res.* 5:287-300.
- 92 **Enoch HG, Strittmatter P.** (1979) Formation and properties of 1000-Å-diameter, single-bilayer phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:145-149.
- 93 **Farge E, Devaux PF.** (1992) Shape changes of giant liposomes induced by asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys J.* 61 :347-357.
- 94 **Farr SJ, Kellaway IW, Carman-Meakin B.** (1987) Assessing the potential of aerosol generated liposomes from pressurized pack formulations. *J Control Release.* 5 :119-131.
- 95 **Fattal E, Couvreur P, Puisieux P.** (1993). Méthodes de préparation des liposomes. In : *Les Liposomes. Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques.* Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R, Schuber F, Eds. Tec & Doc – Lavoisier, Paris. pp. 43-62.
- 96 **Fauci AS, Dale DC.** (1975) The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood.* 46:235-243.
- 97 **Faucon JP, Méléard P.** (1993) Polymorphisme des lipides : contraintes stériques et élastiques. In : *Les Liposomes. Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques.* Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R, Schuber F, Eds. Tec & Doc – Lavoisier, Paris. pp. 7-42.
- 98 **Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M.** (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:7413-7417.
- 99 **Fidler IJ, Raz A, Fogler WE, Kirsh R, Bugelski K, Poste G.** (1989) Design of liposomes to improve delivery of macrophage-augmenting agents to alveolar macrophages. *Cancer Res.* 49:3976-3984.
- 100 **Fielding RM.** (1989) The use of inhaled liposome formulations for drug delivery to the lungs and systemic circulation. *Proc West Pharmacol Soc.* 32:103-106.
- 101 **Fildes FJT, Oliver JE.** (1978) Interaction of cortisol-21-palmitate with liposomes examined by differential scanning calorimetry. *J Pharm Pharmacol.* 30:337-342.
- 102 **Flower RJ, Rothwell NJ.** (1994) Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol Sci.* 15:71-76.
- 103 **Ford JL, Timmins P.** (1989) *Pharmaceutical Thermal Analysis : Techniques and Applications.* E. Horwood Ltd, Chichester, UK.
- 104 **Forsgren P, Modig J, Gerdin B, Axelsson B, Dahlback M.** (1990) Intrapulmonary deposition of aerosolized Evans blue dye and liposomes in an experimental porcine model of early ARDS. *Ups J Med Sci.* 95:117-136.
- 105 **Forssen EA, Tokes ZA.** (1981) Use of anionic liposomes for the reduction of chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:1873-1877.
- 106 **Foucard T.** (1996) Aggressive treatment of childhood asthma with local steroids. Good or bad ? *Allergy.* 51:367-371.

- 107 **Fransen GJ, Salemink PJM, Crommelin DJA.** (1986) Critical parameters in freezing of liposomes. *Int J Pharm.* 33:27-35.
- 108 **Freedman LP, Luisi BF, Korszun ZR, Basavappa R, Sigler PB, Yamamoto KR.** (1988) The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature.* 334:543-546.
- 109 **Friedman M, Byers SO, Rosenman RH.** (1957) Resolution of aortic atherosclerotic infiltration in the rabbit by phosphatide infusion. *Proc Soc Exp Biol Med.* 95:586-588.
- 110 **Fry DW, White JC, Goldman ID.** (1978) Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. *Anal Biochem.* 90:809-815.
- 111 **Garbe E, LeLorier J, Boivin JF, Suissa S.** (1997) Risk of ocular hypertension or open-angle glaucoma in elderly patients on oral glucocorticoids. *Lancet.* 350:979-982.
- 112 **Georgitis JW.** (1999) The 1997 Asthma Management Guidelines and therapeutic issues relating to the treatment of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute. *Chest.* 115:210-217.
- 113 **Gilbert BE.** (1996) Liposomal aerosols in the management of pulmonary infections. *J Aerosol Med.* 9:111-122.
- 114 **Gilbert BE, Knight C, Alvarez FG, Waldrep JC, Rodarte JR, Knight V, Eschenbacher WL.** (1997) Tolerance of volunteers to cyclosporine A-dilauroylphosphatidylcholine liposome aerosol. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:1789-1793.
- 115 **Gilbert BE, Wilson SZ, Garcon NM, Wyde PR, Knight V.** (1993) Characterization and administration of cyclosporine A liposomes as a small-particle aerosol. *Transplant.* 56:974-977.
- 116 **Gilbert BE, Wyde PR, Wilson SZ.** (1992) Aerosolized liposomal amphotericin B for treatment of pulmonary and systemic *Cryptococcus neoformans* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 36:1466-1471.
- 117 **Gold R, Buttgerit F, Toyka KV.** (2001) Mechanism of action of glucocorticoid hormones : possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol.* 117:1-8.
- 118 **Goldbach P, Dumont S, Kessler R, Poindron P, Stamm A.** (1996) In situ activation of mouse alveolar macrophages by aerosolized liposomal IFN- $\alpha$  and muramyl tripeptide. *Am J Physiol.* 270:L429-L434.
- 119 **Gonda I.** (1990) Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 6:273-313.
- 120 **Gonzalez-Rothi RJ, Straub L, Cacace JL, Schreier H.** (1991) Liposomes and pulmonary alveolar macrophages : functional and morphologic interactions. *Exp Lung Res.* 17:687-705.

- 121 **Gonzalez-Rothi RJ, Suarez S, Hochhaus G, Schreier H, Lukyanov A, Derendorf H, Costa TD.** (1996) Pulmonary targeting of liposomal triamcinolone acetonide phosphate. *Pharm Res.* 13:1699-1703.
- 122 **Gould-Forgerite S, Mannino RJ.** (1993) Preparation of large unilamellar liposomes with high entrapment yield by rotary dialysis or agarose plug diffusion. *In* : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 67-81.
- 123 **Goundalkar A, Mezei M.** (1984) Chemical modification of triamcinolone acetonide to improve liposomal encapsulation. *J Pharm Sci.* 73:834-835.
- 124 **Gregoriadis G.** (1984) *Liposome Technology (vol. 2) : Incorporation of Drugs, Proteins, and Genetic Material.* CRC Press, Boca Raton.
- 125 **Gregoriadis G.** (1984) *Liposome Technology (vol. 3) : Targeted Drug Delivery and Biological Interaction.* CRC Press, Boca Raton.
- 126 **Gregoriadis G.** (1988) *Liposomes as Drug Carriers.* John Wiley & Sons, London.
- 127 **Gregoriadis G.** (1992) Liposomes in drug delivery : present and future. *In* : *Liposome Dermatics*, Brown-Falco O, Korting HC, Maibach HI, Eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 346-352.
- 128 **Gregoriadis G.** (1995) Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol.* 13:527-537.
- 129 **Gregoriadis G, da Silva J, Florence AT.** (1990) A procedure for the efficient entrapment of drugs in dehydration-rehydration liposomes (DRVS). *Int J Pharm.* 54:235-242.
- 130 **Gregoriadis G, Florence AT.** (1993) Efficient entrapment of solutes in microfluidized small dehydration-rehydration liposomes. *In* : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 37-48.
- 131 **Gregoriadis G, McCormack B.** (2000) *Targeting of Drugs : Strategies for Gene Constructs and Delivery.* IOS Press, Amsterdam.
- 132 **Grift M, Zuidam NJ, Crommelin DJA.** (1993) Analysis and hydrolysis kinetics of phospholipids in aqueous liposome dispersion. *In* : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 455-486.
- 133 **Gruner SM, Lenk RP, Janoff AS, Ostro MJ.** (1985) Novel multilayered lipid vesicles : comparison of physical characteristics of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles. *Biochemistry.* 24:2833-2842.
- 134 **Gulati M, Grover M, Singh S, Singh M.** (1998) Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int J Pharm.* 165:129-168.
- 135 **Haran G, Cohen R, Bar LK, Barenholz Y.** (1993) Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochim Biophys Acta.* 1151:201-215.
- 136 **Harding SM.** (1999) The dull-edged sword of inhaled corticosteroids. *Chest.* 116:854-855.

- 137 **Harrigan PR, Madden TD, Cullis PR.** (1990) Protection of liposomes during dehydration of freezing. *Chem Phys Lipids*. 52:139-149.
- 138 **Hauser H, Gains N.** (1982) Spontaneous vesiculation of phospholipids : a simple and quick method of forming unilamellar vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79:1683-1687.
- 139 **Heiati H, Tawashi R, Phillips NC.** (1998) Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization. *J Microencapsul*. 15:173-184.
- 140 **Heiati H, Tawashi R, Shivers RR, Phillips NC.** (1997) 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.
- 141 **Heilmann DH, Gambrill M, Lechner JP** (1973) The effect of hydrocortisone on the incorporation of tritiated thymidine by human blood lymphocytes cultured with phytohaemagglutinin and pokeweed mitogen. *Clin Exp Immunol*. 15:203-212.
- 142 **Hernandez J, Elstelrich J, Pouplana R.** (1987) Determination of the encapsulation efficiency in liposomes obtained by the extruder method. *J Microencapsul*. 4:315-320.
- 143 **Hernandez-Caselles T, Villalain J, Gomez-Fernandez JC.** (1990) Stability of liposomes on long term storage. *J Pharm Pharmacol*. 42:397-400.
- 144 **Higgins J, Hodges NA, Olliff CJ, Philips AJ.** (1986) Factors influencing cryoprotective activity and drug leakage from liposomes after freezing. *J Pharm Pharmacol*. 38:259-263.
- 145 **Hincha DK, Hellwege EM, Meyer AG, Crowe JH.** (2000) Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *Eur J Biochem*. 267:535-540.
- 146 **Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR.** (1985) Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim Biophys Acta*. 812:55-65.
- 147 **Hope MJ, Nayar R, Mayer LD, Cullis PR.** (1993) Reduction of liposome size and preparation of unilamellar vesicles by extrusion techniques. In : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 123-140.
- 148 **Hoshi K, Mizushima Y, Shiokawa Y, Kageyama T, Honma M, Kashiwazaki S, Shichikawa K, Tsunematsu T, Kaneko K.** (1985) Double-blind study with liposteroid in rheumatoid arthritis. *Drugs Exp Clin Res*. 11:621-626.
- 149 **Huang A, Kennel SJ, Huang L.** (1983) Interactions of immunoliposomes with target cells. *J Biol Chem*. 258:14034-14040.
- 150 **Huber PA, Gabard B.** (1997) Liposomen in der Dermokosmetik. *Hautnah Dermatol*. 3:128-131.
- 151 **Ip SHC, Abraham J, Cooper RA.** (1980) Enhancement of blastogenesis in cholesterol-enriched lymphocytes. *J Immunol*. 124:87-93.

## BIBLIOGRAPHIE

- 152 **Ishii F.** (1993) Production and size control of large unilamellar liposomes by emulsification. *In* : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 111-122.
- 153 **Ishii F, Noro S, Yato-Cho N, Tanashi-shi L.** (1986) Preparation of single bilayer liposomes by an electrocapillary emulsification method. *J Pharm Pharmacol.* 38:296-297.
- 154 **Janoff AS.** (1992) Lipids, liposomes and rational drug design. *Lab Invest.* 66:655-658.
- 155 **Janoff AS, Boni LT, Popescu MC, Minchey SR, Cullis PR, Madden TD, Taraschi T, Gruner SM, Shyansunder E, Tate MW, Mendelsohn R, Bonner D.** (1988) Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of amphotericin B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:6122-6126.
- 156 **Jizomoto H, Kanaoka E, Hirano K.** (1989) Encapsulation of drugs by lyophilized, empty dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Chem Pharm Bull.* 37:1895-1898.
- 157 **Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P.** (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell.* 62:1189-1204.
- 158 **Joshi M, Misra A.** (2001) Dry powder inhalation of liposomal ketotifen fumarate : formulation and characterization. *Int J Pharm.* 223:15-27.
- 159 **Juliano RL, Stamp D.** (1978) Pharmacokinetics of liposome-encapsulated antitumor drug. *Biochem Pharmacol.* 27:21-27.
- 160 **Jurima-Romet M, Shek PN.** (1991) Lung uptake of liposome-entrapped glutathione after intra-tracheal administration. *J Pharm Pharmacol.* 43:6-13.
- 161 **Kagawa Y, Racker E.** (1971) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J Biol Chem.* 246:5477-5487.
- 162 **Kamada AK, Szeffler SJ, Martin RJ, Boushey HA, Chinchilli VM, Drazen JM, Fish JE, Israel E, Lazarus SC, Lemanske RF.** (1996) Issues in the use of inhaled glucocorticoids. The Asthma Clinical Research Network. *Am J Respir Crit Care Med.* 153:1739-1748.
- 163 **Kashara M, Hinckle PC.** (1977) Reconstitution and purification of the d-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem.* 252:7384-7390.
- 164 **Kellaway IW, Farr SJ.** (1990) Liposomes as drug delivery systems to the lung. *Adv Drug Deliv Rev.* 5:149-161.
- 165 **Keller M.** (1999) Innovations and perspectives of metered dose inhalers in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm.* 186:81-90.
- 166 **Kelly HW.** (1998) Establishing a therapeutic index for the inhaled corticosteroids : part I. Pharmacokinetic/pharmacodynamic comparison of the inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol.* 102:S36-S51.
- 167 **Koller-Lucae SK, Suter MJ, Rentsch KM, Schott H, Schwendener RA.** (1999) Metabolism of the new liposomal anticancer drug N4-octadecyl-1-beta-D-arabino-furanosylecytosine in mice. *Drug Metab Dispos.* 27:342-350.

- 168 **Khanna C, Waldrep JC, Anderson PM, Weichelbaum RW, Hasz DE, Katsanis E, Klausnert JS.** (1997) Nebulized interleukin-2 liposomes : aerosol characteristics and biodistribution. *J Pharm Pharmacol.* 49:960-971.
- 169 **Kikuchi H, Carlsson A, Yachi K, Hirota S.** (1991a) Possibility of heat sterilization of liposomes. *Chem Pharm Bull.* 38:1018-1022.
- 170 **Kikuchi H, Yamauchi H, Hirota S.** (1991b) A spray-drying method for mass production of liposomes. *Chem Pharm Bull.* 39:1522-1527.
- 171 **Kim CS, Eldridge MA, Sackner MA.** (1987) Oropharyngeal deposition and delivery aspects of metered-dose inhaler aerosols. *Am Rev Respir Dis.* 135:157-164.
- 172 **Kirby CJ, Gregoriadis G.** (1980) The effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on the fate of their lipid components in vitro. *Life Sci.* 27:2223-2230.
- 173 **Kirby CJ, Gregoriadis G.** (1984) Dehydration-rehydration vesicles : a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology.* 1:979-984.
- 174 **Klyashchitsky BA, Owen AJ.** (1999) Nebulizer-compatible liquid formulations for aerosol pulmonary delivery of hydrophobic drugs : glucocorticoids and cyclosporine. *J Drug Target.* 7:79-99.
- 175 **Knight CG.** (1981) Hydrophobic prodrugs in liposomes. In: *Liposomes : from Physical Structure to Therapeutic Applications.* Knight CG, Ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 381-390.
- 176 **Komatsu H, Saito H, Okada S, Tanaka M, Egashira M, Handa T.** (2001) Effects of acyl chain composition of phosphatidylcholines on the stability of freeze-dried small liposomes in the presence of maltose. *Chem Phys Lipids.* 113:29-39.
- 177 **Kremer JM, Esker MW, Pathmamanoharan C, Wiersema PH.** (1977) Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry* 16:3932-3935.
- 178 **Krier M.** (1997) Effets d'une formulation liposomale de dexaméthasone sur les macrophages alvéolaires. *Mémoire de Licence en Sciences Biologiques.* Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.
- 179 **Kriftner RW.** (1992) Liposome production : the ethanol injection technique and the development of the first approved liposome dermatic. In: *Liposome Dermatics,* Brown-Falco O, Korting HC, Maibach HI, Eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 91-100.
- 180 **Krstic MD, Rogatsky I, Yamamoto KR, Garabedian MJ.** (1997) Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol.* 17:3947-3954.
- 181 **Lafleur M, Bloom M, Cullis PR.** (1990) Lipid polymorphism and hydrocarbon order. *Biochem Cell Biol.* 68:1-8.
- 182 **Lambros MP, Bourne DW, Abbas SA, Johnson DL.** (1997) Disposition of aerosolized liposomal amphotericin B. *J Pharm Sci.* 86:1066-1069.

- 183 **Lasic DD.** (1993) *Liposomes : From Physics to Applications*. Elsevier, Amsterdam.
- 184 **Lasic DD.** (1997) *Liposomes in Gene Delivery*. CRC Press, Boca Raton.
- 185 **Lasic DD.** (1998) Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* 16:307-321.
- 186 **Lasic DD, Frederik PM, Stuart MCA, Barenholz Y, McIntosh TJ.** (1992) Gelation of liposome interior. A novel method for drug encapsulation. *FEBS Lett.* 312:255-258.
- 187 **Lasic DD, Papahadjopoulos D.** (1998) *Medical Applications of Liposomes*. Elsevier, Amsterdam.
- 188 **Leach C.** (1998) Targeting inhaled steroids. *Int J Clin Pract Suppl.* 96:23-27.
- 189 **Lee AG.** (1977) Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids. *Biochim Biophys Acta.* 472 :285-344.
- 190 **Legendre JY, Szoka F.** (1993) Les liposomes pour le transfert des gènes dans les cellules de mammifères. In : *Les Liposomes. Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques*. Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R, Schuber F, Eds. Tec & Doc – Lavoisier, Paris. pp. 245-260.
- 191 **Lelkes I.** (1984) The use of French pressed vesicles for efficient incorporation of bioactive macromolecules and carriers in vitro and in vivo. In: *Liposome Technology (vol. 2) : Incorporation of Drugs, Proteins, and Genetic Material*. Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 51-65.
- 192 **Leserman L, Machy P, Leonetti P, Milhaud PG, Degols G, Lebleu B.** (1990) Targeted liposomes and intracellular delivery of macromolecules. *Prog Clin Biol Res.* 343:95-102.
- 193 **Lesieur S, Gabrielle-Madehnont C, Paternostre M, Ollivon M.** (1991) Size analysis and stability of lipid vesicles by high performance gel exclusion chromatography, turbidity and dynamic light scattering. *Anal Biochem.* 192:334-343.
- 194 **Letsou GV, Safi HJ, Reardon MJ, Ergenoglu M, Li Z, Klonaris CN, Baldwin JC, Gilbert BE, Waldrep JC.** (1999) Pharmacokinetics of liposomal aerosolized cyclosporine A for pulmonary immunosuppression. *Ann Thor Surg.* 68:2044-2048.
- 195 **Leung KKM, Bridges PA, Taylor KM.** (1996) The stability of liposomes to ultrasonic nebulisation. *Int J Pharm.* 145:95-102.
- 196 **Li B, Li S, Tan Y, Stolz DB, Watkins SC, Block LH, Huang L.** (2000) Lyophilization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *J Pharm Sci.* 89:355-364.
- 197 **Liautard JP, Philippot JR.** (1991) Encapsulation of drugs into large unilamellar liposomes prepared by an extemporaneous method. *J Microencapsul.* 8:381-389.
- 198 **Liautard JP, Philippot JR.** (1993) Présentation et analyse d'une méthode de préparation de liposomes unilamellaires pour une utilisation clinique extemporanée. In : *Les Liposomes. Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques*. Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R, Schuber F, Eds. Tec & Doc – Lavoisier, Paris. pp. 63-68.

## BIBLIOGRAPHIE

- 199 **Lichtenberg D, Barenholz Y.** (1988) Liposomes : preparation, characterization, and preservation. *Methods Biochem Anal.* 33:337-462.
- 200 **Litzinger DC, Buiting AM, van Rooijen N, Huang L.** (1994) Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 1190:99-107.
- 201 **Lopez-Berenstein G, Fidler IJ.** (1988) *Liposomes in the Therapy of Infections, Diseases and Cancer.* Alan Liss, New York.
- 202 **Maberly DJ, Gibson GJ, Butler AG.** (1973) Recovery of adrenal function after substitution of beclomethasone dipropionate for oral corticosteroids. *Br Med J.* i:788-782.
- 203 **Madden TD, Harrigan PR, Tai LCL, Bally MB, Mayer LD, Redemeier TE, Loughrey HC, Tilcock CPS, Reinish LW, Cullis PR.** (1990) The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient : a survey. *Chem Phys Lipids.* 53:37-46.
- 204 **Madden TD, Tilcock CPS, Wong KF, Cullis PR.** (1988) Spontaneous vesiculation of large multilamellar vesicles composed of saturated phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol mixtures. *Biochemistry.* 27:8724-8730.
- 205 **Mahato RI, Rolland A, Tomlinson E.** (1997) Cationic lipid-based gene delivery systems : pharmaceutical perspectives. *Pharm Res.* 14:853-859.
- 206 **Mallet JP, Diot P, Lemarie E.** (1997) Voie inhalée pour l'administration de médicaments à visée systémique. *Rev Mal Respir.* 14:257-267.
- 207 **Marsh D.** (1990) *CRC Handbook of Lipid Bilayers.* CRC Press, Boca Raton.
- 208 **Martin FJ.** (1989) Pharmaceutical manufacturing of liposomes. In: Tyle P, Ed. *Specialized Drug Delivery Systems,* 267-316. Marcel Dekker, New York.
- 209 **Martin FJ.** (1990) Pharmaceutical manufacturing of liposomes. *Drugs Pharm Sci.* 41:267-316.
- 210 **Martin FJ, Lasic DD.** (1995) *Stealth Liposomes.* CRC Press, Boca Raton.
- 211 **Martin FJ, Morano JK.** (1988) Liposome extrusion method. *US Patent # 4,737,323.*
- 212 **Mastrobattista E, Koning GA, Storm G.** (1999) Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 40:103-127.
- 213 **Mayer LD, Bally MB, Cullis PR.** (1986a) Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. *Biochim Biophys Acta.* 857:123-126.
- 214 **Mayer LD, Bally MB, Hope MJ, Cullis PR.** (1986b) Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chem Phys Lipids.* 40:333-345.
- 215 **Mayer L D, Hope MJ, Cullis PR.** (1986c) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta.* 858:161-168.
- 216 **Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR, Janoff AS.** (1985) Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 817:193-196.

- 217 **Mayhew E, Lazo R, Vail WJ, King J, Green AM.** (1984) Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier. *Biochim Biophys Acta.* 775:169-174.
- 218 **McCalden TA.** (1990) Particulate systems for drug delivery to the lung. *Adv Drug Deliv Rev.* 5:253-263.
- 219 **McCormack B, Gregoriadis G.** (1994) Entrapment of cyclodextrin-drug complexes into liposomes: potential advantages in drug delivery. *J Drug Target.* 2:449-454.
- 220 **McDonald RC, McDonald RI.** (1993) Applications of freezing and thawing in liposome technology. *In* : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 209-228.
- 221 **McFadden ER Jr.** (1998) Inhaled glucocorticoids and acute asthma: therapeutic breakthrough or nonspecific effect ? *Am J Respir Crit Care Med.* 157:677-678.
- 222 **McLachlan G, Ho LP, Davidson-Smith H, Samways J, Davidson H, Stevenson BJ, Carothers AD, Alton EW, Middleton PG, Smith SN, Kallmeyer G, Michaelis U, Seeber S, Naujoks K, Greening AP, Innes JA, Dorin JR, Porteous DJ.** (1996) Laboratory and clinical studies in support of cystic fibrosis gene therapy using pCMV-CFTR-DOTAP. *Gene Ther.* 3:1113-1123.
- 223 **Meunier F, Sculier JP, Coune A, Brassinne C, Heuman C, Laduron C, Collette N, Hollaert C, Bron D, Klastersky J.** (1988) Amphoterecin B encapsulated in liposomes administered to cancer patients. *Ann NY Acad Sci.* 544:598-610
- 224 **Michel FB, Chanez P.** (1996) Asthme et corticothérapie. *Presse Med.* 25 :436-437.
- 225 **Michel FB, Chanez P, Godard P, Bousquet J.** (1997) Asthme bronchique. Physiopathologie. Conception classique et nouveaux concepts. *Presse Med.* 26:621-631.
- 226 **Mihalko PJ, Schreier H, Abra RM.** (1988) Liposomes : a pulmonary perspective. *In*: *Liposomes as Drug Carriers*. Gregoriadis G, Ed. John Wiley & Sons, London. pp. 679-694.
- 227 **Milsmann MH, Schwendener RA, Weder HG.** (1978) The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis. *Biochim Biophys Acta.* 512:147-155.
- 228 **Mimms LT, Zampighi G, Nosaki Y, Tanford C, Reynolds JA.** (1981) Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochemistry.* 20:833-840.
- 229 **Mitsunobu D, Toshimasa I, Shigetoshi S, Takashi I, Masatoshi I.** (1989) Physicochemical properties of dexamethasone palmitate, a high fatty acid ester of an antiinflammatory drug: polymorphism and crystal structure. *J Pharm Sci.* 78 :417-422.
- 230 **Mizushima Y, Hamano T, Yokoyama K.** (1982) Tissue distribution and anti-inflammatory activity of corticosteroids incorporated in lipid emulsion. *Ann Rheum Dis.* 41:263-267.
- 231 **Mui BL-S, Cullis PR, Evans EA, Madden TD.** (1993) Osmotic properties of large unilamellar vesicles prepared by extrusion. *Biophys J.* 64:443-453.

- 232 **Mui BL-S, Cullis PR, Pritchard PH, Madden TD.** (1994) Influence of plasma on the osmotic sensitivity of large unilamellar vesicles prepared by extrusion. *J Biol Sci.* 269:7364-7370.
- 233 **Myers MA, Thomas DA, Straub L, Soucy DW, Niven RW, Kaltenbach M, Hood CI, Schreier H, Gonzalez-Rothi RJ.** (1993) Pulmonary effects of chronic exposure to liposome aerosols in mice. *Exp Lung Res.* 19:1-19.
- 234 **New RRC.** (1990) *Liposomes. A Practical Approach.* Oxford University Press, Oxford.
- 235 **New RRC, Chance ML, Thomas SC, Peters W.** (1978) Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. *Nature.* 272:55-57.
- 236 **Niven RW, Carvajal TM, Schreier H.** (1992) Nebulisation of liposomes. III The effect of operating conditions and local environment. *Pharm Res.* 9:515-520.
- 237 **Niven RW, Schreier H.** (1990) Nebulisation of liposomes. I. Effect of lipid composition. *Pharm Res.* 7:1127-1133.
- 238 **Niven RW, Speer M, Schreier H.** (1991) Nebulisation of liposomes. II. The effect of size and modelling of solute release profile. *Pharm Res.* 8:217-221.
- 239 **Ohga S, Nomura A, Suga N, Hikino S, Kira R, Matsuzaki A, Masuda K, Ueda K.** (1994) Liposteroid against refractory pulmonary haemorrhage in idiopathic pulmonary haemosiderosis. *Eur J Pediatr.* 153:687-690.
- 240 **Ohsawa T, Miura H, Harada K.** (1984) A novel method for preparing liposomes with a high capacity to encapsulate proteinous drugs. *Chem Pharm Bull.* 32:2442-2445.
- 241 **Ohsawa T, Miura H, Harada K.** (1985) Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposomes formed by freeze-thawing method. *Chem Pharm Bull.* 33:3945-3952.
- 242 **Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP.** (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress Lipid Res.* 41:66-97.
- 243 **Ollivon M, Walter A, Blumenthal R.** (1986) Sizing and separation of liposomes, biological vesicles and virus by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 152:262-274.
- 244 **Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail W, Papahadjopoulos D.** (1979) Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta.* 587:522-539.
- 245 **O'Riordan T, Faris M.** (1999) Inhaled antimicrobial therapy. *Respir Care Clin N Am.* 5:617-631.
- 246 **Ostro MJ.** (1987) *Liposomes : From Biophysics to Therapeutics.* Marcel Dekker, New York.
- 247 **Ostro MJ.** (1987) Liposomes. *Sc Am.* 256:102-111.
- 248 **Ostro MJ, Cullis PR.** (1989) Use of liposomes as injectable drug delivery systems. *Am J Hosp Pharm.* 46:1576-1587.

- 249 **Ozaki K, Hayashi M.** (1997) The effects of glucose oligomers (maltodextrins) on freeze-drying liposomes. *Chem Pharm Bull.* 45:165-170.
- 250 **Ozato K, Ziegler KH, Henney C.** (1978) Transfer of antigenic determinants to lymphocyte membranes after interactions with hapten-bearing liposomes. *J Immunol.* 121:1376-1382.
- 251 **Ozer Y, Talsma H, Crommelin DJA, Hincal AA.** (1988) Influence of freezing and freeze-drying on the stability of liposomes dispersed in aqueous media. *Acta Pharm Technol.* 34:129-139.
- 252 **Pajean M, Herbage D.** (1993) Effect of collagen on liposome permeability. *Int J Pharm.* 91:209-216.
- 253 **Pajean M, Huc A, Herbage D.** (1991) Stabilization of liposomes with collagen. *Int J Pharm.* 77:31-40.
- 254 **Papahadjopoulos D, Vail WJ.** (1978) Incorporation of macromolecules within large unilamellar vesicles. *Ann NY Acad Sci.* 308:259-267.
- 255 **Parfitt K.** (1999) Corticosteroids. In: *Martindale. The Complete Drug Reference.* 32<sup>nd</sup> Ed. Pharmaceutical Press, London, UK. pp. 1010-1032.
- 256 **Payne NI, Brauning I, Hynes CA.** (1986) Characterization of proliposomes. *J Pharm Sci.* 75:31-333.
- 257 **Payne NI, Timmis P, Ambrose CV, Ward MD, Ridgway F.** (1986) Proliposomes : a novel solution to an old problem. *J Pharm Sci.* 75:325-329.
- 258 **Peppel K, Vinci JM, Baglioni C.** (1991) The AU-rich sequences in the 3' untranslated region mediate the increased turnover of interferon mRNA induced by glucocorticoids. *J Exp Med.* 173:349-355.
- 259 **Perrett S, Golding M, Williams WP.** (1991) A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications : characterization of the liposomes. *J Pharm Pharmacol.* 43:154-161.
- 260 **Philippot JR, Liautard JP.** (1993) A mild method for the preparation of very large unilamellar liposomes. In : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 81-98.
- 261 **Phillips NC, Thomas DPP, Knight CG, Dingle JT.** (1979) Liposome-incorporated corticosteroids. II. Therapeutic activity in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis.* 38:553-557.
- 262 **Piazzè Garnica JJ, Pierucci F, Vozzi G, Cosmi EV, Anceschi MM.** (1994) The cholesterol-to-phospholipids ratio (C/PL) of the erythrocyte membrane in normotensive, hypertensive pregnant and in cord blood as assessed by a simple enzymatic method. *Scand J Clin Lab Invest.* 54:631-635.
- 263 **Pick U.** (1981) Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch Biochem Biophys.* 212:186-194.

- 264 **Pidgeon C.** (1993) Preparation of MLV by the REV method : vesicle structure and optimum solute entrapment. *In* : *Liposome Technology*, Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 99-110.
- 265 **Pidgeon C, McNeely S, Schmidt T, Johnson JE.** (1987) Multilayered vesicles prepared by reverse-phase evaporation : liposome structure and optimum solute entrapment. *Biochemistry*. 26:17-29.
- 266 **Pons M, Foradada M, Estelrich J.** (1993) Liposomes obtained by the ethanol injection method. *Int J Pharm*. 95:51-56.
- 267 **Puisieux F.** (1985) Les Liposomes. *In*: Buri P, Puisieux F, Doelker E, Benoît J-P, Eds. *Formes Pharmaceutiques Nouvelles*, 467-560. Tec & Doc – Lavoisier, Paris.
- 268 **Puisieux F, Poly PA.** (1985) Problèmes technologiques posés par l'utilisation de liposomes comme vecteurs de substances médicamenteuses. Encapsulation, stérilisation, conservation. *In* : *Les Liposomes. Applications Thérapeutiques*. Puisieux F, Delattre J, Eds. Tec & Doc – Lavoisier, Paris. pp. 73-113.
- 269 **Puisieux F, Roblot-Treupel L.** (1989) Vectorisation et vecteurs de médicaments. *STP Pharma*. 5:107-113.
- 270 **Purmann T, Mentrup E, Kreuter J.** (1993) Preparation of SUV-liposomes by high-pressure homogenization. *Eur J Pharm Biopharm*. 39:45-52.
- 271 **Reynier JP.** (1994) Exigences européennes et transposition d'échelle. *STP Pharma Pratiques*. 4:154-156.
- 272 **Rieger MM.** (1986) Emulsions. *In*: *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. Lachman L, Lieberman HA, Kenig L, Eds. 3<sup>rd</sup> Ed. Lea & Febiger, San Francisco. pp. 502-533.
- 273 **Ristimaki A, Narko K, Hla T.** (1996) Down-regulation of cytokine-induced cyclooxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation. *Biochem J*. 318:325-331.
- 274 **Röding J.** (1992) Properties and characterization of pre-liposome systems. *In* : *Liposome Dermatics*, Brown-Falco O, Korting HC, Maibach HI, Eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 110-117.
- 275 **Rowland TL, McHugh SM, Deighton J, Dearman RJ, Ewan PW, Kimber I.** (1998) Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacol*. 40:11-20.
- 276 **Ruiz FE, Clancy JP, Perricone MA, Bebok Z, Hong JS, Cheng SH, Meeker DP, Young KR, Schoumacher RA, Weatherly MR, Wing L, Morris JE, Sindel L, Rosenberg M, van Ginkel FW, McGhee JR, Kelly D, Lyrene RK, Sorscher EJ.** (2001) A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther*. 12:751-761.
- 277 **Saari SM, Vidgren MT, Koskinen MO, Turjanmaa VMH, Waldrep JC, Nieminen MM.** (1998) Regional lung deposition and clearance of <sup>99m</sup>Tc-labeled beclomethasone-DLPC liposomes in mild and severe asthma. *Chest*. 113:1573-1579.

## BIBLIOGRAPHIE

- 278 **Safinya CR.** (2001) Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Curr Opin Struct Biol.* 11:440-448.
- 279 **Sampedro F, Partika J, Santalo P, Molins P, Bonal J, Perez-Soler R.** (1994) Liposomes as carriers of different new lipophilic antitumor drugs : a preliminary report. *J Microencapsul.* 11:309-318.
- 280 **Schorderet M.** (2000) *Pharmacologie. Des Concepts Fondamentaux aux Applications Thérapeutiques.* Frison-Roche, Paris.
- 281 **Schreier H.** (1992) Liposomes aerosols. *J Liposome Res.* 2:145-184.
- 282 **Schreier H, Gonzalez-Rothi RJ, Stecenko AA.** (1993) Pulmonary delivery of liposomes. *J Control Release.* 24:209-223.
- 283 **Schreier H, Wobley WC, Concessio N, Hickey AJ, Niven RW.** (1994) Formulation and in vitro performance of liposome powder aerosols. *STP Pharma Sciences.* 4:38-44.
- 284 **Schubert R, Wolburg H, Schmidt K-H, Roth HJ.** (1991) Loading of preformed liposomes with high trapping efficiency by detergent-induced formation of transient membrane holes. *Chem Phys Lipids.* 58:121-129.
- 285 **Schule R, Rangarajan P, Kliwer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM.** (1990) Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell.* 62:1217-1226.
- 286 **Schürtenberger P, Hauser H.** (1984) Characterization of the size distribution of unilamellar vesicles by gel filtration, quasi-elastic light scattering and electron microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 778:470-480.
- 287 **Schwarz LA, Johnson JL, Black M, Cheng SH, Hogan ME, Waldrep JC.** (1996) Delivery of DNA-cationic liposome complexes by small-particle aerosol. *Hum Gene Ther.* 7:731-741.
- 288 **Sharma A, Sharma US.** (1997) Liposomes in drug delivery : progress and limitations. *Int J Pharm.* 154:123-140.
- 289 **Shaw IH, Knight CG, Dingle JT.** (1976) Liposomal retention of a modified anti-inflammatory steroid. *Biochem J.* 158:473-476.
- 290 **Shek PN, Suntres ZE, Brooks JI.** (1994) Liposomes in pulmonary applications : physicochemical considerations, pulmonary distribution and antioxidant delivery. *J Drug Target.* 2:431-442.
- 291 **Shew RL, Deamer DW.** (1985) A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 816:1-8.
- 292 **Shulkin PM, Seltzer SE, Davis MA, Adams DF.** (1984) Lyophilized liposomes : a new method for long-term vesicle storage. *J Microencapsul.* 1:73-80.
- 293 **Siegel SC, Heimlich EM, Richards W, Kelley VC.** (1964) Adrenal function in allergy. IV. Effects of dexamethasone aerosols in asthmatic children. *Pediatrics.* 33:245-250.

## BIBLIOGRAPHIE

- 294 **Silvius JR, Read BD, McElhaney RN.** (1979) Thermotropic phase transitions of phosphatidylcholines with odd-numbered n-acyl chains. *Biochim Biophys Acta.* 555:175-178.
- 295 **Sont JK, van Krieken JH, van Klink HC, Roldaan AC, Apap CR, Willems LN, Sterk PJ.** (1997) Enhanced expression of neutral endopeptidase (NEP) in airway epithelium in biopsies from steroid- versus nonsteroid-treated patients with atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16:549-556.
- 296 **Stewart JC.** (1980) Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal Biochem.* 104:10-14.
- 297 **Storm G, Crommelin DJA.** (1998) Liposomes : quo vadis ? *Plasma Sources Science Technology.* 1:19-31.
- 298 **Stribling R, Brunette E, Liggitt D, Gaensler K, Debs R.** (1992) Aerosol gene delivery in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:11277-11281.
- 299 **Strickland I, Kisich K, Hauk PJ, Vottero A, Chrousos GP, Klemm DJ, Leung DY.** (2001) High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J Exp Med.* 193:585-594.
- 300 **Sun WQ, Leopold AC, Crowe LM, Crowe JH.** (1996) Stability of dry liposomes in sugar glasses. *Biophys J.* 70:1769-1776.
- 301 **Suntres ZE, Shek PN.** (1998) Liposomes promote pulmonary glucocorticoid delivery. *J Drug Target.* 6:175-182.
- 302 **Suntres ZE, Shek PN.** (2000) Prophylaxis against lipopolysaccharide-induced lung injuries by liposome-entrapped dexamethasone in rats. *Biochem Pharmacol.* 59:1155-1161.
- 303 **Szoka FC, Papahadjopoulos D.** (1978) Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75:4194-4198.
- 304 **Szoka FC, Papahadjopoulos D.** (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann Rev Biophys Bioeng.* 9:467-508.
- 305 **Tabibi SE.** (1990) Production of disperse drug delivery systems. *Drugs Pharm Sci.* 41:317-331.
- 306 **Taburet AM, Schmit B.** (1994) Pharmacokinetic optimisation of asthma treatment. *Clin Pharmacokinet.* 26: 396-418.
- 307 **Talsma H, Crommelin DJA.** (1992a) Liposomes as drug delivery systems. Part I : preparation. *Pharm Technol.* 16:96-106.
- 308 **Talsma H, Crommelin DJA.** (1992b) Liposomes as drug delivery systems. Part II : characterization. *Pharm Technol.* 16:52-58.
- 309 **Talsma H, Crommelin DJA.** (1992c) Liposomes as drug delivery systems. Part III : stabilization. *Pharm Technol.* 17:48-59.

- 310 **Talsma H, Jousma H, Nicolay K, Crommelin DJA.** (1987) Multilamellar or multivesicular vesicles ? *Int J Pharm.* 37:171-173.
- 311 **Talsma H, Ozer AY, Van Bloois L, Crommelin DJA.** (1989) The size reduction of liposomes with a high pressure homogenizer (Microfluidizer™). Characterization of prepared dispersions and comparison with conventional methods. *Drug Devel Industr Pharm.* 15:197-207.
- 312 **Talsma H, van Steenberg MJ, Crommelin DJA.** (1991a) The cryopreservation of liposomes. 3. Almost complete retention of a water-soluble marker in small liposomes in a cryoprotectant-containing dispersion after a freezing/thawing cycle. *Int J Pharm.* 77:119-126.
- 313 **Talsma H, van Steenberg MJ, Crommelin DJA.** (1992) The cryopreservation of liposomes. 2. Effect of particle size on crystallization behavior and marker retention. *Cryobiology.* 29:80-86.
- 314 **Talsma H, van Steenberg MJ, Salemink PJ, Crommelin DJA.** (1991b) The cryopreservation of liposomes. 1. A differential scanning calorimetry study of the thermal behavior of a liposome dispersion containing mannitol during freezing/thawing. *Pharm Res.* 8:1021-1026.
- 315 **Taylor KM, Newton JM.** (1992) Liposomes for controlled delivery of drugs to the lung. *Thorax.* 47:257-259.
- 316 **Taylor KM, Taylor G, Kellaway IW, Stevens J.** (1989) The influence of liposomal encapsulation on sodium cromoglycate pharmacokinetics in man. *Pharm Res.* 6:633-636.
- 317 **Taylor KM, Taylor G, Kellaway IW, Stevens J.** (1990a) Drug entrapment and release from multilamellar and reverse-phase evaporation liposomes. *Int J Pharm.* 58:49-55.
- 318 **Taylor KM, Taylor G, Kellaway IW, Stevens J.** (1990b) The stability of liposomes to nebulisation. *Int J Pharm.* 58 :57-61.
- 319 **Thomas DA, Myers MA, Wichert B, Schreier H, Gonzalez-Rothi RJ.** (1991) Acute effects of liposome aerosol inhalation on pulmonary function in healthy human volunteers. *Chest.* 99:1268-1270.
- 320 **Treat J, Greenpan A, Forst D, Sanchez JA, Ferrans VJ, Potkul LA, Wooley PV, Rohman A.** (1990) Antitumor activity of liposome-encapsulated doxorubicin in advanced breast cancer : phase II study. *J Natl Cancer Instit.* 82:1706-1710.
- 321 **Tremblay GM, Therien HM, Rocheleau H, Cormier Y.** (1993) Liposomal dexamethasone effectiveness in the treatment of hypersensitivity pneumonitis in mice. *Eur J Clin Invest.* 23:656-661.
- 322 **Uchegbu IF, Vyas SP.** (1998) Non-ionic surfactant vesicles (niosomes) in drug delivery. *Int J Pharm.* 172:33-70.
- 323 **van Deenen LLM, de Gier J.** (1974) Lipids of the red cell membrane. In: *The Red Blood Cell.* Surgenor DN, Ed. Academic Press, New York. pp. 147-211.

- 324 **Vanden Berghe W, Francesconi E, De Bosscher K, Resche-Rigon M, Haegeman G.** (1999) Dissociated glucocorticoids with anti-inflammatory potential repress interleukin-6 gene expression by a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Mol Pharmacol.* 56:797-806.
- 325 **van Winden EC, Crommelin DJA.** (1999) Short-term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes. *J Control Release.* 58:69-86.
- 326 **van Winden EC, Talsma H, Crommelin DJA.** (1998) Thermal analysis of freeze-dried liposome-carbohydrate mixtures with modulated temperature differential scanning calorimetry. *J Pharm Sci.* 87:231-237.
- 327 **van Winden EC, Zhang W, Crommelin DJA.** (1997) Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration. *Pharm Res.* 14:1151-1160.
- 328 **Vayssière BM, Dupont S, Choquart A, Petit F, Garcia T, Marchandeu C, Gronemeyer H, Resche-Rigon M.** (1997) Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol Endocrinol.* 11:1245-1255.
- 329 **Vemuri S, Yu C-D, De Groot JS, Wangstatorntanakum V, Venkataram S.** (1991) Effect of sugars on freeze-thaw and lyophilization of liposomes. *Drug Devel Industr Pharm.* 17:327-348.
- 330 **Vemuri S, Yu C-D, Wangstatorntanakun V, Roodsorp N.** (1990) Large-scale production of liposomes by a Microfluidizer. *Drug Devel Industr Pharm.* 16:2243-2256.
- 331 **Vidal M.** (1993) Méthodes de caractérisation des liposomes. *In : Les Liposomes. Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques.* Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J-R, Schuber F, Eds. Tec & Doc - Lavoisier, Paris. pp. 69-86.
- 332 **Vidal M, Bienvenüe A, Sainte-Marie J, Philippot J.** (1984) The influence of the internal content of negatively charged liposomes on their interaction with high-density lipoprotein. *Eur J Biochem.* 138:399-405.
- 333 **Vidgren M, Waldrep JC, Arppe J, Black M, Rodarte JA, Cole W, Knight V.** (1995) A study of <sup>99m</sup>Tc-labelled beclomethasone dipropionate dilauroyl-phosphatidylcholine liposome aerosol in normal volunteers. *Int J Pharm.* 115:209-216.
- 334 **Vottero A, Chrousos GP.** (1999) Glucocorticoid receptor- $\alpha$  : view I. *Trends Endocrinol Metab.* 10:333-338.
- 335 **Waldrep JC, Gilbert BE, Knight CM, Black MB, Scherer PW, Knight V, Eschenbacher W.** (1997) Pulmonary delivery of beclomethasone liposome aerosol in volunteers. Tolerance and safety. *Chest.* 111:316-323.
- 336 **Waldrep JC, Keyhani K, Black M, Knight V.** (1994) Operating characteristics of 18 different continuous-flow jet nebulisers with beclomethasone dipropionate liposome aerosol. *Chest.* 105:106-110.

- 337 **Walter A, Lesieur S, Blumenthal R, Ollivon M.** (1993) Size characterization of liposomes by HPLC. In: *Liposome Technology. Vol. 1 : Liposome Preparation and Related Techniques*. Gregoriadis G, Ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 271-290.
- 338 **Weiner N, Martin F, Riaz M.** (1989) Liposomes as a drug delivery system. *Drug Devel Industr Pharm.* 15:1523-1554.
- 339 **Weinstein JN, Yoshikami S, Henkart P, Blumenthal R.** (1977) Liposome-cell interaction : transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science.* 195:489-492.
- 340 **Williams AS, Camilleri JP, Amos N, Williams BD.** (1995) Differential effects of methotrexate and liposomally conjugated methotrexate in rat adjuvant-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 102:560-565.
- 341 **Witek TJ Jr.** (2000) The fate of inhaled drugs: the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs administered by aerosol. *Respir Care.* 45:826-830.
- 342 **Woodle MC.** (1998) Controlling liposome blood clearance by surface-grafted polymers. *Adv Drug Deliv Rev.* 32:139-152.
- 343 **Worth LL, Jia SF, An T, Kleinerman ES.** (1999) ImmTher, a lipophilic disaccharide derivative of muramyl dipeptide, up-regulates specific monocyte cytokine genes and activates monocyte-mediated tumoricidal activity. *Cancer Immunol Immunother.* 48:312-320.
- 344 **Wyde PR, Six HR, Wilson SZ, Gilbert BE, Knight V.** (1988) Activity against rhinovirus, toxicity, and delivery in aerosol of enviroxime in liposomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 32:890-895.
- 345 **Yachi K, Hrashima H, Kikuchi H, Sudo R, Yamauchi H, Ebihara K, Matsuo H, Funato K, Kiwada H.** (1996) Biopharmaceutical evaluation of the liposomes prepared by rehydration of freeze\_dried empty liposomes (FDELs) with an aqueous solution of a drug. *Biopharm Drug Dispos.* 17:589-605.
- 346 **Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M.** (1990) Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell.* 62:1205-1215.
- 347 **Yatvin MB, Kreutz W, Horwitz BA, Shinitsky M.** (1980) pH-sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science.* 210:1253-1255.
- 348 **Yokoyama K, Okamoto H, Watanabe M, Suyama T, Mizushima Y.** (1985) Development of a corticosteroid incorporated in lipid microspheres (liposteroid). *Drugs Exp Clin Res.* 11:611-620.
- 349 **Yoshikawa H, Yamazaki S, Abe T, Oda Y.** (2000) Liposteroid therapy for refractory seizures in children. *J Child Neurol.* 15:702-704.
- 350 **Zeng XM, Martin GP, Marriott C.** (1995) The controlled delivery of drugs to the lung. *Int J Pharm.* 124:149-164.

BIBLIOGRAPHIE

- 351 **Zhang S, Liang X, Danielsen M.** (1996) Role of the C terminus of the glucocorticoid receptor in hormone binding and agonist/antagonist discrimination. *Mol Endocrinol.* 10:24-34.
- 352 **Zuidam NJ, Lee SS, Crommelin DJ.** (1993) Sterilization of liposomes by heat treatment. *Pharm Res.* 10:1591-1596.
- 353 **Zuidam NJ, Lee SS, Crommelin DJ.** (1995) Gamma-irradiation of non-frozen, frozen and freeze-dried liposomes. *Pharm Res.* 12:1761-1768.
- 354 **Zuidam NJ, Talsma H, Crommelin DJ.** (1996) Quality control assays of liposomal formulations. In: *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes. From Design to Microreactors.* Barenholz Y, Lasic DD, Eds. CRC Press, Boca Raton. pp. 71-80.
- 355 **Zumbühl O, Weder HD.** (1981) Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles. *Biochim Biophys Acta.* 640:252-262.

# ANNEXE I

## NETTOYAGE D'UNE MEMBRANE DE MICROFILTRATION

Le 24/09/93

### I. Principe :

Toutes les membranes de microfiltration doivent être lavées après utilisation lors d'une production, pour permettre la récupération de l'intégrité initiale de la membrane. Cette procédure est adaptable aux membranes en carbone et en polysulphone.

### II. Méthode :

#### II.1. Matériel :

- Pompe péristaltique Masterflex 7553-50 (Merck, réf. 6030750)
- Tuyauterie Pharmed de Norton (Delta Bio, réf. 0358)
- 2 bouteilles de 1 litre
- Module de microfiltration

#### Module Carbosep comprend:

- une enveloppe en inox
- une âme en inox
- deux embouts d'extrémité en inox
- deux écrous en inox
- quatre joints toriques
- trois bouchons plastiques
- une douille perméat diam 6 mm
- deux douilles rétentat diam 6 mm
- six colliers de serrage
- deux joints d'étanchéité membrane
- membrane CARBOSEP (Cutoff=0,2  $\mu$ m)
- une vanne de contre pression
- deux douilles vanne diam 8 mm

Est utilisé pour la production de liposomes bupivacaïne.

#### Module Amicon comprend:

- deux têtes de cartouche
- une cartouche de fibres en polysulfone (Cutoff=0,2  $\mu$ m)
- une vanne de contre pression
- une douille rétentat
- une douille perméat

Est utilisé pour la production de liposomes gentamicine.

#### II.2. Produits :

- Détergent basique Ultrasil 41 (Henkel, réf. P3-Ultrasil 41)
- Détergent acide Horolith 75 (Henkel, réf. P3-Horolith 75)
- Eau mQ

### II.3. Solutions :

- Préparer un litre de détergent basique à une concentration de 10 g/L et le porter à 60 °C
- Préparer un litre de détergent acide à une concentration de 3 ml/L et le porter à 60 °C
- Préparer 10 litres d'eau mQ

### II.4. Mode opératoire :

#### II.4.1. Montage :

Effectuer le montage suivant le schéma ci-après :

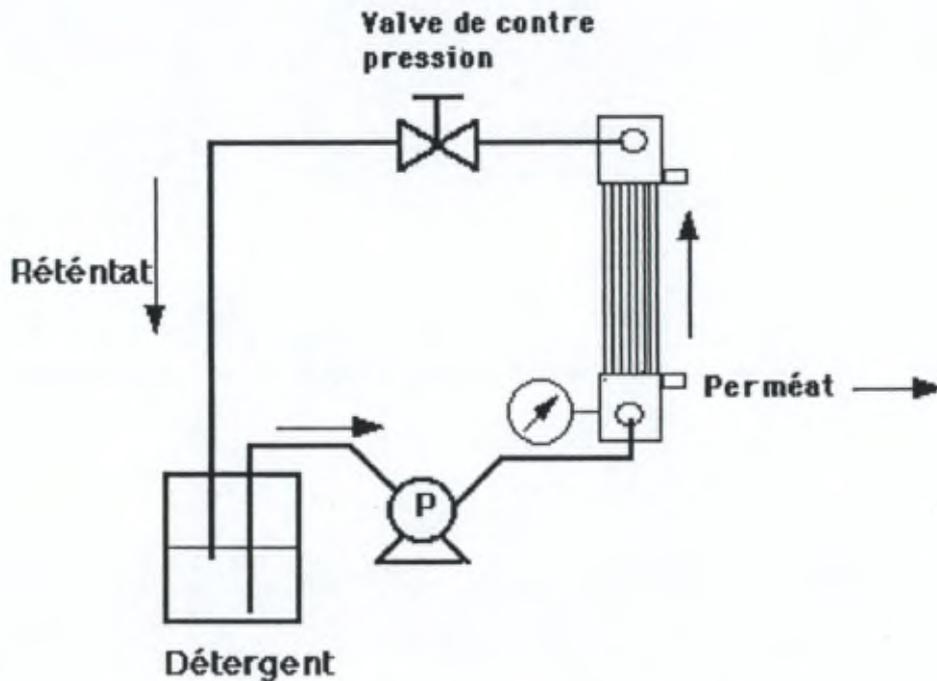


Schéma du montage en recirculation de rétentat.

#### II.4.2. Nettoyage :

- Rincer le circuit à l'eau mQ pendant 5 minutes, la vanne de contre pression étant ouverte et celle de perméat fermée,
- Fermer ensuite la vanne de contre pression progressivement afin de rincer les fibres creuses ou la membrane via les pores avec l'eau mQ jusqu'à obtention d'un perméat limpide,

**NE PAS DEPASSER UNE PRESSION DE 25 psi!!!**

- Passer ensuite le litre de détergent basique par le perméat jusqu'à épuisement de celui-ci,

- Rincer le circuit à l'eau mQ jusqu'à un perméat ayant un pH de 6,5

- Passer ensuite le litre de détergent acide par le perméat jusqu'à épuisement de celui-ci,

- Rincer le circuit à l'eau mQ jusqu'à un perméat ayant un pH de 6,5.

## Protocole processus Micro Filtration ( $\mu$ F)

Toutes les cartouches **Amicon Diaflo** sont traitées à la glycérine et/ou bactériofuge pour prévenir le séchage et la croissance microbienne.  
Avant usage, il faut la laver à l' eau distillée, ou avec un tampon fréquemment (plusieurs passages) à une pression modérée.

Récupérer la moitié du volume de départ filtré, stocker le filtrat.

Le système peut alors être consciencieusement rincé avec le volume restant (Tableau 3 donne les volumes spécifiques, pressions et fréquences.)

## Stérilisation

### A. Autoclavage

Les cartouches de fibres creuses peuvent être autoclavées, mais **Amicon ne garantit pas** l'intégrité de la fibre après autoclavage. La cartouche diminue ses performances après chaque cycle d'autoclavage.

La stérilisation à la vapeur **n'est pas recommandée.**

### B. Stérilisation chimique

Avant la stérilisation chimique la cartouche fibres creuses doit être minutieusement lavée pour éviter un dénaturation ou la présence de résidus.

Si la cartouche a déjà été utilisée il faut la nettoyer minutieusement avant stérilisation en se rapportant à la procédure de nettoyage de la section IV

1. Solution:           Formaldéhyde, 0,5%  
                          Hypochlorite de sodium, 200 ppm
  
2. Gaz:           Oxyde d'éthylène dans les conditions suivantes:  
  
          chambre T° 125° F (52°C)  
                  Pré-vacuum 27 in (700 mm Hg)  
                  Conditionnement 15 minutes de vapeur vive  
  
          Pression du gaz 8 psi (0,5 kg/cm<sup>2</sup>)  
          Temps d'exposition 5,5 heures  
          Humidité 50%  
          Post vacuum 27 in (700 mmHg)  
          Durée totale du cycle 7,25 h  
          % Oxyde d' éthylène 12  
          % Diluant

### C. Mode opératoire

#### 1. Préparation de la cartouche

Avant utilisation rincer la cartouche comme suit :

- ajouter 5-10 litres d'eau distillée dans un réservoir séparé
- démarrer la pompe et ajuster une pression modérée de 15 psi (1,0 kg/cm<sup>2</sup>)
- filtrer ± la moitié du liquide de rinçage, écarter le filtrat
- pour une suppression totale de la glycérine faire circuler deux ou trois fois de l'eau et/ou tampon et stocker la cartouche dans l'eau pendant une nuit.

## 2. Utilisation de la cartouche.

Faire les connections suivant la figure 1. en mode diafiltration.

Utiliser le système en circuit fermé

La valve de contre pression est ouverte et la pression est nulle à l'entrée de la cartouche

Maintenir ce système pendant ± 20 min. pour une bonne homogénéisation de la solution.

Passé ce délais fermer progressivement la vanne de contre pression jusqu'à l'obtention de la pression de travail de **15 psi**. (± 1 bar)

Ce qui correspond à ± 2 rpm à la pompe péristaltique.

Remarque: il est dangereux pour la viabilité des fibres creuses de dépasser **25psi** (± 2 bar).

## 3. Nettoyage de la cartouche **Amicon**

Vidanger l'appareillage et la tuyauterie via la pompe péristaltique.

Rincer le circuit avec de l'eau distillée pendant 20 min. à 150 rpm (3 sur la pompe) , la valve de contre pression étant ouverte.

Préparer une solution de 1 Litre de détergent basique Ultrasil 10 à une concentration 10 g/l et une solution de 1 Litre de détergent acide Horolith 75 à une concentration de 3ml/l.

Fermer la valve de contre pression, afin de rincer les fibres creuses via les pores avec de l'eau distillée jusqu'a l'obtention d'un perméat limpide.

Passer, ensuite le litre de détergent acide, jusqu'à épuisement de celui-ci.

Rinçer le circuit avec de l'eau distillée pendant 20 min. à 150 rpm (3 sur la pompe) jusqu'à pH 6,5 dans le perméat.

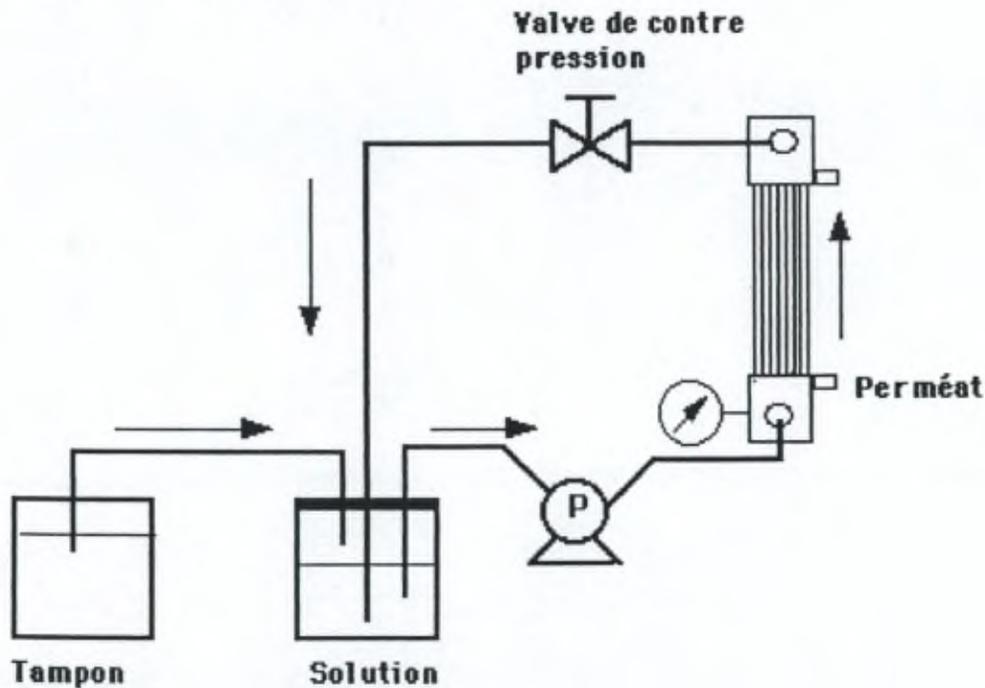
Passer, ensuite le litre de détergent basique, jusqu'à épuisement de celui-ci.

Rinçer le circuit avec de l'eau distillée pendant 20 min. à 150 rpm (3 sur la pompe) jusqu'à pH 6,5 dans le perméat.

#### 4. Stockage de la cartouche

Préparer une solution d'azide à 2% ( $\text{NaN}_3$ ) dans un matras de 200 ml.

Pour le conditionnement de la cartouche à 4°C.



#### Protocole processus Micro Filtration ( $\mu\text{F}$ )

Toutes les membranes CARBOSEP devront être manipulées avec soin : on évitera les chocs violents tels les chutes sur un support rigide (paillasse, sol...).

Par contre, cette même membrane résiste à des pressions élevées et ne craint pas les solvants (La pression d'éclatement moyenne est supérieure à 45 bars).

**Attention :** Certains produits ou réactifs de nettoyage peuvent être agressifs vis-à-vis des matières plastiques ou de l'inox constituant

l'appareil.

#### Stérilisation

##### A. Autoclavage

Le **module** peut être passé à l'**autoclave** à 126°C.

La **membrane CARBOSEP** peut être exposée à une température de 380°C. Par conséquent celle-ci sera stérilisée au préalable à la **chaleur sèche** (150°C pendant 4 h) afin d'éliminer les substances pyrogènes.

## B. Assemblage du module

Faire l'inventaire des pièces selon la liste ci-dessous.

### 1. MODULE :

- une enveloppe en inox
- une âme en inox
- deux embouts d'extrémité en inox
- deux écrous en inox
- huit joints toriques
- huit bouchons plastiques
- quatre douilles rétentat et perméat diam. 6mm
- deux manomètres
- six colliers de serrage
- deux joints d'étanchéité membrane
- membrane **CARBOSEP**
- une vanne de contre pression
- deux douilles vanne diam 8mm

### 2. Montage

Cfr. Chapitre 3 de la notice du Kit (Annexe 1)

## C. Mode opératoire

### 1. Précaution

Avant de raccorder le module à son circuit d'utilisation, il convient d'en rincer soigneusement les annexes de fonctionnement.

### 2. Mesure du débit à l'eau. (Cfr point 4 B.)

### 3. Mise en service

a. S'assurer que la vanne de contre pression (sortie de rétentat) est entièrement ouverte.

b. Fermer les deux sorties perméat

c. Démarrer la séparation sur produit et régler la pompe péristaltique à  $\quad$  x rpm, la pression de travail étant de **1 bar**.

Fonctionner ainsi durant 20 minutes environ, ceci afin de stabiliser la couche de polarisation sur la membrane.

d. Ouvrir lentement une des sorties perméat.

e. Fermer progressivement la vanne de contre pression afin d'obtenir  $\quad$  la pression de travail de **1 bar**, tout en maintenant la vitesse de  $\quad$  circulation constante.

**Remarque** : il est dangereux de dépasser une pression de **2 bars**.

#### 4. Nettoyage de la membrane CARBOSEP

##### A. Procédure :

a. Vidanger l'appareillage et la tuyauterie via la pompe peristaltique **en poussant** à l'eau distillée. (T=10-15°C ; P=1 bar)

**Attention:** il est **impératif** que le module ne soit pas mis sous pression sans circulation de rétentat. Même de très basses pressions peuvent provoquer un **colmatage irréversible** de la membrane.

b. Rinçage puis vidange à l'eau distillée. (T=10-15°C ; P=1 bar)

c. **Lavage basique** à l'aide d'une solution de 1 litre d'Ultrasil 10 à une concentration de 10 g/l à une température de 80 à 85°C pendant une durée de 30 min. (P=3 à 4 bar)

d. Rinçage à l'eau distillée jusqu'à neutralité. (pH=6,5 ; P=2 à 3 bar)

e. **Lavage acide** à l'aide d'une solution de 1 litre d'Horolith 75 à une concentration de 3 ml/l à une température de 55 à 60°C pendant une durée de 30 min. (P=3 à 4 bar)

f. Rinçage à l'eau distillée jusqu'à neutralité. (pH=6,5 ; P=2 à 3 bar)

g. Effectuer une mesure de **débit à l'eau** à une température de 15 à 25°C pendant une durée de 10 min. (P=2 à 4 bar)

##### B. Mesure du débit à l'eau (D E )

Méthode de calcul.

$$D.E.4.25 = \frac{D \times 4 \times K_t}{P \times S}$$

D E.4.25. = débit à l'eau de la membrane sous une pression de 4 bar à 25°C.

D = débit mesuré.(l/h)

K<sub>t</sub> = coefficient de température.(voir tableau en annexe)

P = pression moyenne de mesure.(bars)

S = surface membranaire.(m<sup>2</sup>)

Cette mesure permet de contrôler la propreté de la membrane CARBOSEP

après nettoyage.

### 3. Mode diafiltration

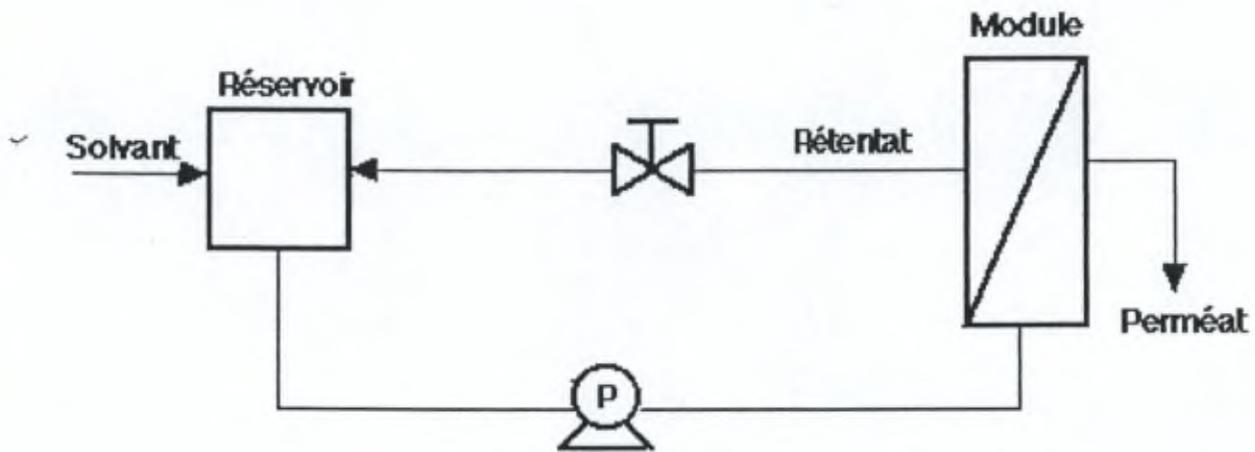


Fig. 2. Le mode diafiltration, le rétentat recircule vers un réservoir et le concentrat est retenu par la membrane. Le volume de perméat est remplacé, à taux constant, par un même volume de solvant dans le rétentat: les liposomes sont, ainsi, lavés.

# ANNEXE II

# ESSAI D'ENCAPSULATION MLV

LIPOSOME DEXAMETHASONE 21 PALMITATE

film :Egg-Pc/Cholestérol  
20 mg/ml

Tampon phosphate pH=7,4  
300 mOsm

Composition	Concentration en DMP ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	0,1	1	10	100	1000	3000
lipidique						
4/0						
%	86,6	85,2	85	88,4	87	81,8
stdv	5,6	6,8	2,9	5,6	4,6	9,3
4/3						
%	84,2	85,2	84,6	79,6	65,4	81,8
stdv	8,3	7,3	4,2	15,2	9,4	6,9
4/6						
%	83,8	83,6	83	72,6	75,2	60,2
stdv	10,1	5,9	6,6	7	13,9	12,3

# ESSAI D'ENCAPSULATION TABLEAU GENERAL

LIPOSOME DEXAMETHASONE 21 PALMITATE MLV.

film: Egg-PC/Cholesterol      Tampon phosphate pH=7,4      cpm 100µl pour le standart  
20mg/ml                              300mOsm                              cpm 100µl culot

film 4/0 prise de D-PAL 0,1µg					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne	déviation st.
4008,50	3758,90	93,77	0,09	0,09	0,01
3503,09	2902,18	82,85	0,08		
3011,05	2413,24	80,15	0,08		
5124,10	4669,62	91,13	0,09		
4978,90	4338,16	87,13	0,09		

film 4/3					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviation st.
4724,00	3964,56	83,92	0,08	0,08	0,00
5322,07	4339,76	81,54	0,08		
3598,87	2675,81	74,35	0,07		
4857,28	4732,28	97,43	0,10		
3279,33	2795,21	85,24	0,09		

film 4/6					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviation st.
4879,84	4202,72	86,12	0,09	0,09	0,01
5159,72	3576,94	69,32	0,07		
3176,71	3097,68	97,51	0,10		
5939,18	5146,64	86,66	0,09		
5355,94	4897,30	91,44	0,09		

film 4/0 prise de D-PAL 1µg					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviation st.
4972,99	4256,93	85,60	0,86	0,85	0,07
5252,56	4207,40	80,10	0,80		
5524,48	4392,11	79,50	0,80		
5405,53	4653,51	86,09	0,86		
5026,27	4823,16	95,96	0,96		

film 4/3					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviation st.
4805,62	3585,39	74,61	0,75	0,85	0,08
5245,29	4225,76	80,56	0,81		
5214,14	4717,32	90,47	0,90		
5131,92	4733,90	92,24	0,92		
5063,36	4515,84	89,19	0,89		

film 4/6					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviation st.
5130,87	4304,11	83,89	0,84	0,84	0,06
5136,16	3831,33	74,60	0,75		
5184,26	4552,12	87,81	0,88		
6734,56	5674,10	84,25	0,84		
5322,84	4788,47	89,96	0,90		

ilm 4/0 prise de D-PAL 10 $\mu$ g					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	$\mu$ g	moyenne $\mu$ g	déviation st.
4995,66	4171,28	83,50	8,35	8,52	0,28
5181,52	4206,62	81,19	8,12		
5109,91	4422,85	86,55	8,66		
4845,66	4222,58	87,14	8,71		
4977,91	4369,19	87,77	8,78		

ilm 4/3					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	$\mu$ g	moyenne $\mu$ g	déviation st.
4158,81	3251,90	78,19	7,82	8,46	0,41
5180,26	4505,93	86,98	8,70		
5282,97	4447,43	84,18	8,42		
5349,54	4535,75	84,79	8,48		
5133,83	4567,71	88,97	8,90		

ilm 4/6					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	$\mu$ g	moyenne $\mu$ g	déviation st.
4200,98	3557,16	84,67	8,47	8,29	0,60
5184,83	3774,32	72,80	7,28		
5206,89	4197,13	80,61	8,06		
5162,64	4393,85	85,11	8,51		
5412,52	4948,80	91,43	9,14		

ilm 4/0 prise de D-PAL 100 $\mu$ g					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	$\mu$ g	moyenne $\mu$ g	déviation st.
4931,59	4138,40	83,92	83,92	88,51	5,45
5430,14	5094,28	93,81	93,81		
5030,02	4291,90	85,33	85,33		
4881,89	4640,50	95,06	95,06		
4991,86	4215,33	84,44	84,44		

ilm 4/3					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	$\mu$ g	moyenne $\mu$ g	déviation st.
4478,86	2367,91	52,87	52,87	80,07	15,60
5012,92	4079,78	81,39	81,39		
5222,95	4596,12	88,00	88,00		
5003,77	4361,85	87,17	87,17		
5128,27	4663,39	90,93	90,93		

ilm 4/6					
cpm st	cpm culot	% encapsul.	$\mu$ g	moyenne $\mu$ g	déviation st.
5460,88	3965,40	72,61	72,61	73,04	7,66
4538,75	2913,22	64,19	64,19		
4758,10	4006,72	84,21	84,21		
5772,79	3940,85	68,27	68,27		
5255,18	3991,08	75,95	75,95		

n 4/0 prise de D-PAL 1000µg					
n st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviati on st.
4796,65	3858,76	80,45	804,47	870,50	45,06
5126,04	4598,02	89,70	896,99		
5108,29	4720,45	92,41	924,08		
5481,55	4770,41	87,03	870,27		
5053,55	4329,31	85,67	856,69		

n 4/3					
n st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviati on st.
4541,30	2515,45	55,39	553,91	655,38	92,64
4079,78	3257,61	79,85	798,48		
5093,95	3196,33	62,75	627,48		
4926,36	3014,43	61,19	611,90		
5137,52	3520,02	68,52	685,16		

n 4/6					
n st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviati on st.
4993,41	4253,55	85,18	851,83	752,79	137,89
4999,27	4445,33	88,92	889,20		
5274,57	4110,13	77,92	779,24		
6555,63	3555,35	54,23	542,34		
5608,98	3933,78	70,13	701,34		

n 4/0 prise de D-PAL 3000µg					
n st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviati on st.
5141,44	3952,12	76,87	2306,04	2454,37	276,34
5258,72	4641,54	88,26	2647,91		
5278,29	3607,90	68,35	2050,61		
4933,53	4490,08	91,01	2730,35		
5298,75	4480,86	84,56	2536,93		

n 4/3					
n st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviati on st.
4842,58	4118,72	85,05	2551,57	2452,63	210,38
4361,55	3650,39	83,69	2510,84		
4720,13	3869,56	81,98	2459,40		
4939,47	4354,78	88,16	2644,89		
5015,65	3505,05	69,88	2096,47		

n 4/6					
n st	cpm culot	% encapsul.	µg	moyenne µg	déviati on st.
4801,40	3663,68	76,30	2289,13	1810,41	365,21
4695,12	2414,18	51,42	1542,57		
5944,49	4202,38	70,69	2120,81		
5451,32	2791,30	51,20	1536,12		
5302,38	2763,25	52,11	1563,40		

# ESSAI D'ENCAPSULATION SUV

POSOME DEXAMETHASONE 21 PALMITATE

Im: Egg-PC/cholesterol Tampon phosphate pH=7,4 20mg/ml

Im 4/0 prise de D-pal 100µg					
Im st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
32603,00	37955,25	116,42	745,30	271,30	250,85
32246,75	49176,40	152,50	861,00	345,53	241,25
34194,00	37744,90	110,38	802,00	341,70	231,75
33014,58	41625,52	126,43	802,77	319,51	241,28
Im 4/0 prise de D-pal 500µg					
Im st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
26705,50	37323,65	139,76	1177,25	309,10	210,40
26873,00	34048,30	126,70	1156,95	293,95	254,50
27281,50	32848,75	120,41	622,15	344,95	231,75
26953,33	34740,23	128,96	985,45	316,00	232,22
Im 4/0 prise de D-pal 3000µg					
Im st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
25774,75	22484,80	87,24	862,80	382,75	260,30
25060,50	28639,10	114,28	1001,15	368,60	271,25
25335,75	22726,80	89,70	1273,20	278,55	264,95
25390,33	24616,90	97,07	1045,72	343,30	265,50
Im 4/3 prise de D-pal 100µg					
Im st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
27175,89	29998,90	110,39	570,40	247,45	219,20
27150,75	25891,55	95,36	522,25	214,20	215,05
22377,25	25218,40	112,70	466,60	197,00	236,80
25567,96	27036,28	106,15	519,75	219,55	223,68
Im 4/3 prise de D-pal 500µg					
Im st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
5287,70	5644,06	106,74	1229,20	514,80	465,90
5012,45	5568,75	111,10	1377,85	412,05	652,15
5250,20	5459,15	103,98	1258,80	490,50	435,35
5183,45	5557,32	107,27	1288,62	472,45	517,80
Im 4/3 prise de D-pal 3000µg					
Im st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
201765,10	176278,29	87,37	9346,67	725,24	230,45
196271,05	153047,52	77,98	11749,56	748,64	248,01
197154,15	183299,36	92,97	9438,61	713,09	227,86
98396,77	170875,06	86,11	10178,28	728,99	235,44

# ESSAI D'ENCAPSULATION SUV<sub>co</sub>

LIPOSOME DEXAMETHASONE 21 PALMITATE

film: Egg-PC/cholesterol      Tampon phosphate pH=7,4      20mg/ml

film 4/0 prise de D-pal 100µg					
cpm st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
32603,00	22773,15	69,85	745,30	271,30	250,85
32246,75	29505,84	91,50	861,00	345,53	241,25
34194,00	22646,94	66,23	802,00	341,70	231,75
33014,58	24975,31	75,86	802,77	319,51	241,28
film 4/0 prise de D-pal 500µg					
cpm st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
26705,50	22394,19	83,86	1177,25	309,10	210,40
26873,00	20428,98	76,02	1156,95	293,95	254,50
27281,50	19709,25	72,24	622,15	344,95	231,75
26953,33	20844,14	77,37	985,45	316,00	232,22
film 4/0 prise de D-pal 3000µg					
cpm st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
25774,75	13490,88	52,34	862,80	382,75	260,30
25060,50	17183,46	68,57	1001,15	368,60	271,25
25335,75	13636,08	53,82	1273,20	278,55	264,95
25390,33	14770,14	58,24	1045,72	343,30	265,50
film 4/3 prise de D-pal 100µg					
cpm st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
27175,89	17999,34	66,23	570,40	247,45	219,20
27150,75	15534,93	57,22	522,25	214,20	215,05
22377,25	15131,04	67,62	466,60	197,00	236,80
25567,96	16221,77	63,69	519,75	219,55	223,68
film 4/3 prise de D-pal 500µg					
cpm st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
5287,70	3386,44	64,04	1229,20	514,80	465,90
5012,45	3341,25	66,66	1377,85	412,05	652,15
5250,20	3275,49	62,39	1258,80	490,50	435,35
5183,45	3334,39	64,36	1288,62	472,45	517,80
film 4/3 prise de D-pal 3000µg					
cpm st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	2°lavage	3°lavage
201765,10	105766,97	52,42	9346,67	725,24	230,45
196271,05	91828,51	46,79	11749,56	748,64	248,01
197154,15	109979,62	55,78	9438,61	713,09	227,86
198396,77	102525,03	51,66	10178,28	728,99	235,44

**Unpaired t-Test X<sub>1</sub>: Column 4 Y<sub>1</sub>: 100**

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
4	1.426	.2271

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
4/0	3	75.86	13.665	7.89
4/3	3	63.69	5.646	3.26

1

**Unpaired t-Test X<sub>1</sub>: Column 4 Y<sub>2</sub>: 500**

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
4	3.573	.0233

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
4/0	3	77.373	5.927	3.422
4/3	3	64.363	2.153	1.243

2

**Unpaired t-Test X<sub>1</sub>: Column 4 Y<sub>3</sub>: 3000**

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
4	1.133	.3205

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
4/0	3	58.243	8.974	5.181
4/3	3	51.663	4.543	2.623

3

Unpaired t-Test X<sub>1</sub>: Column 3 Y<sub>1</sub>: 4/0

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
4	-.176	.8689

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
C 100	3	75.86	13.665	7.89
C 500	3	77.373	5.927	3.422

1

Unpaired t-Test X<sub>1</sub>: Column 3 Y<sub>2</sub>: 4/3

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
4	-.261	.8073

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
C 100	3	63.483	5.438	3.14
C 500	3	64.363	2.153	1.243

2

Unpaired t-Test X<sub>1</sub>: Column 3 Y<sub>1</sub>: 4/0

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
4	1.871	.1346

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
C 100	3	75.86	13.665	7.89
C 3000	3	58.13	9.087	5.246

1

Unpaired t-Test X<sub>1</sub>: Column 3 Y<sub>2</sub>: 4/3

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
4	2.841	.0468

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
C 100	3	63.483	5.438	3.14
C 3000	3	51.4	4.969	2.869

2

**Unpaired t-Test X<sub>1</sub>: Column 3 Y<sub>1</sub>: 4/0**

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
4	3.072	.0372

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
C 500	3	77.373	5.927	3.422
C 3000	3	58.13	9.087	5.246

1

**Unpaired t-Test X<sub>1</sub>: Column 3 Y<sub>2</sub>: 4/3**

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
4	4.146	.0143

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
C 500	3	64.363	2.153	1.243
C 3000	3	51.4	4.969	2.869

2

# ESSAI D'ENCAPSULATION SUV

LIPOSOME DEXAMETHASONE 21 PALMITATE

film: Egg-PC/cholesterol      Tampon phosphate pH=7,4      20mg/ml

essai avec pesé de l'échantillon

film 4/3 prise de D-pal 500µg (1)				
cpm st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	stdev
5541,38	3145,86	56,77	252,23	
5410,62	3295,68	60,91	322,93	
5361,07	3243,67	60,50	344,15	
5437,69	3228,40	59,40	306,44	2,28
film 4/3 prise de D-pal 500µg (2)				
cpm st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	stdev
5380,41	3300,45	61,34	262,84	
5472,64	3105,38	56,74	255,36	
5330,35	3042,44	57,08	441,34	
5394,47	3149,42	58,39	319,85	2,56
film 4/3 prise de D-pal 500µg (3)				
cpm st	cpm culot	%encapsulat.	1°lavage	
6186,39	4719,88	76,29	312,30	
6130,51	4631,55	75,55	378,91	
6131,59	4733,38	77,20	331,00	
6149,50		76,35	340,74	0,82

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y1: Q1

DF:	Unpaired t Value:	P-Val: (2-tail):		
8	578	5794		
Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/0	5	86.4	5.588	2.502
1 4/3	5	84	6.387	2.742

1

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y2: 1

DF:	Unpaired t Value:	P-Val: (2-tail):		
8	0	.		
Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/0	5	85	8.244	2.848
1 4/3	5	85	7.481	2.426

2

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y3: 10

DF:	Unpaired t Value:	P-Val: (2-tail):		
8	.178	.8648		
Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/0	5	85	2.815	1.264
1 4/3	5	84.8	4.159	1.88

3

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y4: 100

DF:	Unpaired t Value:	P-Val: (2-tail):		
8	1.137	.2884		
Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/0	5	88.4	5.595	2.802
1 4/3	5	79.8	15.959	7.137

4

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y5: 1000

DF:	Unpaired t Value:	P-Val: (2-tail):		
8	4.42	.0017		
Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/0	5	87	4.883	2.049
1 4/3	5	85.4	9.287	4.202

5

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y6: 2000

DF:	Unpaired t Value:	P-Val: (2-tail):		
8	0	.		
Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/0	5	81.8	9.236	4.13
1 4/3	5	81.8	8.877	3.678

6

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y1: 9.1

DF: Unpaired t Value: Prob. (2-tail):

8	1.151	.8538
---	-------	-------

Group: Mean: Std. Dev.: Std. Error:

1 470	6	88.8	5.595	2.502
1 478	6	85.8	19.426	4.663

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y2: 1

DF: Unpaired t Value: Prob. (2-tail):

8	4.116	.888
---	-------	------

Group: Mean: Std. Dev.: Std. Error:

1 470	8	89	6.364	2.846
1 478	5	83.4	5.771	2.581

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y3: 10

DF: Unpaired t Value: Prob. (2-tail):

8	8.17	.5643
---	------	-------

Group: Mean: Std. Dev.: Std. Error:

1 470	5	86	2.915	1.304
1 478	5	83	6.833	2.866

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y4: 100

DF: Unpaired t Value: Prob. (2-tail):

8	3.424	.0087
---	-------	-------

Group: Mean: Std. Dev.: Std. Error:

1 470	5	88.4	5.595	2.502
1 478	5	73	7.681	3.435

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y5: 1000

DF: Unpaired t Value: Prob. (2-tail):

8	1.805	.1087
---	-------	-------

Group: Mean: Std. Dev.: Std. Error:

1 470	5	87	4.543	2.049
1 478	5	75.2	13.882	6.208

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y6: 1000

DF: Unpaired t Value: Prob. (2-tail):

8	3.115	.0143
---	-------	-------

Group: Mean: Std. Dev.: Std. Error:

1 470	5	81.8	9.256	4.13
1 478	5	80.2	12.276	5.49

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y1: 8.1

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
8	-1.301	.771

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/3	5	84	4.247	3.742
1 4/8	5	85.8	19.426	4.683

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y2: 1

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
8	.372	.7153

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/3	5	85	7.681	3.435
1 4/8	5	83.4	5.771	2.561

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y3: 10

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
8	.457	.6599

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/3	5	84.8	4.159	1.88
1 4/8	5	83	6.533	2.666

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y4: 100

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
8	.688	.5158

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/3	5	79.8	15.969	7.137
1 4/8	5	73	7.881	3.436

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y5: 1000

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
8	-1.307	.2274

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/3	5	65.4	9.297	4.202
1 4/8	5	75.2	13.882	6.268

Unpaired t-Test X1: Column 7 Y6: 3000

DF:	Unpaired t Value:	Prob. (2-tail):
8	3.401	.0094

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
1 4/3	5	81.8	6.877	3.076
1 4/8	5	80.2	12.276	5.49

IJP 02909

## Research Papers

# Liposome-incorporated dexamethasone palmitate: Chemical and physical properties

H. Benameur<sup>a</sup>, G. De Gand<sup>a</sup>, R. Brasseur<sup>b</sup>, J.P. Van Vooren<sup>c</sup> and F.J. Legros<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Physiopathology, Free University of Brussels, Campus Erasme Bldg E, 808, route de Lennik, 1070 Brussels (Belgium),

<sup>b</sup> Laboratory of Physical Chemistry of Macromolecules at Interfaces, Free University of Brussels, Brussels (Belgium)

and <sup>c</sup> Chest Department, Erasme Hospital, Brussels (Belgium)

(Received 31 March 1992)

(Accepted 8 May 1992)

**Key words:** Multilamellar vesicle; Small unilamellar vesicle; Dexamethasone; Dexamethasone palmitate; Minicolumn centrifugation; Lipid complex; Conformational analysis

## Summary

Dexamethasone palmitate (DMP) has been prepared by esterification. This molecule and its isotopic marker have been encapsulated into 20 mg multilamellar liposomes (MLV) and small unilamellar vesicles (SUV) made of egg phosphatidylcholine (egg-PC) alone or of egg-PC and cholesterol (CH) in molar ratios of 4:3 and 4:6. Amounts of DMP ranging from 0.1 to 3000 µg/ml were added to the lipid film. Liposomes were formed in 1 ml phosphate-buffered saline, pH 7.4, 300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. MLV were first isolated by centrifugation. This method proved to be inappropriate, since DMP not only was encapsulated into MLV but also formed micellar structures and aggregates which could not be separated from MLV by centrifugation nor by filtration through a glass microfiber filter. An alternative rapid method was developed, attempting to isolate unencapsulated DMP complexes by minicolumn centrifugation from liposomal suspensions. This method was successfully applied to DMP associated SUV. The encapsulation efficiency was 65% for 4:3 SUV. This fell to 50% for a DMP concentration of 3000 µg/ml. This should be related to a maximal DMP encapsulation of 13 mol% (Fildes and Oliver, *J. Pharm. Pharmacol.*, 30 (1978) 337-342) which corresponds to 2600 µg/ml under our experimental conditions. The 75% optimum efficiency observed for liposomes made of egg-PC alone suggested that DMP could replace CH in these vesicles. Conformational analysis indicated that DMP inserted into monolayers with its carbonyl group oriented towards the aqueous surface while the aliphatic chain became aligned parallel with the acyl chains of phospholipids. The consideration of the incorporation of DMP into an assembly of phospholipids as taking place in a manner similar to that of CH would appear to be reasonable. This reinforces the validity of the hypothesis of CH being replaced by DMP in liposomes composed of egg PC alone.

## Introduction

The treatment of inflammatory diseases by systemic administration of glucocorticoids is often

accompanied by serious side effects (Goodman and Gilman, 1985) which limit the use, or necessitate the withdrawal of otherwise effective therapeutic agents. The incorporation of a number of drugs in liposomes has been shown to increase their effectiveness and to reduce their toxicity (Fendler and Romero, 1977). The local administration of liposomes into body anatomical cavities containing phagocytic cells, e.g., pulmonary

Correspondence to: F.J. Legros, Laboratory of Physiopathology, Campus Erasme Bldg E, 808, route de Lennik, 1070 Brussels, Belgium.

macrophages, could greatly enhance the probability of cell targeting. It is known that these phospholipid vesicles are readily taken up by and retained in phagocytic cells such as macrophages (Fidler et al., 1989).

Liposome-incorporated corticosteroids inhibit certain types of inflammation in man and animals more intensively than a corresponding dose of free drugs. Dexamethasone palmitate (DMP) was designed for this purpose and has been proven to be 5.6-times as potent as the plain formulation after intra-articular application (Mizushima et al., 1982).

In order to determine the exact mechanism of delivery of the drug, it is important to characterize its chemical and physical properties. Specifically, detailed knowledge of the mode of interaction with membrane lipids will help in the elucidation of the attachment of DMP to liposomes.

In the present report, multilamellar (MLV) and unilamellar (SUV) liposomes were used. The vesicle size was measured by laser-light scattering. The state of DMP in monolayers was determined by conformational analysis. We also achieved the successful separation of the lipid-DMP complexes and insoluble drug precipitate

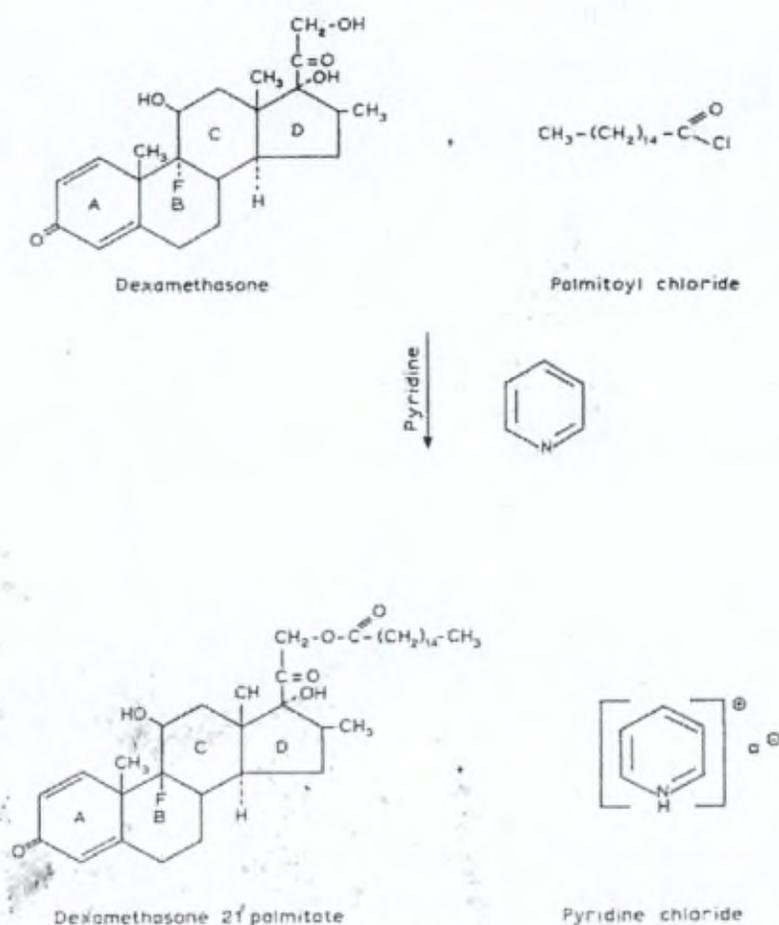


Fig. 1. Chemical structure of DM and DMP in the esterification reaction.

from liposome-associated compound. These complexes are known to be quite difficult to separate by centrifugation, whereas attempts to dialyse out the unencapsulated compound are frustrated by its low solubility in water.

## Materials and Methods

### Materials

Egg phosphatidylcholine (egg PC type VII-F) 100 mg/ml in a chloroform solution, cholesterol (CH) and dexamethasone (DM) 9 $\alpha$ -fluoro-16 $\alpha$ -methylprednisolone were purchased from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). Cholesterol was dissolved at a concentration of 20 mg/ml in chloroform. [1,2,4,6,7-<sup>3</sup>H]Dexamethasone (37 MBq/ml) and [<sup>14</sup>C]inulin (1.85 MBq/ml) were purchased from Amersham International (Amersham, Bucks, U.K.). All the above materials were stored at -20°C.

Phosphate buffer was used by mixing precalculated amounts of monobasic and dibasic sodium phosphates. Stock solution A was prepared by dissolving 27.6 g (0.2 mol) of monobasic sodium phosphate (monohydrate) in deionized water to a total volume of 1000 ml. Stock solution B was prepared by dissolving 28.4 g (0.2 mol) of dibasic sodium phosphate in deionized water to a total volume of 1000 ml. By mixing 19 ml of A and 81 ml of B and diluting to a total volume of 200 ml, a 0.1 M phosphate buffer of pH 7.4 was prepared. The osmolality was brought to 300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O by adding NaCl.

Palmitoyl chloride was obtained from Aldrich Chemical Co (Brussels, Belgium). Sephadex G-50 (100-200 mesh) was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden) and TLC silica gel 60 WF<sub>254</sub> plates were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Dexamethasone 21-palmitate (DMP) was kindly provided by Roussel UCLAF (Romainville, France); [1,2,4,6,7-<sup>3</sup>H]dexamethasone 21-palmitate (D\*MP) was prepared in our laboratory. TLC was performed in an Eastman chromatogram developing apparatus with chloroform/ethyl acetate (1:1, v/v) as a solvent. Liposomes

were dissolved in an organic solvent (Solucne 350<sup>®</sup>, Packard, Meriden, U.S.A.). Radioactivity was counted in a Packard liquid scintillation cocktail (Insta-Fluor<sup>®</sup>, Packard). A scintillation spectrophotometer (Pharmacia LKB) was used for radioactivity counting.

The sizes of the MLV were measured with Coulter<sup>®</sup> LS-130 particle size analysers based on laser diffraction. This equipment had a particle size measurement range of 0.1-800  $\mu$ m on 100 size channels and a PIDS (polarization intensity differential scattering) optical system used as a specially engineered third optical train to measure and analyze the symmetry of the particle sizes in the 0.1-0.5  $\mu$ m range.

### Methods

#### Synthesis of dexamethasone palmitate

Tritiated dexamethasone palmitate (D\*MP) was prepared by esterification (Fig. 1) according to the method of Shaw et al. (1976) with slight modifications. Dexamethasone (24 mg,  $6.11 \times 10^{-5}$  mol) was dissolved in pyridine (1 ml) at room temperature. [1,2,4,6,7-<sup>3</sup>H]Dexamethasone (50  $\mu$ l, 50  $\mu$ Ci) in ethanol and palmitoyl chloride (6  $\mu$ l) was added, and the mixture was stirred at 4°C for 24 h. The solvent was removed under vacuum at 45°C. Distilled water (5 ml) and ethanol (20 ml) were added in that order. The mixture was concentrated under vacuum at 45°C to remove water. This procedure was repeated three times. The residue was dissolved in a minimum amount of ethanol and chromatographed on TLC using chloroform/ethyl acetate (1:1, v/v) as solvent; 98% of the radioactivity migrated with the solvent front. This material was presumed to be the ester product as judged by UV detection with DMP as a control, and was used without further purification. The silica was collected from the TLC plate and DMP was eluted by filtration with chloroform in a Pasteur pipette plugged with glass wool.

Fractions (2 ml) were collected and 10  $\mu$ l of each fraction were taken for scintillation counting. Fractions representing the radioactivity were pooled (20 ml). The specific radioactivity was determined as 2.09  $\mu$ Ci/ml.

Unlabelled dexamethasone palmitate was synthesized in the same way on a large scale and was purified on a Sephadex column (2.5 cm internal diameter, 30 cm height; Sephadex G-50, Pharmacia LKB) using chloroform/ethyl acetate as solvent (1:1, v/v). Fractions of 10 ml were collected; a sample (10  $\mu$ l) of each was taken for TLC using toluene/ethyl acetate (7:3, v/v) as solvent. Fractions containing DMP were evaporated to dryness. The product was shown to be dexamethasone 21-palmitate by IR and NMR spectroscopy (250 MHz).

#### Encapsulation of DMP into MLV

Egg-PC/CH molar ratios of 4:0, 4:3 and 4:6, DMP and D\*MP as a tracer (0.1, 1, 10, 100, 1000 and 3000  $\mu$ g/ml) were dissolved in chloroform. The total weight of PC and CH in each preparation was 20 mg. The chloroform was removed from the lipid mixture by rotary evaporation under  $N_2$ , at a temperature of 20°C, i.e., above the phase-transition of egg PC. After drying under vacuum for 24 h, three glass beads were added. The dried lipid film was dispersed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (300 mOsm), by vigorous shaking at room temperature. Liposomes formed spontaneously when the dried film was hydrated and consisted of multilamellar structures with concentric phospholipid bilayers separated by water.

These MLV suspensions were washed three times in the same buffer (1 ml) by centrifugation at 4000 rpm for 20 min at 4°C, in order to separate associated from nonassociated drug. The mixture was resuspended in buffer (1 ml) and passed through a GF/C filter.

The percentage of DMP encapsulation efficiency was calculated following Eqn 1 where  $cpm_1$  denotes the radioactivity in 0.1 ml of liposome suspension and  $cpm_2$  represents that in 0.1 ml of washed and resuspended pellet. All samples were dissolved in 0.5 ml Soluene 350 and incorporated into 10 ml of scintillation cocktail prior to counting. All samples were counted for 10 min.

$$\% \text{ encapsulation} = \left[ \frac{cpm_2}{cpm_1} \right] \times 100 \quad (1)$$

Results were expressed as means  $\pm$  SD. Statistical significance between experimental groups was determined by Student's unpaired *t*-test.

#### Encapsulation of [ $^{14}$ C]inulin

Lipid films (egg PC/CH molar ratio 4:3) and three concentrations of DMP (100, 500 and 3000  $\mu$ g/ml), total weight of lipids 20 mg, were prepared as described above. Inulin encapsulation into DMP-MLV was performed in 0.98 ml phosphate buffer in which 0.02 ml [ $^{14}$ C]inulin was dissolved as a marker (Basworth and Hunt, 1982). Filtration of these liposomes was performed on Millipore apparatus (Brussels, Belgium) with a GF/C filter.

#### Particle size distribution of MLV

Empty and DMP-loaded MLV (4:3, 4:0, 20 mg lipids, 0.5 mg/ml DMP) were prepared in phosphate buffer, pH 7.4. The equipment was a Coulter<sup>®</sup> LS-130 particle size analyser, based on measuring the patterns of light scattered from particles exposed to a collimated light beam. Differently sized particles produced a characteristic pattern of light scattering. This pattern was analyzed in order to produce an accurate size distribution (Hoff, 1990).

Auto-rinsing of the particle size analyser with buffer was realized and the run cycle was performed with both MLV preparations. All operations were computerized including statistical calculations.

#### Encapsulation of DMP into SUV

Small unilamellar vesicles (SUV) were prepared by ultrasonic disintegration for 20 min at 60 W under a nitrogen atmosphere (Soniprep, MSE Scientific Instruments, Crawley, U.K.).

#### Mimicolumn centrifugation of SUV

This procedure is based on the method of Fry et al. (1978). Sephadex G-50 was allowed to swell in the phosphate buffer described above. A GF/C Wathman filter (Batra, 1975) was placed in the barrel of a 5 ml plastic syringe to support the gel and to retain complexes and aggregates. The syringe was filled with Sephadex.

The column was inserted into a test tube so that it was supported at the top of the tube by the finger grips of the syringe. Each column was weighed before being spun at 2000 rpm for 5 min in a centrifuge with swinging buckets to remove excess buffer from the Sephadex beads.

The syringe was transferred to another test tube and up to 1 ml of SUV preparation containing entrapped and free solute was applied to the Sephadex bed. The column was weighed and spun under the conditions employed for expelling the liposomal material from the column and into the test tube. Solute retained by the Sephadex beads was recovered by washing the column with buffer and eluting by centrifugation at 2000 rpm.

Radioactivity was measured using a Pharmacia LKB Rack $\beta$  scintillation spectrophotometer using Soluene 350 and Instafluor scintillation cocktail.

#### Conformational analysis

A theoretical approach was undertaken which allowed the elucidation of the conformation of the entire DMP molecule and its mode of insertion into the lipid layer. This approach was based on the technique developed by Brasseur et al. (1981). The total conformational energy of the molecule at the air-water interface was empirically calculated as the sum of all contributions resulting from local interactions. The values used for the valence angles, bond lengths, atomic charges, and the X-ray crystalline form of DMP were those reported by Mitsunobu et al. (1989). In the calculation procedure, the hypermatrix method was used to surround one drug with lipid molecules (Brasseur et al., 1981). This approach was limited to the number of molecules that sufficed to surround one central molecule.

The configuration of the final mixed monolayer was projected onto the interface plane ( $X,Y$ ) and the areas occupied per molecule were estimated. The mean interaction energy between one drug molecule surrounded by lipids was equal to the sum of lipid-drug and lipid-lipid interaction energies divided by the number of surrounding lipids (Brasseur, 1991).

The theoretical analysis supposes a procedure comprising two steps, namely, determination of

(a) the conformation of the isolated DMP molecule and (b) the conformation of the DMP assembled in the monolayer.

The hydrophobic/hydrophilic balance ( $\phi$ ) was calculated according to Eqn 2 where  $E_{\text{pho}}$  represents the hydrophobic transfer energy and  $E_{\text{phi}}$  the hydrophilic transfer energy.

$$\phi = \log \frac{E_{\text{pho}}}{E_{\text{phi}}} \quad (2)$$

The molecular hydrophobicity potential showing hydrophobic and hydrophilic regions was calculated taking into account the transfer energy of each atom employing a recently reported methodology (Brasseur, 1991).

All calculations were performed using an Olivetti CP486 with an 80486 processor. The software was PC-TAMMO + (Theoretical Analysis of Molecular Membrane Organization) and PC-MSA + (Molecular Structure Analysis) procedures. Graphs were drawn with the PC-MGM + (Molecular Graphics Manipulation) program.

## Results

#### Conformational analysis

The mean energies of interaction, computed by the hypermatrix method between DMP and DPPC, are reported in Table 1. This value was quite different from the interaction energy between DPPC-DPPC molecules. The molecular area of the polar DMP group was within the range of DPPC. The hydrophobic/hydrophilic

TABLE 1  
Conformational analysis

	DPPC-DPPC	DPPC-DMP	DPPC-CH
Energy (kJ/mol)	-54.3	-33.4	-58.9
Molecular area (nm <sup>2</sup> /mol)	7	6	5

Mean interaction energies and molecular area between DPPC, DMP and CH incorporated in DPPC monolayer have been calculated and compared.

balance ( $\phi$ ) was 0.73 indicating that DMP is a hydrophobic molecule.

The calculation procedure (hypermatrix methods) showed that, in order to surround one DMP molecule, six lipid molecules are required. Comparison between the molecular packing of phospholipids and DMP showed a common characteristic: hydrophobic interactions led to parallel stacking of hydrocarbon chains in a nonpolar matrix, and thus to the formation of a polar matrix consisting of head groups which establish the link between the hydrocarbon chains. In contrast, the polar matrix forms a relatively large space and often contained polar solvent molecules such as water.

Figs 2 and 3 show a proposed mechanism for the insertion of DMP into the DPPC monolayer. In Fig. 2, the oxygen group of DMP ring A is oriented in the same direction as DPPC which stabilizes the molecular arrangement. Fig. 4 shows the molecular hydrophobicity potential of DMP. The hydrophobic envelopes surround the DMP molecule. Only the carboxyl and ester functions induce very small hydrophilic envelopes.

#### *DMP encapsulation into MLV*

Multilamellar vesicles were prepared at different molar ratios of lipid and at various DMP concentrations.

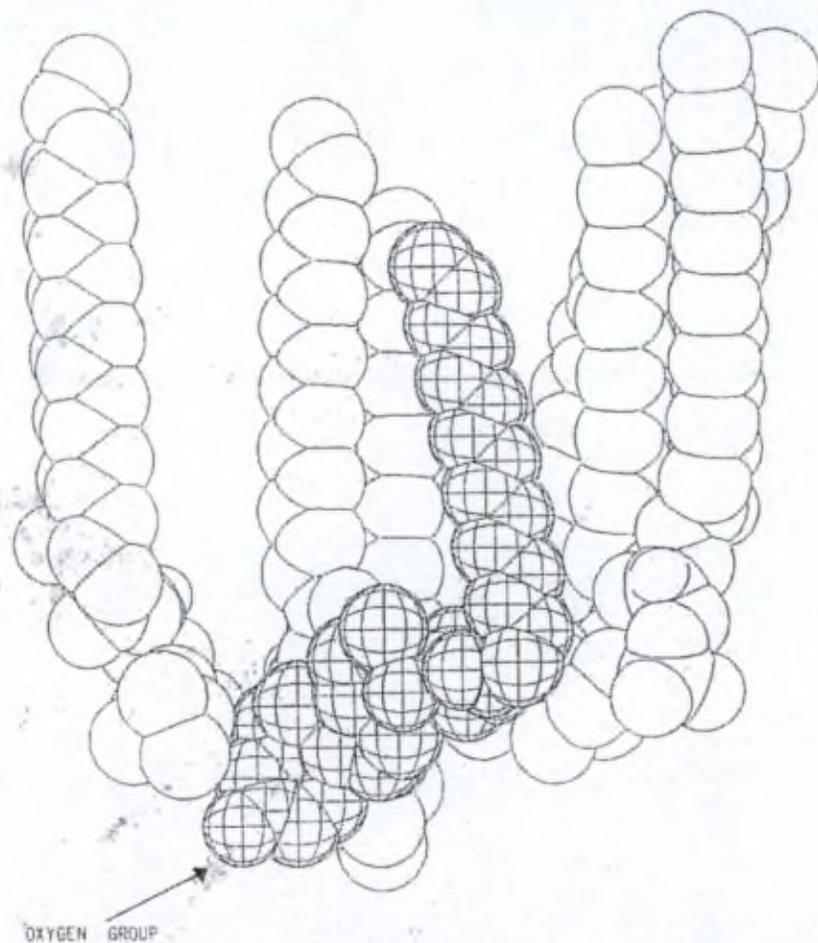


Fig. 2. Space-filling view of the mode of insertion of DMP into DPPC monolayers. DMP is represented by space-filling cross-hatching. The DPPC in front of DMP is not drawn.

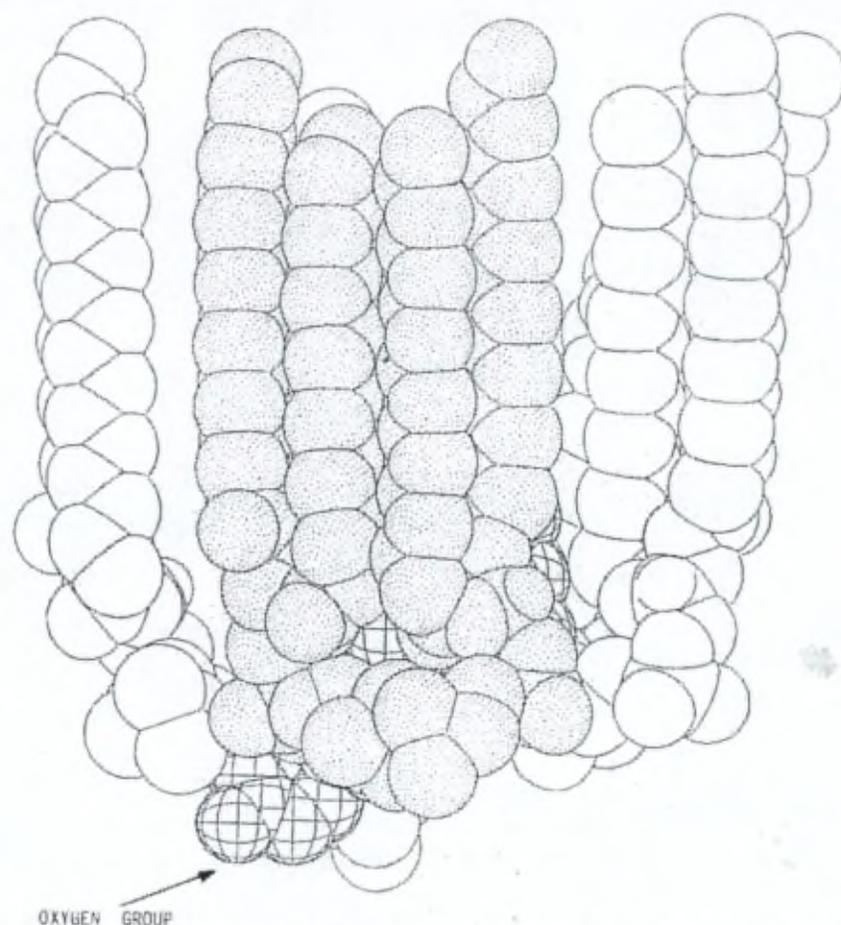


Fig. 3. Space-filling view of the mode of insertion of DMP into DPPC monolayers. DMP is shown in space-filling cross-hatching. The DPPC in front of DMP is represented by dotted filling.

The encapsulation efficiency was statistically identical ( $p > 0.05$ ) at PC/CH molar ratios of 4:0 and 4:3 and at almost all concentrations of DMP used, averaging 85% (Fig. 5). Only the 4:6 MLV at 3000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DMP concentration had a statistically significant ( $p < 0.05$ ) lower encapsulation efficiency dropping to 60%.

When vesicle size was measured by laser-light diffraction, the smallest liposomes of the MLV population had a diameter of 0.2  $\mu\text{m}$  while the largest vesicles exhibited a diameter equal to or greater than 8  $\mu\text{m}$ . Diameters of empty and DMP-loaded liposomes were equivalent (Fig. 6). The largest entrapped volume was found for liposome diameters equal to or greater than 8  $\mu\text{m}$ .

When DMP-MLV entrapping [ $^{14}\text{C}$ ]inulin were passed through a GF/C Whatman filter, radioactivity was almost completely retained on the filter (Table 2) indicating that multilayer liposomes were adsorbed on this filter.

Suspensions of DMP with D\*MP as a marker and without liposomes were also filtered either immediately after preparation or following sonication. In both cases all of the radioactivity was counted on the GF/C filter.

#### DMP-SUV

DMP-SUV were prepared by sonication of DMP-MLV as described in Materials and Methods. After minicolumn centrifugation, including

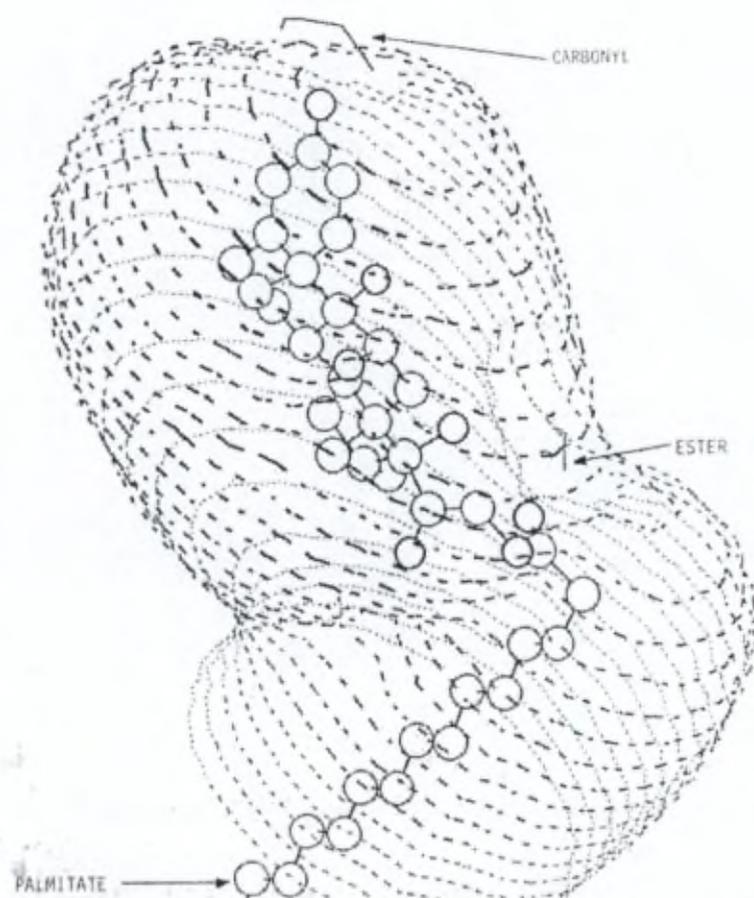


Fig. 4. Perspective view of the molecular hydrophobicity potential of DMP. Hydrophobic envelopes are indicated using continuous lines; hydrophilic envelopes are represented using broken lines. Carbonyl, ester and palmitate are indicated.

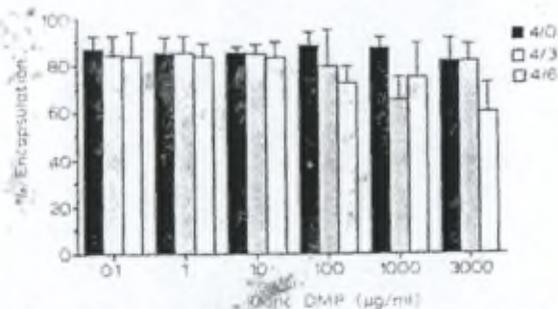


Fig. 5. Encapsulation efficiency of dexamethasone palmitate at concentrations of 0.1, 1, 10, 100, 1000 and 3000 µg/ml ( $n=5$ ) in MLV of egg PC and of egg PC/CH in molar ratios of 4:3 and 4:6.

TABLE 2

Filtration data of MLV

DMP concentration (µg/ml)	CPM filtrate	CPM filter (GF/C)
100	52.5 ± 1.00	208 643 ± 6 809
500	53.3 ± 1.00	203 745 ± 8 404
3000	49.3 ± 1.00	208 928 ± 7 308

Radioactivities of the filter (GF/C) and of the filtrate are expressed in cpm.

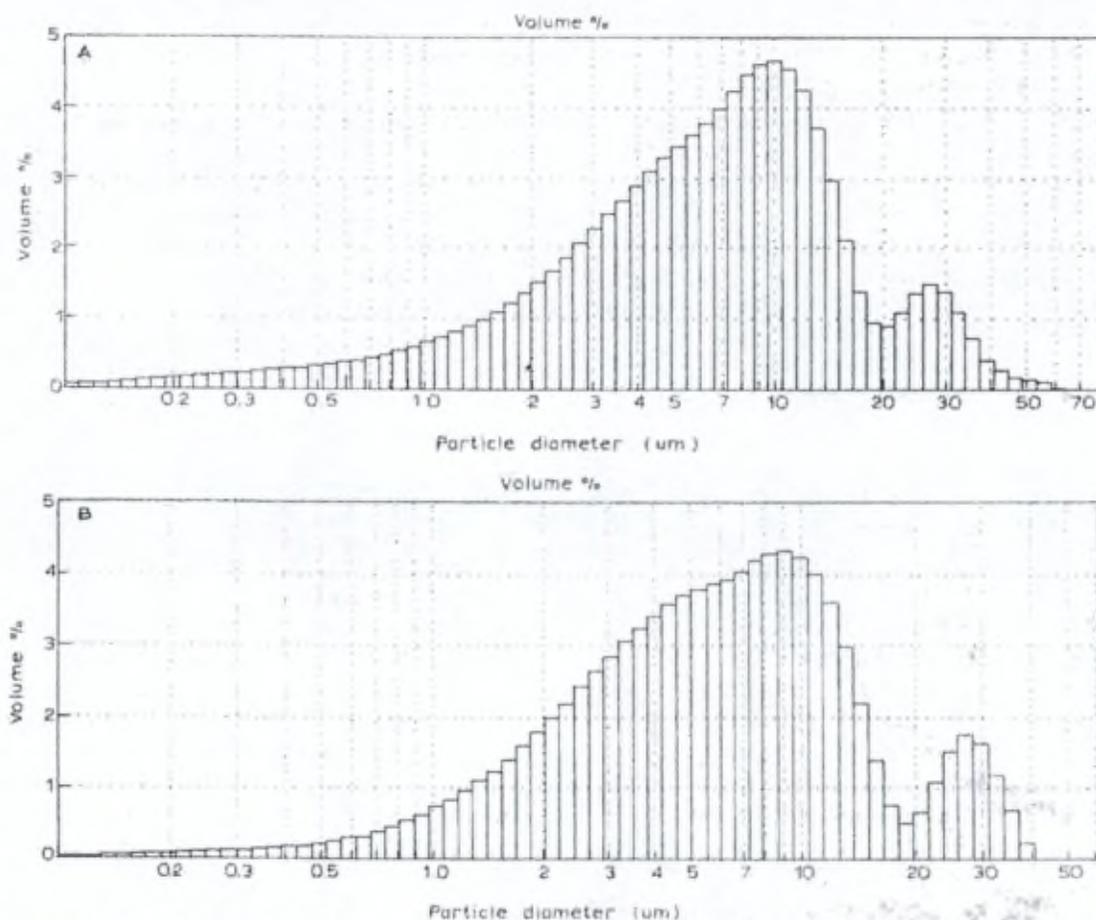


Fig. 6. Particle diameter of empty MLV and of dexamethasone-loaded MLV as a function of the percentage of total liposomal volume in subpopulations ranging from 0.2 to 40  $\mu\text{m}$ . (a) Empty MLV; (b) DMP-loaded MLV.

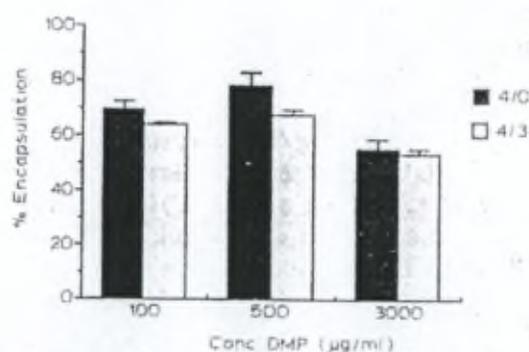


Fig. 7. Encapsulation efficiency of dexamethasone palmitate at concentrations of 100, 500 and 3000  $\mu\text{g/ml}$  ( $n = 5$ ) in SUV of egg PC and of egg PC/CH in the molar ratio of 4:3.

TABLE 3

Filtration data of SUV

DMP concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	CPM filtrate	CPM filter (GF/C)
100	227809 $\pm$ 29608	43193 $\pm$ 5050
500	207504 $\pm$ 10508	37146 $\pm$ 7908
3000	232441 $\pm$ 7568	48240 $\pm$ 2608

Radioactivities of the filter (GF/C) and of the filtrate are expressed in cpm.

filtration through GF/C filter, the encapsulation efficiency was found to be 65% for egg PC/CH (4:3, SUV formulation) and 75% for liposomes without CH (Fig. 7). The encapsulation efficiency significantly ( $p < 0.05$ ) fell to 50% for a DMP concentration of 3000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

When DMP-SUV entrapping [ $^{14}\text{C}$ ]inulin were passed through GF/C filter, all of the radioactivity counts were found to be in the test tube, almost no radioactivity being adsorbed on the filter (Table 3).

## Discussion

Dexamethasone palmitate has been encapsulated into readily prepared liposomes, namely, MLV and SUV. The phospholipid vesicles were initially centrifuged at 2500 rpm in order to separate encapsulated from nonencapsulated drug. A pellet of liposomes was harvested.

The purity of this pellet had to be questioned taking into account that molecules of DMP are not soluble in water in the accepted sense. In aqueous media, they align themselves in micellar structures in order to minimize the unfavorable interactions between the bulk aqueous phase and the  $\text{C}_{16}$  hydrocarbon fatty acid chain. These micellar structures cannot be centrifuged at 2500 rpm. In addition, DMP forms aggregates (insoluble drug precipitate) and lipid complexes in water (Szoka and Papahadjopoulos, 1980).

Filtration on 1  $\mu\text{m}$  pore size GF/C filter indicated that DMP complexes formed at DMP concentrations from 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Since they were also retained by the filter, their diameter was at least 1  $\mu\text{m}$ . MLV encapsulating [ $^{14}\text{C}$ ]inulin as a marker of the intraliposomal aqueous phase were retained by this filter. The diameter of the vesicles, DMP-loaded or unloaded, which encapsulated the largest aqueous volume was 8  $\mu\text{m}$  and greater. Thus, it appears that DMP-MLV and DMP complexes were both retained on the filter.

It has been reported that the classical methods of separation, dialysis, chromatography on a silica gel column and ultrafiltration, are not suitable for use in the purification of DMP liposomes (Szoka and Papahadjopoulos, 1980).

An alternative approach has been examined. Attempts were made to separate unencapsulated DMP complexes by performing minicolumn centrifugation according to the procedure of Fry et al. (1978). This method involves centrifugation of a liposomal suspension while being separated from unencapsulated molecules through molecular sieving.

Separation was completed by filtering through GF/C filter during centrifugation. Unfortunately, DMP complexes were adsorbed onto the filter, while DMP-MLV encapsulating [ $^{14}\text{C}$ ]inulin were similarly retained. Thus, the minicolumn centrifugation method could not be used to purify DMP-MLV.

Furthermore, the DMP complexes could not be filtered after sonication under the conditions developed in the preparation of SUV from MLV. Using [ $^{14}\text{C}$ ]inulin loaded SUV, it has been shown that these vesicles were readily filtered. It has been proved that identical empty SUV prepared according to the same conditions of sonication had a diameter of 20–40 nm (Szoka and Papahadjopoulos, 1980); the residual fraction of MLV was at least about 5%. Under our experimental conditions, 6.6% of [ $^{14}\text{C}$ ]inulin-DMP-SUV were retained on the filter. These data indicate that DMP-SUV prepared from DMP-MLV by sonication could be purified by minicolumn centrifugation using GF/C filter.

The encapsulation efficiency of DMP was measured for MLV and SUV. For MLV, the efficiency was identical when egg PC alone or egg PC/CH in a molar ratio 4:3 were used and when different DMP concentrations were encapsulated, averaging 85%. This efficiency was not real, since DMP complexes were included in the harvested liposomal fraction. Only the 4:6 MLV with DMP at 3000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  encapsulated 60%.

For SUV, the encapsulation efficiency amounted to 65% for egg PC/CH 4:3, and 75% for liposomes without cholesterol. It can be suggested that DMP molecules were partly inserted inside the bilayers, replacing cholesterol. The efficiency fell to 50% for a DMP concentration of 3000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . This decrease in DMP encapsulation at 3000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for both MLV and SUV could be attributed to a limiting concentration of

DMP in the liposomes. This concentration has been shown to be 13 mol% DMP (Fildes and Oliver, 1978).

Under our experimental conditions, this limiting concentration was calculated as being 2600  $\mu\text{g}$  per ml buffer for 14.42 mg egg PC. A lipid film containing this amount of phospholipid and 3000  $\mu\text{g}$  DMP dissolved in 1 ml buffer was beyond the limit of DMP concentration. These observations suggest that if the liposomes must be used as a DMP carrier, the corticosteroid concentration should be maintained below the saturation value of 13 mol%. Although the absence of cholesterol could improve the encapsulation of DMP, it should be borne in mind that cholesterol stabilizes the liposome structure in biological fluids.

Conformational analysis has demonstrated that, being an amphiphatic molecule, DMP inserts into a DPPC monolayer membrane with its carbonyl group oriented towards the aqueous surface, and that the aliphatic chain aligns itself parallel to the acyl chains of phospholipid. The calculation procedure (hypermatrix methods) indicates that DMP preferentially interacts with lipids rather than with itself. It seems reasonable to consider a lamellar structure wherein DMP is incorporated into an assembly of phospholipids similarly to cholesterol. This reinforces the hypothesis of cholesterol being replaced by DMP in liposomes made of phospholipids alone.

#### Acknowledgements

We wish to thank Professors E. Brachet and A. Moes for careful reading of the manuscript.

#### References

- Basworth, M.E. and Hunt, C.A., Liposome disposition in vivo. II: Dose dependency. *J. Pharm. Sci.*, 71 (1982) 100-104.
- Batra, S., Aqueous solubility of steroid hormones: an explanation for the discrepancy in the published data. *J. Pharm. Pharmacol.*, 27 (1975) 777.
- Brasseur, R., Goormaghtigh, E. and Ruyschaert, J.M., Theoretical conformational analysis of phospholipids bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 103 (1981) 301-310.
- Brasseur, R., Differentiation of lipid-associating helix by use of three dimensional molecular hydrophobicity potential calculations. *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 16120-16127.
- Chatelain, P. and Brasseur, R., A conformational analysis study of the interaction of amiodarone and cholesterol with lysophosphatidylcholine. *Biochem. Pharmacol.*, 41 (1991) 1639-1647.
- Fendler, J.H. and Romero, A., Liposomes as drug carriers. *Life Sci.*, 20 (1977) 1109-1120.
- Fidler, I.J., Raz, A., Fogler, W.E., Kirsh, R., Bugelski, K. and Poste, G., Design of liposomes to improve delivery of macrophage-augmenting agents to alveolar macrophages. *Cancer Res.*, 49 (1989) 3976-3984.
- Fildes, F.J.T. and Oliver, J.E., Interaction of cortisol-21-palmitate with liposomes examined by differential scanning calorimetry. *J. Pharm. Pharmacol.*, 30 (1978) 337-342.
- Fry, D.W., White, J.C. and Goldman, I.D., Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. *Anal. Biochem.*, 90 (1978) 809-815.
- Goodman, A. and Gilman, L.S., Adrenocortical steroids. In Goodman, A., Gilman, L.S., Rall, T.W. and Murad, F. (Eds), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan, New York, 1985, pp. 1474-1485.
- Hoff, E.V., Is your particle size analyser up to the task? Technical Bulletin, Coulter Electronics, Scientific Instruments, 1990.
- Mitsunobu, D., Toshimasa, I., Shigetoshi, S., Takashi, I. and Masatoshi, I., Physicochemical properties of dexamethasone palmitate, a high fatty acid ester of an anti-inflammatory drug: polymorphism and crystal structure. *J. Pharm. Sci.*, 78 (1989) 417-422.
- Mizushima, Y., Hamano, T. and Yokoyama, K., Tissue distribution and anti-inflammatory activity of corticosteroids incorporated in lipid emulsion. *Ann. Rheum. Dis.*, 41 (1982) 263-267.
- Shaw, I.H., Knight, C.G. and Dingle, J.T., Liposomal retention of a modified anti-inflammatory steroid. *Biochem. J.*, 158 (1976) 473-476.
- Szoka, F. and Papahadjopoulos, D., Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Bioeng.*, 9 (1980) 467-508.

## Liposome-incorporated Dexamethasone Palmitate Inhibits In-vitro Lymphocyte Response to Mitogen

H. BENAMEUR, N. LATOUR, L. SCHANDÈNE\*, J. P. VAN VOOREN†, B. FLAMION AND F. J. LEGROS \*

Laboratory of Pathophysiology, Medical School, Free University of Brussels, Campus Erasme Bldg E, 808, Route de Lennik, 1070 Brussels, \*Laboratory of Immunology Erasme Hospital, Brussels, and †Chest Department, Erasme Hospital Brussels, Belgium

### Abstract

The use of liposomes for the pulmonary delivery of corticosteroid is an area that is under active investigation. We have recently developed a novel liposomal corticosteroid preparation based on the incorporation of dexamethasone palmitate (DMP) within the bilayer of small unilamellar vesicles (SUVs) made of egg yolk phosphatidylcholine (EPC) and cholesterol; molar ratio EPC:cholesterol:DMP, 4:3:0.3.

In the present study, the biological activity of DMP-SUVs was evaluated using the lymphocyte transformation test with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and a  $\gamma$ -interferon production assay. Results showed that DMP-SUVs (but not empty SUVs) inhibited [ $^3$ H]thymidine uptake and  $\gamma$ -interferon production by concanavalin A-stimulated PBMCs by 94 and 96%, respectively, at a concentration corresponding to  $10^{-6}$  M dexamethasone. The inhibition by DMP-SUVs was found to require a 24-h pre-incubation with unstimulated PBMCs, suggesting that interaction of SUVs with lymphocytes may be altered by mitogen stimulation.

We conclude that our DMP liposomal preparation is biologically active and may be considered a promising alternative to conventional local glucocorticoid therapy.

Attempts to control the pharmacokinetics and disposition of drugs have involved a variety of drug delivery systems. Liposomes (phospholipid vesicles) in particular, when used as carriers for drugs, can be delivered to a designated body cavity where they may release their content in a sustained or controlled way, while reducing drug toxicity and side-effects (Gregoriadis 1976; Szoka & Paphadjopoulos 1980; Mayer et al 1986). Among the various categories of drugs that should benefit from liposomal entrapment are immunosuppressive anti-inflammatory agents, and especially glucocorticoids, because even when used locally, these potent effectors may produce serious systemic side-effects. Although some successful endeavours to incorporate corticosteroids into phospholipid preparations have been reported, the vast therapeutic potential for liposome-incorporated corticosteroids has been hampered by difficulties in controlling the efficiency of drug incorporation and retention (Shaw et al 1976). For instance, unesterified cortisol escapes readily from liposomes (Shaw et al 1976; Cleland et al 1982), while more lipid-soluble esters of cortisol are retained more efficiently (Shaw et al 1976; Fildes & Oliver 1978; Phillips et al 1979) and may be clinically useful (Dingle et al 1978; De Silva et al 1979; Cleland et al 1982).

Dexamethasone, the most powerful glucocorticoid, has found application either as a lipid emulsion (Mizushima et al 1982), as a multilamellar vesicle preparation for the local treatment of articular inflammation in rabbits (Bonanomi et al 1987), or as an aerosol for delivery to the lungs (Tremblay et al 1993). The latter route is particularly interesting.

because inflammatory diseases involving the respiratory tract (asthma, chronic obstructive pulmonary disease, hypersensitivity pneumonitis) are primary targets for local corticosteroid treatment, and liposomes may improve the efficiency of conventional aerosol delivery of drugs by promoting pulmonary drug retention (Schreier et al 1993). Liposomes may also direct their content to alveolar macrophages, a specific advantage for corticoid therapy (Fidler et al 1989). However, liposomal dexamethasone preparations for aerosolized delivery should be designed carefully. It is notable that in one recent study using native dexamethasone entrapped in small unilamellar vesicles (SUVs), the levels of drug incorporation varied from 57 to 75% (Tremblay et al 1993). Based on these premises we have reinvestigated the incorporation of dexamethasone in liposomes that could eventually be delivered to the lungs.

According to a recent study, retention of a fluorescent marker during aerosolization is highest for lipid vesicles containing ~30 mol% cholesterol and measuring ~0.22  $\mu$ m (Schreier et al 1993). However, we recently observed (Benameur et al 1993) that the incorporation of dexamethasone, into cholesterol-containing liposomes resulted in very low entrapment (<2%); on the other hand, esterified dexamethasone, and in particular dexamethasone-21-palmitate (DMP) was successfully encapsulated (70%). Other corticosteroid esters have also been incorporated with high efficiency (Shaw et al 1976; Cleland et al 1982; Bonanomi et al 1987; Fidler et al 1989). In our previous study we demonstrated by theoretical conformational analysis and experimental measurements that dexamethasone inserts into the bilayer of SUVs with a high efficiency. However, before proceeding to in-vivo trials, more detailed

Correspondence: H. Benameur, Laboratory of Pharmacy and Biopharmacy, Campus de La Plaine, Free University of Brussels C.P. 207, Boulevard du Triomphe, 1050 Brussels, Belgium.

information on the pharmacology of DMP-containing SUVs (DMP-SUVs) is required.

The first step in this direction is to probe the biological effects of DMP-SUVs using a standard in-vitro test. The lymphocyte transformation test was selected on account of its broad range of applications and its reliability for assessing the immunoregulatory actions of glucocorticoids (Heilmann et al 1973; Fauci & Dale 1975). Furthermore, stimulated lymphocytes secrete cytokines such as interleukins and interferons, the production of which is inhibited by glucocorticoids (Cupps & Fauci 1982). Therefore, the effects of dexamethasone and DMP-SUVs on stimulated  $\gamma$ -interferon production were also measured.

### Materials and Methods

#### Materials

Egg yolk phosphatidylcholine (EPC) was obtained from Lipoid, Germany (EPC Type I). Cholesterol and dexamethasone (9 $\alpha$ -fluoro-16 $\alpha$ -methylprednisolone) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). All these materials were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dexamethasone-21-palmitate was kindly provided by Roussel Uclaf (Romainville, France). [ $^3\text{H}$ ]-Thymidine (27 Ci mmol $^{-1}$ ) was from Amersham International (Amersham, UK) and concanavalin A was from Boehringer Mannheim, Belgium.

#### Preparation of liposomes

Liposomes were prepared as described previously (Benamer et al 1993). Briefly, 14.40 mg EPC and 5.60 mg cholesterol were mixed with 1 mg DMP in 1 mL chloroform. The thin-film method was used. Solvent was evaporated under  $\text{N}_2$  and the lipid film was hydrated with 1 mL phosphate-buffered saline (300 mOsm (kg  $\text{H}_2\text{O}$ ) $^{-1}$ ) at pH 7.4. The multilamellar vesicles (MLVs) obtained were sonicated with a sonicator probe in an ice-bath under  $\text{N}_2$  (60 W, 20 min, Soniprep 150) to form SUVs, which were purified by minicolumn centrifugation (Sephadex G50 medium). The DMP-SUVs at 4:3:0.3 molar ratio (EPC:cholesterol:DMP) were then diluted to reach a working concentration of  $\sim 10^{-5}$  M of the drug. The actual concentration varied from 0.8 to  $1.2 \times 10^{-5}$  M due to small variations in SUV recovery from the Sephadex column. The size distribution of vesicles was determined by dynamic laser-light scattering using a Malvern Zetasizer 3. The average size of SUVs and DMP-SUVs ranged between 50 and 80 nm. All liposomes (DMP-SUVs and SUVs) and free dexamethasone were sterilized by filtering through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter (Millex GH Millipore). As shown previously (Benamer et al 1993), no adsorption of radiolabelled liposomes or [ $^3\text{H}$ ]DMP on the filter was observed. When incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in plasma or PBS, DMP-SUVs were stable for at least 7 days and no hydrolysis of DMP occurred, based on the absence of radiolabelled DMP in the supernatant.

#### Turbidity measurements

The turbidity of liposome dispersion is affected by vesicle aggregation (Ohsawa et al 1985). To verify that concanavalin A did not induce liposome precipitation or agglutination, we measured the turbidity of sonicated dispersions of SUVs and DMP-SUVs at a phospholipid concentration of 15  $\mu\text{M}$

(EPC:cholesterol:DMP; 4:3:0.3), according to the method of Defrise-Quertain et al (1984). At the end of sonication, the samples were brought to  $37^{\circ}\text{C}$  and their absorbance was monitored at 550 nm against a buffer blank, using a Shimadzu spectrophotometer and 1-cm cells, before and after addition of concanavalin A or protamine.

#### Cell populations

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood of healthy volunteers. Different volunteers were used for preliminary experiments ( $n = 1$ ), dose-response relationship ( $n = 2$ ), main experiments with lymphocyte transformation testing ( $n = 6$ ), and  $\gamma$ -interferon production ( $n = 3$ ). The blood was diluted 1:1 with Hank's balanced salt solution, layered on Ficoll-Paque (sp. gr. 1.077; Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and centrifuged at 400 g for 30 min. The cell-containing interface was collected, washed three times in Hank's buffer and resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco Laboratories) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 int. units  $\text{mL}^{-1}$  penicillin, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin sulphate,  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -mercaptoethanol and 10% heat-inactivated foetal-calf serum. Cells were counted and their viability was assessed by counting the percentage of cells which excluded trypan blue.

#### Lymphocyte transformation test

PBMCs were cultured in flat-bottomed 96-well plates (Nunc) at  $37^{\circ}\text{C}$  in humidified 5%  $\text{CO}_2$ . Each well received 200  $\mu\text{L}$  cell suspension (final volume) including 20  $\mu\text{L}$  test solution (either DMP-SUVs, empty SUVs, free dexamethasone, or blank control). The number of replicates was at least 5 for each condition. In some experiments, the test solutions were added 24 h after PBMCs (final volume was still 200  $\mu\text{L}$ ). The biological activity of DMP-SUVs could not be compared with that of DMP itself, since the characteristics of DMP (octanol:water coefficient measured at pH 7.4,  $\log P = 3.6$ ) prevented its dissolution in RPMI or phosphate-buffered saline. Unstable suspensions were obtained, with DMP forming a precipitate within a few minutes in spite of sonication. Therefore, a solution of free dexamethasone was used as a positive control. The maximal final concentration of free dexamethasone, which was used in most experiments, was  $10^{-6}$  M, and the concentration of DMP-SUVs from stock solutions was adjusted to reach an equivalent molarity of  $10^{-6}$  M. This corresponds to 2  $\mu\text{g}$  liposome  $\text{mL}^{-1}$  (15  $\mu\text{M}$  EPC). The same concentration was used for empty SUVs.

Twenty-four hours after starting cell culture, concanavalin A was added to each well at a final concentration of 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . In some experiments, as mentioned above, SUVs were also added at this instant. Lymphocyte proliferation was assessed later by [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation. The conditions for maximal [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation were determined in preliminary experiments. Both the number of cells  $\text{mL}^{-1}$  (from  $10^4$  to  $10^6$ ) and the time and duration of [ $^3\text{H}$ ]thymidine addition were varied; the total period of PBMCs incubation ranged from 1 to 4 days. The best results were obtained with  $5 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , a total cell incubation time of 90 h, and [ $^3\text{H}$ ]thymidine addition 48 h after concanavalin A stimulation (i.e. 72 h after starting cell

culture). [ $^3\text{H}$ ]Thymidine was thus present for 18 h. These conditions were used throughout all experiments reported in this paper.

At the end of the 90-h incubation period, the cells were collected onto a glass fibre filter paper disk and washed three times with deionized water with a semiautomated Microcell harvester (Nunc). After drying overnight, filter disks were counted for  $\beta$ -emission in a liquid scintillation counter (Pharmacia LKB) with 10 mL Packard liquid scintillation fluid. The proliferative response of PBMCs was calculated following the method of Burford-Mason & Gyte (1979), which proposes using the molar uptake of the selected base [ $^3\text{H}$ ]thymidine by the lymphocytes as an appropriate method of expressing lymphocyte transformation rather than either crude counts  $\text{min}^{-1}$  or a stimulated index (stimulated value/unstimulated value).

#### Quantitative determination of $\gamma$ -interferon

PBMCs were cultured in tubes in supplemented RPMI medium at a concentration of  $10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Quintuplet tubes of the following four conditions were incubated for a total period of 48 h: cells without concanavalin A; cells with  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  concanavalin A (control); cells with  $10^{-6}$  M free dexamethasone and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  concanavalin A; cells with  $10^{-6}$  M DMP-SUVs (calculated as the equivalent molarity of DMP) and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  concanavalin A. The mitogen was present during the last 24 h. At the end of the incubation period the tubes were spun at 400 g for 10 min. The supernatants were collected and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use. The levels of  $\gamma$ -interferon in the supernatants were assayed by an ELISA kit (Eurogenetics, Belgium). The amount of  $\gamma$ -interferon (units  $\text{mL}^{-1}$ ) for each condition was determined from the average absorbance of all replicates and interpolated from a standard curve. A total of three experiments was performed.

#### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Statistical differences between means were assessed by Student's *t*-test; the level of significance was set at  $P = 0.05$ .

## Results

#### Preliminary experiments

The aim of the present study was to probe the biological activity of SUV-incorporated DMP, based on inhibition of lymphocyte proliferation. After determining the optimal conditions for [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation by concanavalin-stimulated PBMCs, we discovered that the time of liposome addition with respect to concanavalin A stimulation was critical. To demonstrate the antiproliferative effect of DMP-SUVs it was necessary to pre-incubate the PBMCs with drug-loaded liposomes for 24 h before adding the mitogen (Table 1). Because liposomes had to be added before concanavalin A to be effective, we reasoned that concanavalin A could induce a rapid aggregation of SUVs preventing them from interacting with PBMCs. However, this hypothesis was disproved by turbidity measurements using protamine, a recognized inducer of liposome aggregation (Fig. 1). Moreover, the size distribution of DMP-SUVs was not altered by concanavalin A addition (mean size:  $49.4 \pm 11.3$  without vs  $59.8 \pm 11.6$  with concanavalin A). In

Table 1. [ $^3\text{H}$ ]Thymidine uptake of PBMCs after stimulation by concanavalin A either simultaneously with ( $t=0$ ) or 24 h after ( $t=24$ ) addition of either no additive (control), empty SUVs,  $10^{-6}$  M DMP-SUVs, or  $10^{-6}$  M free dexamethasone.

	[ $^3\text{H}$ ]Thymidine uptake (pmol)	
	Stimulation $t_0$	Stimulation $t_{24}$
Control	$181.6 \pm 26.6$	$234.4 \pm 20.0$
SUVs	$154.3 \pm 31.3$	$204.0 \pm 30.3$
DMP-SUVs	$137.9 \pm 36.3$	$36.3 \pm 4.7$
Dexamethasone	$34.7 \pm 15.8$	$14.3 \pm 1.9$

Mean  $\pm$  s.e.m. values are given of five independent measurements.

all subsequent experiments, DMP-SUVs or free dexamethasone was added to PBMCs 24 h before concanavalin A addition. The effects of varying this period of preincubation were not explored further.

In all these experiments, DMP-SUVs were added at high concentration, corresponding to an equivalent molarity of  $10^{-6}$  M dexamethasone (see below) and to a lipid concentration of  $15 \mu\text{M}$ . Empty SUVs ( $15 \mu\text{M}$  total lipid concentration) had no effect on lymphocyte activation, even when preincubated for 24 h (Table 1). Under all conditions tested, cell viability remained  $> 90\%$  even after 3-days incubation with SUVs or DMP-SUVs.

#### Dose-response relationship

Fig. 2 displays the relative inhibition of PBMC proliferation induced by various concentrations of either free dexamethasone or DMP-SUVs. At  $10^{-7}$  and  $10^{-6}$  M, as well as at  $10^{-10}$  M, both formulations had identical effects, whereas DMP-SUVs were slightly less efficient than free dexamethasone at intermediate concentrations ( $P = 0.03$  at  $10^{-8}$  M;  $P = 0.002$  at  $10^{-9}$  M). To ensure maximal efficacy, DMP-SUVs were used at  $10^{-6}$  M in the following experiments.

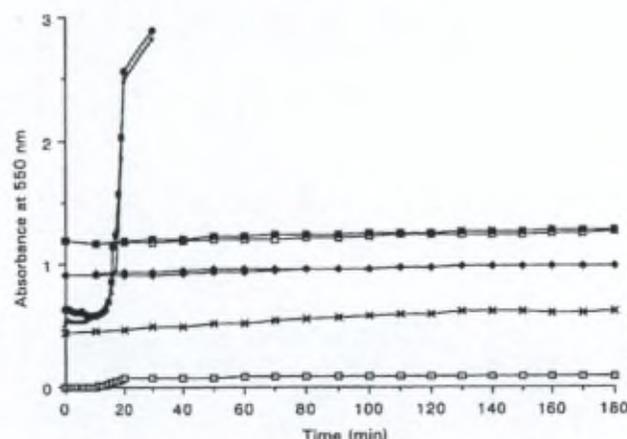


FIG. 1. Turbidity measurement of SUVs and DMP-SUVs incubated in phosphate-buffered saline at  $37^\circ\text{C}$  with or without addition of concanavalin A ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) or protamine ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) at time 0. A rise in absorbance corresponds to liposome aggregation or precipitation (Defriese-Quertain et al (1984)). Protamine, but not concanavalin A, increased absorbance at 550 nm (values remained above 3 for 180 min).  $\times$  PBS + concanavalin A;  $\square$  PBS + protamine;  $\circ$  SUV;  $\square$  DMP-SUV;  $\bullet$  SUV + concanavalin A;  $\blacksquare$  DMP-SUV + concanavalin A;  $\blacktriangle$  SUV + protamine;  $\bullet$  DMP-SUV + protamine.

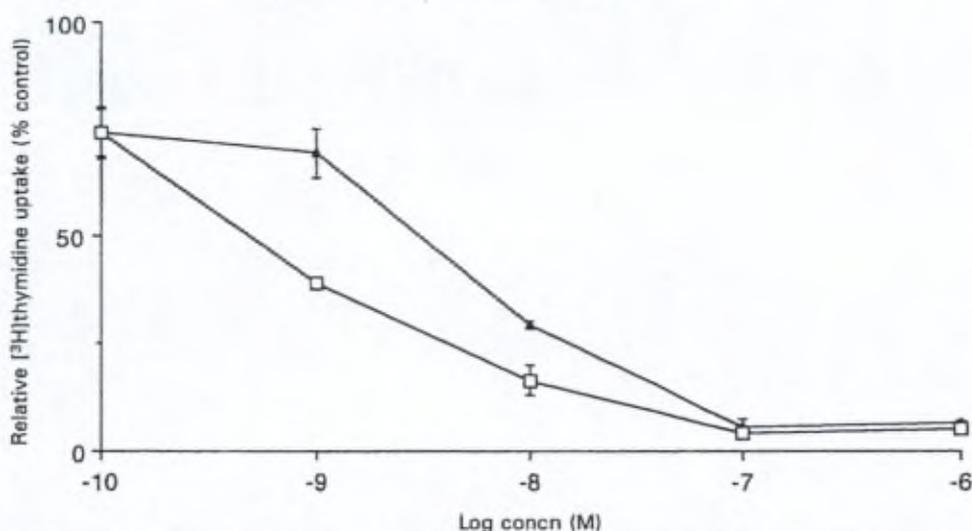


FIG. 2. Effects of dexamethasone and DMP-SUVs at different concentrations on concanavalin A-stimulated  $^3\text{H}$ thymidine uptake by PBMCs, expressed as a percentage of control values. Each point is a mean  $\pm$  s.e.m. of five independent measurements.  $\blacktriangle$  DMP-SUVs;  $\square$  dexamethasone.

#### Lymphocyte proliferation

The effects of dexamethasone and DMP-SUVs on the in-vitro proliferation of PBMCs obtained from six volunteers were tested under the conditions previously defined. The results are displayed in Tables 2, 3. Although the levels of lymphocyte proliferation varied considerably among donors, they were always greatly reduced in the presence of either dexamethasone or DMP-SUVs. There was no statistically significant difference between the anti-proliferative effects of  $10^{-6}$  M free dexamethasone and those of DMP-SUVs at the same drug concentration (percent inhibition; 94 vs 94; Table 3). Similar results were obtained with PBMCs stimulated by an antigen (*Candida albicans*; data not shown).

#### $\gamma$ -Interferon production

Table 4 shows the effects of dexamethasone and DMP-SUVs on concanavalin A-stimulated  $\gamma$ -interferon production. The addition of either  $10^{-6}$  M native dexamethasone or DMP-SUVs at the same dexamethasone concentration completely abrogated  $\gamma$ -interferon production. The percent inhibition was identical for native dexamethasone and liposomal DMP (Table 4).

#### Discussion

In the present study we have demonstrated that dexamethasone inserted as a palmitic ester into the bilayer of SUVs retained its biological activity as measured by two standard

Table 2.  $^3\text{H}$ Thymidine uptake of concanavalin A-stimulated PBMCs after addition of either no additive (control),  $10^{-6}$  M DMP-SUVs or  $10^{-6}$  M dexamethasone.

	$^3\text{H}$ Thymidine uptake (pmol)					
	A	B	C	D	E	F
Control	363 $\pm$ 27	690 $\pm$ 68	457 $\pm$ 101	1033 $\pm$ 151	585 $\pm$ 53	674 $\pm$ 52
DMP-SUVs	59 $\pm$ 7	168 $\pm$ 37	22 $\pm$ 4	34 $\pm$ 6	48 $\pm$ 5	21 $\pm$ 3
Dexamethasone	12 $\pm$ 2	46 $\pm$ 4	49 $\pm$ 21	46 $\pm$ 2	42 $\pm$ 2	35 $\pm$ 3

Mean  $\pm$  s.e.m. values are given of five independent measurements. Letters A to F represent individual healthy donors.

Table 3. Inhibition by dexamethasone and DMP-SUVs of concanavalin A-stimulated lymphocyte proliferation.

	Control	Dexamethasone	DMP-SUVs
$^3\text{H}$ Thymidine uptake (pmol)	633.81 $\pm$ 94.2	38.29 $\pm$ 5.56	36.08 $\pm$ 6.68
Inhibition (%)		94	94

All values in the table are means  $\pm$  s.e.m. of six experiments.

Table 4. Inhibition by dexamethasone and DMP-SUVs of concanavalin A-stimulated  $\gamma$ -interferon production.

	Control	Dexamethasone	DMP-SUVs	Unstimulated cells
Absolute values (units mL <sup>-1</sup> )	1.67 ± 0.53	0.07 ± 0.05	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01
Inhibition (%)		96	96	

All values in the table are means ± s.e.m. of three experiments.

in-vitro tests. As both the lymphocyte transformation and  $\gamma$ -interferon assays are complex tests which explore multiple variables related to immunoproliferation, it should be stressed that our study was not intended to probe the cellular mechanisms of action of DMP-SUVs on lymphocytes, but simply to provide evidence that dexamethasone is presented to the cells in a biologically active form. This confirmation step is crucial before proceeding to in-vivo trials of this promising formulation of a powerful immunosuppressive and anti-inflammatory agent. However, several points encountered while examining this particular form of in-vitro liposome-cell interaction deserve comment.

First, we discovered that a 24-h pre-incubation of PBMCs with liposomes was required to demonstrate the antiproliferative effects of DMP-SUVs. Conversely, if DMP-SUVs and concanavalin A were added together to the PBMC suspension, the thymidine uptake was not significantly inhibited compared with no SUV or dexamethasone-free SUV additions. A deficient methodology can be excluded, since free dexamethasone added concomitantly with concanavalin A was a very efficient inhibitor of lymphocyte proliferation under the same conditions. It follows that the effects of DMP-SUVs on PBMCs are not mediated by free dexamethasone which might have been released from liposomes. Such a mechanism would be highly improbable anyway, because the dexamethasone molecule was incorporated in the lipid bilayer as a poorly water-soluble ester and remained therein for at least 7 days when DMP-SUVs were incubated in human plasma. Therefore, the lack of inhibition with simultaneous DMP-SUV and concanavalin A additions suggests two possible explanations. The first is that concanavalin A prevented liposomes from interacting with PBMCs by inducing rapid aggregation or precipitation of the lipid vesicles. However, turbidity and size measurements were not compatible with this hypothesis, although we cannot rule out the remote possibility that concanavalin A directly interfered with SUV-cell contact, e.g. by competing for the same binding sites. The second, and more likely, explanation is that concanavalin A-stimulated PBMCs quickly became unresponsive to the effect of DMP-SUVs and remained so for the next few days despite continuous presence of the liposomes. In other words, it is likely that some kind of direct physical interaction between SUVs and lymphocytes occurred and that this interaction was modified, once blastogenesis had been initiated. This suggestion is supported by earlier observations that while phosphatidylcholine liposomes containing various amounts of cholesterol are able to modify the cholesterol content of lymphocyte membranes and hence to inhibit or enhance lymphocyte proliferation, they can only do so efficiently when added before mitogenic stimulation (Alderson & Green 1975; Chen & Keenan 1977; Ip et al 1980). Presum-

ably, the early steps of lymphocyte activation involve such extensive changes in membrane composition (Anel et al 1990) that liposome-lymphocyte interaction is greatly reduced or that DMP is no longer delivered to the host cell. In a similar regard, it should be noted that the SUVs used in the present study (molar ratio of EPC:cholesterol 4:3) should not alter the composition of the lymphocyte membrane significantly; indeed, a high concentration of dexamethasone-free SUVs had no effect whatsoever on lymphocyte activation. Further studies will be required to resolve how mitogenic stimulation modulates liposome-lymphocyte interaction.

Another relevant point is the range of concentrations over which DMP-SUVs were shown to be effective. Although an SUV concentration corresponding to  $10^{-6}$  M dexamethasone, which is supramaximal with respect to lymphocyte inhibition, was selected to demonstrate the biological activity of liposomal DMP unequivocally, the dose-response relationship established in two different experiments suggests that DMP-SUVs inhibited lymphocyte proliferation by ~25% at a calculated dexamethasone concentration as low as  $10^{-10}$  M and by 70% at  $10^{-8}$  M (see Fig. 2). Yet, based on dexamethasone availability, the liposomal formulation should be much less efficient than a similar dose of free dexamethasone because dexamethasone was esterified and incorporated in liposomes which were presented to the cells as a dispersion, and previous studies of liposome-lymphocyte interaction have concurred with the finding that the maximum uptake of untargeted liposomes by either human PBMCs (Ozato et al 1978; Weinstein et al 1978) or murine lymphocytes (Huang et al 1978) was less than 0.1% of the total number of SUVs added, even after prolonged periods. We have preliminary evidence confirming such low levels of association under our present conditions (data not shown). Therefore, the effect of DMP-SUVs would be expected to correspond to that of free dexamethasone at a concentration one-hundredth less. Although our limited number of dose-response experiments does not allow us to compare the efficiency of DMP-SUVs and free dexamethasone with confidence over such a wide range of concentrations, we nevertheless favour the idea, based on the high sensitivity of PBMCs to liposomal DMP, that DMP-SUVs provide PBMCs with the active agent moiety (either dexamethasone or the ester) in a way that improves the efficiency of the glucocorticoid, at least as measured by standard lymphocyte proliferation assays.

How this could happen is a fascinating issue. If confirmed, this observation will require careful investigation of the cellular processing of DMP-SUVs. The main mechanism may involve fusion of DMP-SUVs with lymphocytes, or adsorption of SUVs followed by DMP transfer to the lymphocyte membrane. Once inside the cell, DMP may need to be subjected to esterase action, or the esterified moiety may directly activate glucocorticoid receptors. The

DMP-SUVs that have become cell-associated represent a kind of reservoir for slow release of active compound into the cells. Although this liposome-lymphocyte interaction may have some relevance to the expected in-vivo activities of DMP-SUVs, their suggested use as aerosols for the treatment of inflammatory lung diseases should shift the primary target of investigations towards the interaction between DMP-SUVs and alveolar macrophage.

To conclude, we have demonstrated, using in-vitro bioassays, that our liposomal DMP formulation is biologically active and thus may be considered a promising alternative to conventional glucocorticoid therapy in-vivo, especially if the DMP-SUV potential for reduced toxicity, enhanced activity and perhaps prolonged time-course can be confirmed. Furthermore, the formulation of this SUV preparation makes it well suited for aerosol delivery to the lungs (Schreier et al 1993).

#### Acknowledgement

We thank Dr K. Huygen, Institut Pasteur Brussels, for the demonstration of a technique for lymphocyte culture. We are obliged to Professor H. Schreier, University of Gainesville, Florida, and Dr M. Friede, SmithKline Beecham, Belgium, for their critical comments.

#### References

- Alderson, J. C. E., Green, C. (1975) Enrichment of lymphocytes with cholesterol and its effect on lymphocyte activation. *FEBS Lett.* 52: 208-211
- Anel, R., Naval, J., Gonzelez, B., Torres, J. M., Mishal, Z., Uriel, J., Pineiro, A. (1990) Fatty acid metabolism in human lymphocytes. I. Time-course of changes in fatty acid composition and membrane fluidity during blastic transformation of peripheral blood lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1044: 323-331
- Benamer, H., De Gand, G., Brasseur, R., Van Vooren, J. P., Legros, F. J. (1993) Liposome incorporated dexamethasone palmitate: chemical and physical properties. *Int. J. Pharm.* 89: 157-167
- Bonanomi, M. H., Vevart, M., Stimpel, M., Roos, K. M., Fehr, K., Weder, H. G. (1987) Studies of pharmacokinetics and therapeutic effects of glucocorticoids entrapped in liposomes after intra-articular application in healthy rabbits and in rabbits with antigen-induced arthritis. *Rheumatol. Int.* 7: 203-212
- Burford-Mason, A. P., Gyte, G. M. L. (1979) An alternative method of expressing results of lymphocyte transformation experiments. *J. Immunol. Methods* 28: 391-394
- Chen, S. S.-H., Keenan, R. M. (1977) Effect of phosphatidylcholine liposomes on the mitogen-stimulated lymphocyte activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79: 852-858
- Cleland, L. G., Vermont Roberts, B., Garrett, R., Allen, T. M. (1982) Cortisol palmitate liposomes: enhanced anti-inflammatory effect in rats compared with free cortisol. *Agents Action* 12: 348-352
- Cupps, T. R., Fauci, A. S. (1982) Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.* 65: 133-155
- Deprise-Quertain, F., Chatelain, P., Delruelle, M., Ruyschaert, J. M. (1984) Model studies for drugs entrapment and liposome stability. In: Gregoriadis, G. (ed.) *Liposome Technology Volume III*. CRC Press Inc., pp 1-16
- De Silva, M., Hozleman, B. L., Thomas, D. P., Wraight, P. (1979) Liposomes in arthritis: a new approach. *Lancet* 8130: 1320-1322
- Dingle, J. T., Gordon, J. L., Hozleman, B. L., Knight, C. G., Page Thomas, D. P., Phillips, N. C., Shaw, I. H., Fildes, F. J. T., Oliver, J. E., Jones, G., Turner, C. H., Lowe, J. S. (1978) Novel treatment for joint inflammation. *Nature* 271: 372-373
- Fauci, A. S., Dale, D. C. (1975) The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood* 46: 235-243
- Fidler, I. J., Raz, A., Fogler, W. I., Kirsh, R., Bugelski, K., Poste, G. (1989) Design of liposomes to improve delivery of macrophage-augmenting agents to alveolar macrophages. *Cancer Res.* 49: 3976-3984
- Fildes, F. J. T., Oliver, J. E. (1978) Interaction of cortisol-21-palmitate with liposomes examined by differential scanning calorimetry. *J. Pharm. Pharmacol.* 30: 337-342
- Gregoriadis, G. (1976) The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *New Engl. J. Med.* 295: 704-710
- Heilmann, D. H., Gambrill, M., Lechner, J. P. (1973) The effect of hydrocortisone on the incorporation of tritiated thymidine by human blood lymphocytes cultured with phytohaemagglutinin and pokeweed mitogen. *Clin. Exp. Immunol.* 15: 203-212
- Huang, L., Ozato, K., Pagano, R. E. (1978) Interactions of phospholipid vesicles with murine lymphocytes. I. Vesicle-cell interactions. *J. Membr. Biochem.* 1: 27-42
- Ip, S. H. C., Abraham, J., Cooper, R. A. (1980) Enhancement of blastogenesis in cholesterol-enriched lymphocytes. *J. Immunol.* 124: 87-93
- Mayer, L. D., Bally, M. B., Hope, K. J., Cullis, P. R. (1986) Techniques for encapsulation of bioactive agents into liposomes. *Chem. Phys. Lipids* 40: 333-345
- Mizushima, Y., Hamano, T., Yokoyama, K. (1982) Tissue distribution and anti-inflammatory activity of corticosteroids incorporated in lipid emulsion. *Ann. Rheum. Dis.* 41: 263-267
- Ohsawa, T., Miura, H., Harada, K. (1985) Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposomes formed by freeze-thawing method. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 3945-3952
- Ozato, K., Kirk Ziegler, H., Henney, C. (1978) I. Transfer of antigenic determinants to lymphocyte membranes after interactions with hapten-bearing liposomes. *J. Immunol.* 121: 1376-1382
- Phillips, N. C., Thomas, D. P., Knight, C. G., Dingle, J. T. (1979) Liposome-incorporated corticosteroids. II. Therapeutic activity in experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 38: 553-557
- Schreier, H., Gonzalez-Rothi, R. J., Stecenko, A. A. (1993) Pulmonary delivery of liposomes. *J. Contr. Rel.* 24: 209-223
- Shaw, I. H., Knight, C. G., Dingle, J. T. (1976) Liposomal retention of a modified anti-inflammatory steroid. *Biochem. J.* 158: 473-476
- Szoka, F., Papahadjopoulos, D. (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467-508
- Tremblay, G. M., Therien, H. M., Rocheleau, H., Cormier, Y. (1993) Liposomal dexamethasone effectiveness in the treatment of hypersensitivity pneumonitis in mice. *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 656-661
- Weinstein, J. N., Blumenthal, R., Sharrow, S. O., Henkart, P. A. (1978) Antibody-mediated targeting of liposomes binding to lymphocytes does not ensure incorporation of vesicle contents into the cells. *Biochim. Biophys. Acta* 509: 272-288



US006217899B1

(12) **United States Patent**  
**Benameur et al.**

(10) **Patent No.:** **US 6,217,899 B1**  
(45) **Date of Patent:** **Apr. 17, 2001**

(54) **LIPOSOMES PREPARATION METHOD AND PLANT**

(75) **Inventors:** Hassan Benameur, St Priest (FR);  
Andre Moes, Ans (BE)

(73) **Assignee:** Hassan Benameur, St. Priest (FR)

(\*) **Notice:** Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) **Appl. No.:** **09/180,046**

(22) **PCT Filed:** **Aug. 14, 1996**

(86) **PCT No.:** **PCT/BE96/00086**

§ 371 Date: **Oct. 29, 1998**

§ 102(e) Date: **Oct. 29, 1998**

(87) **PCT Pub. No.:** **WO97/06784**

**PCT Pub. Date:** **Feb. 27, 1997**

**Related U.S. Application Data**

(60) **Provisional application No. 60/002,369, filed on Aug. 15, 1995.**

(51) **Int. Cl.<sup>7</sup>** ..... **A61K 9/127; A61K 9/133**

(52) **U.S. Cl.** ..... **424/450; 264/4.1; 264/4.3; 428/402.2**

(58) **Field of Search** ..... **624/450; 264/4.1, 264/4.3; 424/1.21, 9.321, 9.51, 417, 94.3; 436/829; 935/54; 428/402.2**

(56) **References Cited**

**U.S. PATENT DOCUMENTS**

4,737,323 4/1988 Martin et al. .  
5,000,887 \* 3/1991 Tenzel ..... 264/4.6  
5,185,154 2/1993 Lasic et al. .

**FOREIGN PATENT DOCUMENTS**

119 020 2/1984 (EP) .  
2135647 \* 9/1984 (GB) .  
62180742 8/1987 (JP) .  
6-246150 \* 9/1994 (JP) .  
8059503 3/1996 (JP) .  
WO 96/10393 4/1996 (WO) .

\* cited by examiner

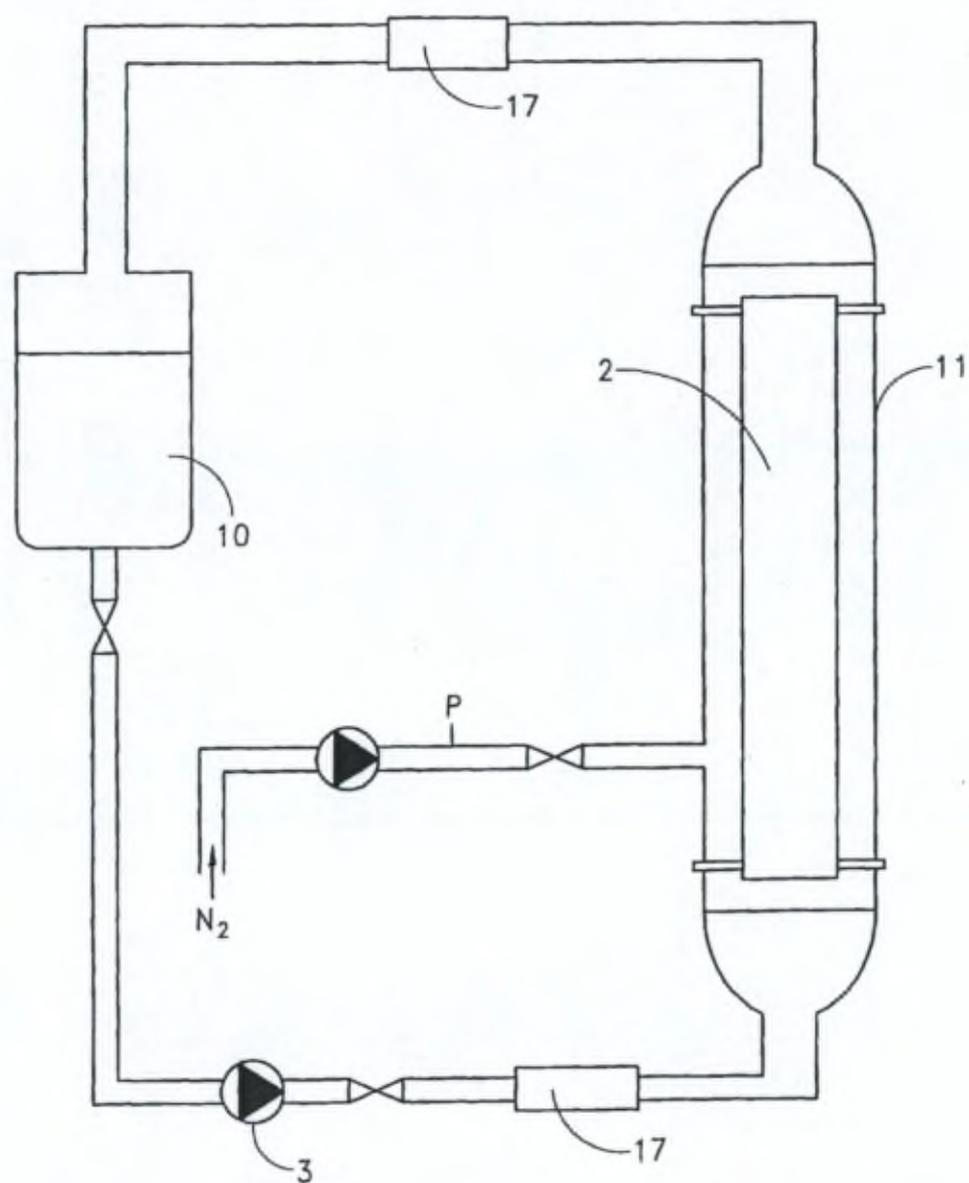
*Primary Examiner*—Gollamudi S. Kishore  
(74) *Attorney, Agent, or Firm*—Knobbe, Martens, Olson & Bear, LLP

(57) **ABSTRACT**

A process for the preparation of liposomes is described. The process includes the steps of formation of a lipid film on a ceramic filter, preferably an asymmetric ceramic filter, followed by hydration of the lipid film obtained. The liposomes thus formed are recovered. Multilamellar liposomes prepared by the process are also described.

**12 Claims, 6 Drawing Sheets**



*FIG. 2*

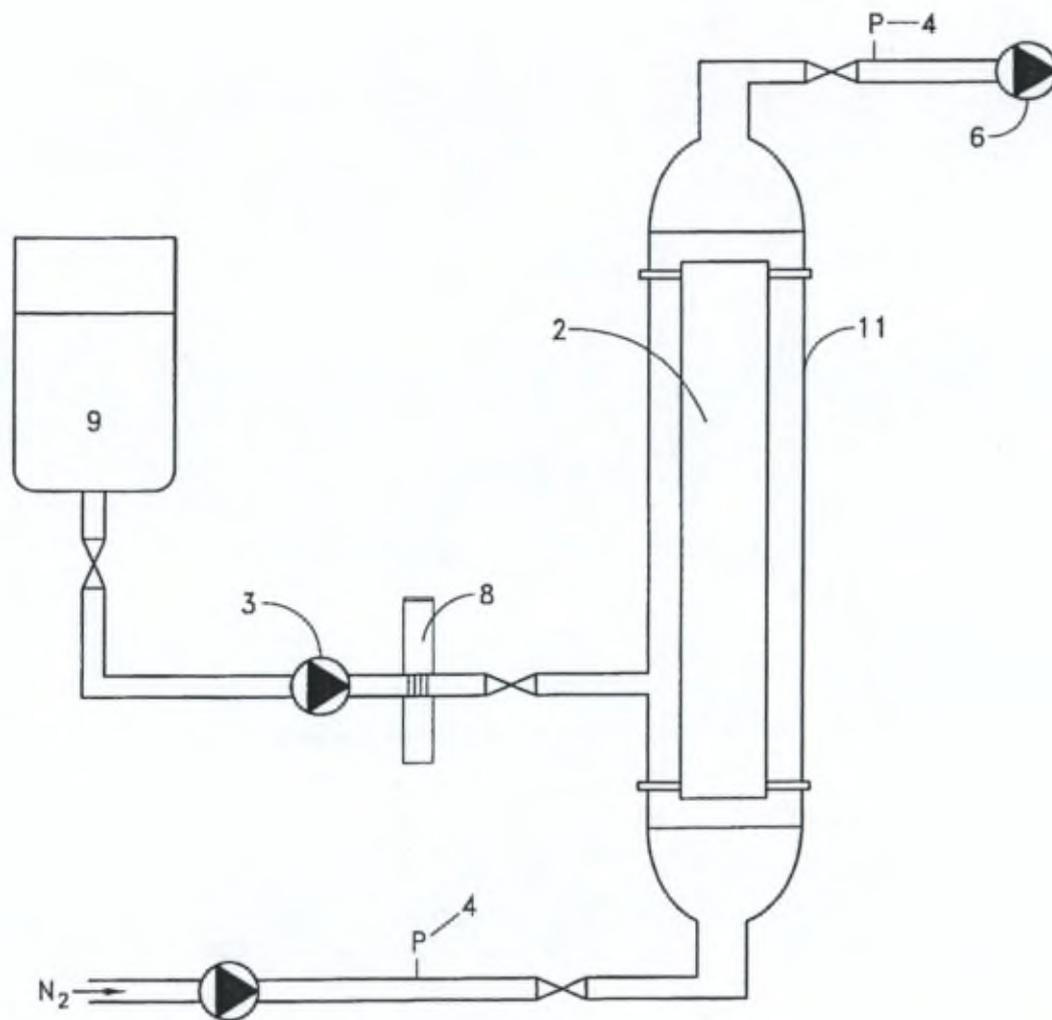


FIG. 3

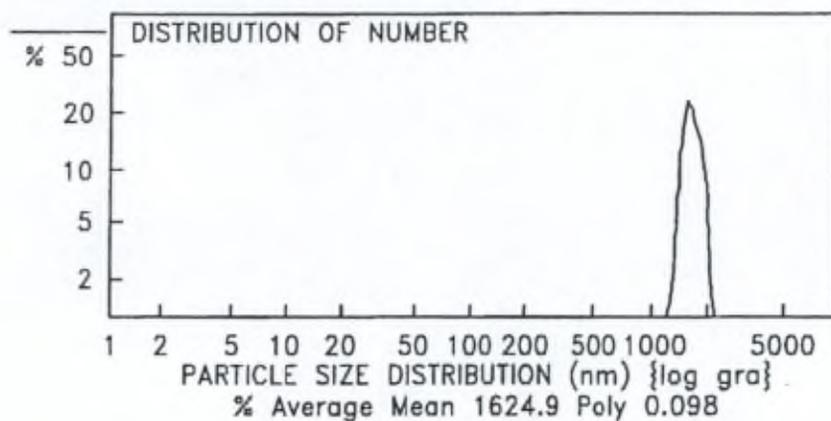


FIG. 4A

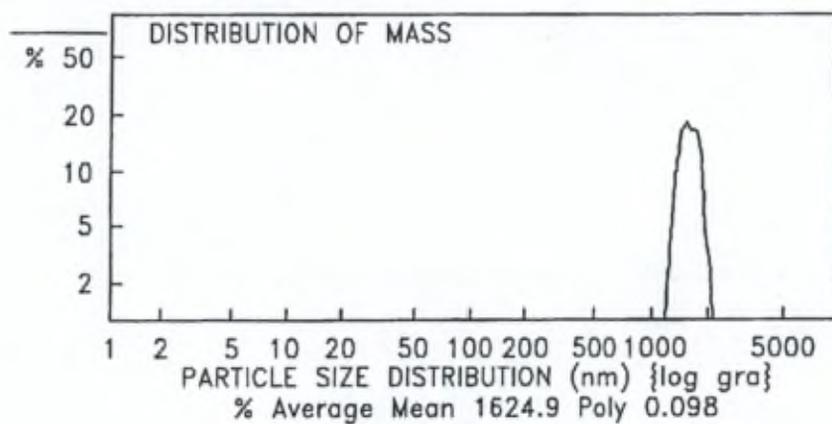


FIG. 4B

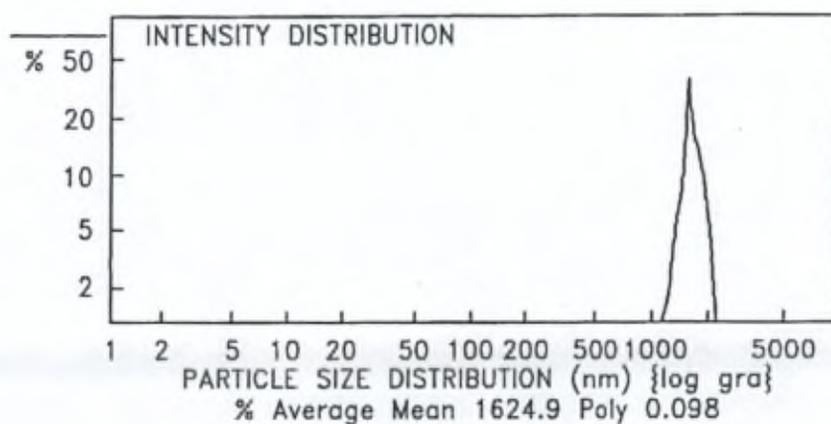


FIG. 4C

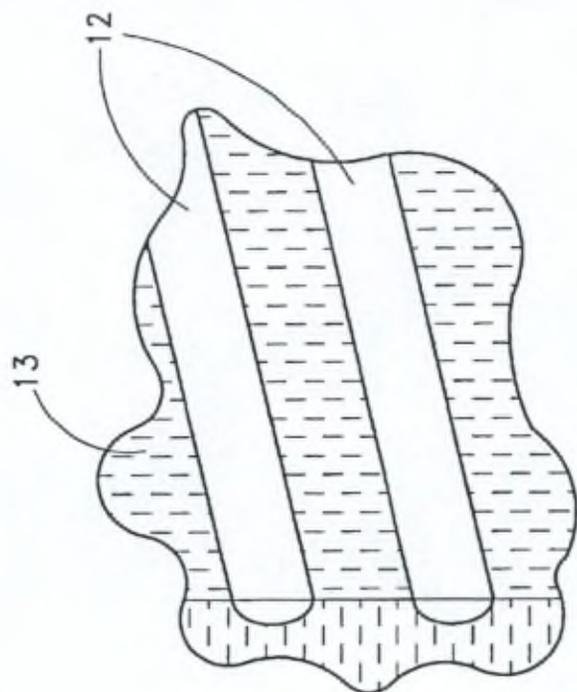


FIG. 5B

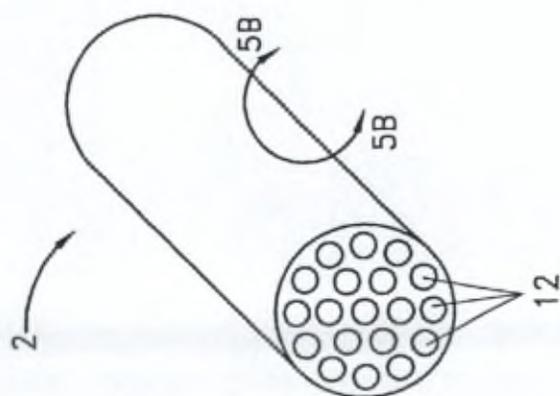


FIG. 5A

LIPOSOMES PREPARATION METHOD AND PLANT

This is the U.S. national phase under 35 U.S.C. § 371 of International Application PCT/BE96/00086, filed Aug. 14, 1996, and claims the benefit of priority under 35 U.S.C. § 119(e) from Provisional Application Ser. No. 60/002,369, filed Aug. 15, 1995.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention is related to a new liposomes preparation method and plant

The present invention concerns also the liposomes populations obtained and their use.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Liposomes are currently extensively studied as potential drugs or cosmetics carrier. A wide variety of liposomes preparations has been described and reviewed [1, 2, 6].

However, at the present time, most of the methods have not been scaled up from the laboratory level to the industrial production [3]. To ensure an optimal reproducibility of drug laden liposomes in vivo, the assessment of physico-chemical parameters (size, number of lipid bilayers, encapsulation efficiency, . . . ) characterizing the dispersion is essential.

In general, the mentioned parameters only refer to average data. But not only average values have to be considered; attention should also be paid to the homogeneity of the dispersions [3].

The preparation method in combination with the composition of the lipid mixtures and the nature of the aqueous dispersing solution decide upon morphology and homogeneity of the obtained liposome population and on their behaviour in vivo.

A well-defined preparation technique together with a fixed lipid composition and validated operating procedures are the key conditions to produce a liposome population with an acceptable reproducibility, suitable for pharmaceutical use.

STATE OF THE ART

In general, liposomes preparation includes two major steps: lipid hydration of a mixture of lipid with possibly liposoluble molecule and sizing to the desired particle size distribution. The difference between the various methods is the way in which these two steps are performed individually or how they are combined.

For convenience, these methods have been classified in three categories

mechanical dispersion methods such as hand-shaking and vortexing [2], sonication and use of a French press; detergent-solubilizing dispersion methods [22];

solvent dispersion methods such as ethanol injection [12], ether infusion [15] and reverse-phase evaporation [14].

However, all these methods suffer from one or more drawback(s) in term of suitability for bulk manufacture for pharmaceutical applications (see tables 1 and 2 below).

In addition, for the pharmaceutical production at the industrial scale, a standard procedure to obtain lipidic vesicles in a specific size range is still missing.

Especially, liposome populations of large size liposomes (diameter >0.2 μm) with narrow size distributions are particularly difficult to produce.

TABLE 1

Characteristics of the liposome preparation methods					
Methods of preparation	Structure	Diameter (μm)	Volume Encapsulated (μl/μmol lipids)	% encapsulation (%)	Ref.
10 Hydration film	MLV		0.5	1.8-8.5	[4]
			3	6	[5]
		0.05-30	4.1	5-15	[6]
		0.4-5	1.4-1.8	9-27	[7]
		1	0.2-1.5	0.1-1.0	[8]
15 Ultrasonication of MLV	SUV	0.02-0.05	0.2-1.5	0.1-1.0	[9]
French press extrusion of MLV	SUV	0.02-0.08	0.2-1.5	5-25	[10]
20 Polycarbonates membranes extrusion of MLV					
0.1 μm	SUV	0.06-1	1-3	5-30	[11]
1-0.2 μm	MLV	0.05-2	1.8-3.7	15-60	[7]
Microfluidisation	SUV	<0.1	0.7-1.0	5-78	[9]
Ethanol injection	SUV	0.03		0.5	[12]
		0.12	0.4-1.5		[13]
25 Reverse phase evaporation	LUV	0.1-1.0	7-11	30-68	[14]
Ether infusion	LUV	0.05-0.25	13-25	2	[15]
Lyophilisation/hydration	MLV	0.02-0.2		26-72	[4]
30 Freezing/thawing (SUV)	LUV	0.09		25-30	[16]
Congelation/decongelation (MLV)	MLV		2-5	31-89	[17]
Elimination of detergent	LUV	0.6		12	[18]
		0.1	2.4	12	[19]
35	SUV	0.04-0.18	1.75-2.4		[20]
		0.2-0.3	6-7.4	22	[21]
		0.037	0.47		[22]

TABLE 2

Advantages and inconveniences of the liposome preparation methods		
Preparation methods	Advantages	Inconveniences
45 Thin lipid film hydration by mechanical shaking (MLV)	Simple, rapid	Poor encapsulation efficiency Heterogeneous dispersion of MLV
50 Ultrasonic irradiation (SUV)	Small liposomes (20 nm diameter) Homogeneity	No upscaling feasibility Poor encapsulation efficiency Contamination by titane particles Production of aerosols Warming and lipid degradation can occur
55 French press extrusion	Simple, reproducible, non aggressive High concentration of lipids can be used High encapsulation efficiency Scaling-up	No upscaling feasibility Not economical Need the preparation of MLV Poor encapsulation efficiency
60 Extrusion through polycarbonate membranes	Rapid and reproducible Homogeneity High concentration of lipids High encapsulation efficiency	Need the preparation of MLV Only small volumes can be used

TABLE 2-continued

Advantages and inconveniences of the liposome preparation methods		
Preparation methods	Advantages	Inconveniences
Microfluidisation	High encapsulation efficiency Scaling-up	Need the preparation of MLV Not economical
Organic solvent replacement Ethanol injection	Homogeneity Simple, rapid Scaling-up	Poor encapsulation efficiency
Reverse phase evaporation	High encapsulation efficiency	Lipids exposed to ultrasonic and solvents Complicated technic Low solubility in the organic solvents No upscaling feasibility
Ether infusion	High encapsulation efficiency Scaling-up	Poor encapsulation efficiency Lipids exposed to high temperature and solvents Heterogeneity
Lyophilisation/rehydration	High encapsulation efficiency Simple Scaling-up Stability of the preparation	Heterogeneity Need the preparation of SUV
Freezing/thawing (MLV)	High encapsulation efficiency Rapid	Need the preparation of SUV
Freezing/thawing (SUV)	Process simple and rapid	Need the preparation of SUV Difficult to prepare in the presence of neutral phospholipids, sugar and high concentration of divalent ions
Removal of detergents	Homogeneity Smooth condition	Low encapsulation efficiency Lengthy process Difficulty to remove the detergent

TABLE 3

Particle mean diameter size (µm)	Deposit
>100	No deposit possible
>10	Nasal cavity
>5	Trachea, bronchus
>1	Alveolus
>0.1	Stable particles - low deposit
<0.1	Important deposit

Therefore, for some specific therapeutical uses, it is very important to provide a liposomes population having a very narrow size distribution. In addition, if the distribution of the liposomes population is homogeneous, it is possible to obtain a reproducible and reliable pharmaceutical composition with liposomes having a specific encapsulation efficiency of a specific active compound.

The U.S. Pat. No. 4,737,323 describes a method of producing a suspension of liposomes which have approximately an uniform size and a selected average size, said method comprising the step of providing a suspension of heterogeneous size liposomes containing a substantial proportion of liposomes having a size greater than 1.10 µm in size and the step of passing the suspension under pressure through an asymmetric ceramic filter whose inner surface pores size is greater than the desired average liposomes size. Therefore, the plant and the method according to the invention propose the use of said asymmetric ceramic filter only for the filtration of already prepared liposomes.

In addition, the above described laboratory preparation methods are difficult to adapt in order to obtain liposomes in a single vessel, in large quantities and under conditions which are adaptable to commercial production. Indeed, the liposomes are traditionally formed at the evaporation surface of balloon flasks. However, the traditional surface area of a 100 l balloon flask is around 1 m<sup>2</sup>, which could roughly increase of 20% if microglass beads are added in the flask.

In the U.S. Pat. No. 5,028,297, it has been proposed to increase said surface by providing an evaporating apparatus for conducting batch processes for the formation of an amphiphilic lipid film, and the vesiculation of the film in an aqueous phase. Said device comprises a rotor blade secured to a rotatable shaft which is disposed in a chamber where the liposomes are prepared. However, said complicated and expensive method and device do not increase enough the surface area for the production of liposomes, and does not guarantee the homogeneity of the liposomes population produced. Indeed, in all the above-described methods, it is necessary to have a further step for the calibration of the liposome population obtained. Said calibration method does comprise a filtration and/or extrusion through a membrane or a ceramic filter. Therefore, said additional step will increase the complexity of the plant and does not guarantee the sterility of the obtained product. The extrusion and/or the filtration step is also used for the purification of the obtained liposomes.

AIMS OF THE INVENTION

The present invention aims to provide a new liposomes preparation method and plant which do not present the drawbacks of those of the state of the art.

The main aim of the invention is to provide a rapid, simple, reproducible, reliable and not expensive preparation method and plant.

Another aim of the invention is to provide a preparation method and plant which allow the liposomes production at the industrial scale and may satisfy the following requirements:

At the present time, the most direct methods for producing liposomes population on a large scale are based on high-shear homogenization. The major drawback of this method is that it allows only the production of small liposomes (<0.2 µm) with a relatively narrow size distribution.

For the production of large multilamellar liposomes (>1 µm), the lipid film hydration method can be used. However, said method is difficult to scale up due to the small surfaces available to dry the thin lipid film before the hydration step, which leads to the formation of vesicles characterized by large size distributions [3].

Nowadays, no method is available for large scale production of unilamellar or oligolamellar liposomes (i.e., consisting of a few bilayers) with a narrow size distribution in the range of 0.2-1 µm.

Usually, when the thin lipid film hydration method is applied, the particles size distribution of the liposomes produced is much broader and in many cases, the liposome population is bi- or even polymodal.

However, it is known that the size of the liposome particles is essential for their therapeutical use. For instance, according to their size, particles could reach different sites in the respiratory system. The table 3 represents the different sites reached by the particles according to their size.

satisfying quality and sufficient availability of lipids and raw materials;  
 development of quality control and in process control procedures;  
 sterility;  
 apyrogenicity;  
 easy scaling up of liposomes production from the laboratory to the pilot plant, then to the industrial manufacturing process;  
 reproducibility of production process in term of size distribution, encapsulation efficiency and release pattern.

A further aim of the present invention is to provide also a liposomes population which is reproducible, reliable and which has a specific narrow sizing, preferably in the range of 0.2 to 1  $\mu\text{m}$ , which is also sterile and pyrogen-free.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention concerns a preparation method of liposomes comprising the step of a lipid film formation on a ceramic filter (may be a symmetric or asymmetric filter) An asymmetric ceramic filter means that the pores size is decreasing from the inner side of the ceramic filter to the external side. If the ceramic filter is symmetric, the pore size is not modified. The lipid film formation comprise a lipid or mixture of lipid such as phospholipids and/or cholesterol and possibly a lipophilic active ingredient.

Preferably, said preparation process comprises also the step of hydration of the lipid film obtained. Said hydration step is obtained by the use of aqueous medium (preferably, a buffer) in which hydrophilic drugs are possibly dissolved. The preparation process may also comprise a back-flushing step of an aqueous medium and recirculation of the obtained liposomes. In addition, the preparation process may also comprise a filtration and/or extrusion step which could be done upon a membrane or a ceramic filter, preferably an asymmetric ceramic filter.

The various steps of the preparation process according to the invention could be adapted by a man skilled in the art according to the various raw materials used. The lipid film formation on the ceramic filter is advantageously obtained by a mixture of lipid and possibly a lipophilic drug dissolved in an organic solvent such as dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) or a mixture of organic solvents, which will be dried onto the surface of the ceramic filter after removal of the solvent.

Preferably, said lipid solution is filtered before the step of film formation on the ceramic filter, preferably through a PTFE 0.2  $\mu\text{m}$  membrane. The other step of the preparation method will be described hereafter in detail.

The present invention concerns also a plant for the preparation of liposomes which comprises a ceramic filter, disposed in a liposomal reactor wherein the liposomes are formed. Said ceramic filter may be a symmetric or asymmetric ceramic filter.

Advantageously, said ceramic filter is an asymmetric porous ceramic rod, preferably made of a silicon carbide matrix. Said cylindrical rod comprises a plurality of main channels present into the length of the rod and microchannels disposed perpendicularly to said main channels, said microchannels having a narrow pores size. Advantageously, the pores size are comprised between 1 and 200  $\mu\text{m}$ , preferably between 8 and 100  $\mu\text{m}$ .

In the plant according to the invention, the ceramic rod is maintained in the centre of the liposomal reactor by a O-ring or by any other suitable device.

The plant according to the invention comprises also lipid and aqueous tanks connected to the liposomal reactor. The

plant according to the invention may comprise several liposomal reactors disposed in parallel and may work in a continuous or semi-continuous way.

The plant comprises also means for the back-flushing of the aqueous medium into the liposomal reactor and means to obtain recirculation of the liposomes. Said liposomes may recirculate in a recycling holding tank

A plant based upon the recirculation of the liposomes formed comprises also control means such as a flow indicator, a volumetric pump, various filters and pump units in order to control the pressure into the plant.

The present invention concerns also a liposomes population which is preferably obtained by the method according to the invention and/or by the use of the plant according to the invention.

A "liposomes population" means a dispersed distribution of liposomes of various sizes but with a specific liposomes mean diameter size and a specific standard deviation.

The liposomes population according to the invention comprises preferably a narrow mean diameter size in the range of 0.1 to 0.5  $\mu\text{m}$ , preferably from 0.2 to 1  $\mu\text{m}$  and a ratio standard deviation/average mean diameter of the liposome population which is comprised between 0.1 and 20%, preferably between 8 and 15%:

Said liposomes may comprise lipophilic and/or hydrophilic active ingredients such as pharmaceutical products, cosmetics, metallic compounds, markers for diagnostic, . . .

The present invention concerns also the Ceramic filter wherein a lipid film has been deposited and the kit comprising said ceramic filter wherein the lipid film has been deposited. Said kit is a laboratory kit which comprises a liposomal reactor with said ceramic filter ready to use.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The FIG. 1 represents a schematic view of the plant according to the invention.

The FIGS. 2 and 3 represent details of the plant according to the invention.

The FIG. 4 represent the particles size distribution of the liposomes population obtained by the method according to the invention.

The FIG. 5 represents a schematic view of the ceramic matrix used in the plant according to the invention.

#### DESCRIPTION OF THE INVENTION

The production plant 1 described in the FIG. 1 is a liposomes production plant which comprises a liposomal cross-flow reactor 11 wherein the liposomes are formed, a pump unit 3, pressure indicators 4 (inlet and outlet), a flow indicator 17 a vacuum pump 6, a PTFE pipe, and an inox filter unit 8 (0.2  $\mu\text{m}$  PTFE membrane), a lipid 9 and an aqueous 10 tanks.

The plant comprises also means 14 which are used to obtain a back-flushing an aqueous medium into the liposomal reactor 11 and means (3, 17) such as flow indicator, pumps . . . for the recirculation of the liposomes formed.

In the plant 1 according to the invention, the liposomal reactor 11 comprises an asymmetric ceramic filter 2.

The ceramic filter is preferably an asymmetric porous ceramic rod made for instance of a silicon carbide matrix and sold under the trademark  $\mu$ -kerasep<sup>®</sup> by TECH-SEP.

Said ceramic rod 2 as represented in the FIG. 5 comprises a plurality of main channels 12, present into the length of the

cylindric rod. Said rod comprises also, preferably disposed perpendicularly to the main channels, microchannels 13 with narrow pores size. The characteristics of a suitable ceramic filter rod are

length: 900 mm

diameter: 25 mm

diameter of the 19 main channels: 2.5 mm

void volume: 90 ml (30%)

pores size: 8-100  $\mu\text{m}$

The advantages of the use of said ceramic filter is the great surface area obtained, the use of an inert material having a high chemical resistance and a high mechanical strength, and which is easy to scale up by modular assembly. Preferably, the plant comprises various liposomal reactors 11 disposed in parallel.

At the laboratory scale, the capacity of the production plant 1 used is 100 ml of liposomes dispersions containing 10 mg lipids/ml.

By increasing the volume of the liposomal reactor 11, the production capacity can be easily increased up to 1-10 l. Even a scaled-up production plant for industrial batches of 100-200 l of highly concentrated liposomes can be used.

The method of liposomes production is based on the physical dispersion of lipids in aqueous media which leads to the spontaneous formation of phospholipid bilayers. This method can be divided in three steps. The first step corresponds to the classical evaporated lipid film method.

#### A. Film formation

Lipids (phospholipids, cholesterol), and possibly lipophilic drugs are solubilized in the organic solvent.

For instance, the lipid solution comprises 4 g of lipids: 3 g of Egg-Phosphatidylcholine (EPC) and 1 g of cholesterol (CH) dissolved in 50 ml of dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) in the lipid tank 9 (see FIGS. 1 and 2). This lipid solution is filtered (0.2  $\mu\text{m}$  PTFE membrane) and transferred to the liposomal reactor 11 with the help of the membrane pump unit 3.

A back pressure is applied by a filtered inert gas (e.g. nitrogen) at relatively low pressure to keep the lipids solution into microchannels 13 of the ceramic filter. This solution is dried onto the surface of the asymmetric ceramic filter 2 after removal of the solvent under reduced pressure. The drying process is carried out by evaporation of the dichloromethane in a nitrogen stream under reduced pressure.

The residual dichloromethane is removed from the dry lipid film under vacuum overnight. The excess pressure and solvent is removed by vacuum pump. This first step corresponds to the classical evaporated lipid film method.

As viscosity of the lipid solution used is low, said method does not need the use of high pressure and the energetic power used in said process is low. The plant comprises also a temperature control system.

#### B. Hydration

Hydration of the lipid film deposited on the asymmetric ceramic filter 2 is performed with an appropriate aqueous medium (buffer) in which hydrophilic drugs are possibly dissolved.

The hydration of the lipid film by the buffer forms the liposomes which are at the same time "extruded" from the ceramic filter. To control this phenomena, a pressure is maintained in the liposomal reactor. When the liposomes are formed, the buffer is removed by the decreasing said pressure.

The method may comprise also a back-flushing step and recirculation of the liposome formed. The lipids dried onto the ceramic filter 2 are dispersed by addition of the aqueous medium (red ponceau 0.1 mg/ml phosphate buffer pH 7.4) by back-flushing and recirculation. During this step, multi-

lamellar liposomes (MLV) with a narrow vesicle size distribution are formed. The ponceau red (Mw 760) was used as a water-soluble marker for liposomal entrapment studies. (1) The lipids swell and peel off from the ceramic filter 2 to form small multilamellar vesicles as shown by microscopy. These vesicles are characterized by a narrow size distribution as measured by light scattering. SMLVs with a mean diameter 1500 nm and narrow size distribution (see the FIG. 4) are produced thanks to the recirculation of the liposome dispersion through the asymmetric ceramic filter 2 which is asymmetric (pore size 8  $\mu\text{m}$  to 100  $\mu\text{m}$ ; see the FIG. 5). The operating process conditions (transmembrane pressure, cross-flow rate) are easily controlled and optimized. Five batches successfully produced are described in the FIG. 4 and in the table 4.

#### C. Extrusion and purification

Removal of unencapsulated drugs is often required when encapsulation is incomplete. Several techniques can be used for that purpose. In the present case, a liposomal purification is carried out using the tangential microfiltration mode. A new calibration of the liposomes and/or transformation of MLV into SUV can be obtained by extrusion or filtration through a modified ceramic membrane or filter of desired pore size as above described.

Analytical determinations were performed on the different final product batches. The ponceau red encapsulation level was determined by colorimetry after extraction of the lipids by the Bligh-Dyer method [1]. The phospholipid was assayed by the method of Steward [1]. The liposomal size and the vesicle size distribution were determined by laser light scattering (Malvern).

The results obtained for five batches are shown in the table 4. The mean encapsulation level of ponceau red in the small MLV is 10%. These data are in accordance with those found in the literature for the water-soluble compounds entrapped by liposomes prepared by the thin film method [1].

Lipophilic compounds, on the other hand, are encapsulated with 100% efficiency if they are not present in quantities which overwhelm the encapsulation capacity of the lipid bilayer.

Amongst the advantages of this new method of production of liposomes is the narrow size distribution of the SMLVs (mean diameter: 1500 nm) obtained and the high recovery level of lipids from the ceramic filter (90%) obtained.

TABLE 4

Analysis measurements before production							
Lot No.	EPC (mg/ml)	CH (mg/ml)	RP (mg/ml)				
94G05	30.250	11.560	0.116				
94G28	29.440	11.480	0.118				
94H02	29.600	11.650	0.100				
94H08	29.260	11.560	0.100				
94H18	10.083	3.853	0.100				
Analysis measurements after production							
Lot No.	EPC (mg/ml)	CH (mg/ml)	RP (mg/ml)	% encaps.	% encaps (mg RP/mg EPC)	% rendement	Size (nm)
94G05	27.982	N.D.	0.012	10.3	0.043	92.5	1505
94G28	24.581	N.D.	0.011	9.0	0.043	83.5	1730

TABLE 4-continued

94H02	26.890	N.D.	0.014	14.2	0.053	90.8	1400
94H08	25.487	N.D.	0.010	10.0	0.039	87.1	1206
94H18	6.400	N.D.	0.007	6.8	0.107	63.5	1720
<M>	26.235	N.D.	0.012	10.9	0.045	88.5	1512
$\sigma$	1.503	N.D.	0.002	2.3	0.006	4.0	222
CV	5.7	N.D.	15.8	21.0	12.9	4.5	14.7

## REFERENCES

- [1] New R.R.C., *Liposomes, A Practical Approach*, Rickwood D., Hames B. M., ed. New York: IRL Press, Oxford University Press (1990)
- [2] Bangham A. D. et al., *J. Mol. Biol.* 13, pp. 238-252 (1965)
- [3] Martin F. J., *Pharmaceutical manufacturing of liposomes* in Praveen Tyle ed. *Specialized Drug Delivery Systems*; Marcel Dekker; New York and Basel, pp. 267-316 (1989)
- [4] Kirby C. et al, *Biotechnology*, pp. 979-984 (1984)
- [5] Cullis P. R. et al., *Liposomes as pharmaceuticals*, in Ostro M. J., ed. *Liposomes from biophysics to therapeutics*, pp. 39-72; Marcel Dekker; New York (1987)
- [6] Lichtenberg D. te al., *Methods Biochem. Anal.* 33, pp. 337-462 (1988)
- [7] Olson F. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 557, pp. 9-23 (1979)
- [8] Mayhew E. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 775, pp. 169-174 (1984)
- [9] Szoka F. C. et al., *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, pp. 467-508 (1980)
- [10] Lekkes I., *The use of French Pressed vesicles for efficient incorporation of bi oactive macromolecules and carriers in vitro and in vivo*, in Gregoraidis G., ed. *Liposomes Technology*, pp 51-65; C.R.C. Press: BOCa Raton Florida (1984)
- [11] Hope M. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 812, pp. 55-65 (1985)
- [12] Batzri S. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 298, pp. 1015-1019 (1973)
- [13] Kremer J. M. H. et al., *Biochemistry* 16, pp. 3932-3935 (1977)
- [14] Szoka F. C. te al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, pp. 4194-4198 (1978)
- [15] Deamer D. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 448, pp. 629-634 (1976)
- [16] Bick U., *Arch. Biochim. Biophys.* 212, pp. 186-194 (1981)
- [17] Mayer L. D. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 817, pp. 193-196 (1985)
- [18] Kagawa Y. et al., *J. Biol. Chim.* 246, pp. 145-149 (1971)
- [19] Enach H. G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, pp. 145-149 (1979)
- [20] Zumbruhl O. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 640, pp. 252-262 (1981)
- [21] Nimms L. T. et al., *Biochemistry* 20, pp. 833-840 (1981)
- [22] Brunner J. et al., *Biochem. Biophys. Acta* 455, pp. 322-331 (1976)
- [23] Taslma H. et al., *Preparation Pharm. Tech. Int.*, pp. 24-33 (1992)
- What is claimed is:
1. A process for the preparation of liposomes, comprising the steps of:
    - forming a lipid film on a surface of a ceramic filter, said ceramic filter being a porous ceramic rod comprising a plurality of main channels present into the length of the rod and microchannels disposed perpendicularly to said main channels;
    - applying a back pressure by an inert gas at relatively low pressure to keep the lipid solution into microchannels of the ceramic filter;
    - drying the lipid film onto the surface of the ceramic filter;
    - hydrating the lipid film; and
    - recovering the liposomes formed during hydration in main channels of ceramic filter.
  2. The process according to claim 1, wherein the ceramic filter is an asymmetric ceramic filter.
  3. The process according to claim 1, wherein the ceramic filter is a symmetric ceramic filter.
  4. The process according to claim 1, wherein the hydration step comprises a back-flushing of an aqueous medium and recirculation of the liposomes formed.
  5. The process according to claim 1, further comprising a step of filtration and/or extrusion.
  6. The process according to claim 2, wherein the asymmetric ceramic filter is a porous silicon carbide rod.
  7. The process according to claim 6, wherein the porous silicon carbide rod comprises pores between 1 and 200  $\mu\text{m}$ .
  8. The process according to claim 6, wherein the porous silicon carbide rod comprises pores between 8 and 100  $\mu\text{m}$ .
  9. The process according to claim 5, wherein the filtration or extrusion step occurs on a membrane or asymmetric ceramic filter of the desired pore size.
  10. Liposomes produced by the method of claim 1, which comprise a MLV liposome population.
  11. A MLV liposome population according to claim 10, comprising between 80 and 99.9% of liposomes having an average mean diameter size between 0.1 and 5  $\mu\text{m}$ .
  12. The MLV liposome population produced by the method of claim 8, wherein the liposomes comprise hydrophilic and/or lipophilic active ingredients.
- \* \* \* \* \*

