

La gentamicine sous la forme liposomale : aspects technologique et microbiologique

Clement Mugabe¹, Abdelwahab Omri
Département de Chimie et de Biochimie
Université Laurentienne

La gentamicine fait partie du groupe des aminoglycosides, antibiotiques à effet bactéricide qui, après la pénétration à travers la paroi bactérienne, interfèrent avec la sous-unité 30 S des ribosomes, pour inhiber la synthèse protéique. Leur action s'exerce surtout sur les bactéries aérobies à Gram négatif ainsi que sur certains mycoplasmes et mycobactéries. L'importance des aminoglycosides se manifeste dans le traitement des infections bactériennes graves, mais leur usage est limité à cause d'effets secondaires indésirables tels que l'ototoxicité, la néphrotoxicité et la toxicité neuromusculaire². Par conséquent, plusieurs stratégies ont été développées afin de contrer ces effets secondaires néfastes. L'usage des liposomes, comme vecteurs des médicaments, est l'une de ces stratégies pour diminuer la toxicité des antibiotiques libres³.

¹ Premier prix (500 \$) de l'Acfas-Sudbury, *11^e Journée Sciences et Savoirs*, 2004, Sciences naturelles et Génie et Écoles professionnelles.

² P. Bienkowski, A. Scinska, W. Kostowski *et al.*, « Ototoxic mechanism of aminoglycoside antibiotics : role of glutaminergic NMDA receptors », *Polski Merkuriusz Lekarski*, vol. 9, 2000, p. 713–715.

³ M. Sivakumar et K. Panduranga Rao, « Preparation, characteri-

Vésicules phospholipidiques constituées d'un nombre variable de lamelles séparées les unes des autres par des compartiments aqueux⁴, les liposomes peuvent se classer, selon leur taille, dans trois catégories : les grandes vésicules unilamellaires (LUV), les vésicules multilamellaires (MLV) ainsi que les petites vésicules unilamellaires (SUV)⁵. Leur taille varie entre 20 nm jusqu'à quelques micromètres⁶. Une seule bicouche lipidique compose les SUV dont la taille moyenne se situe entre 20 et 50 nm⁷. Les LUV sont aussi composées d'une seule bicouche lipidique avec un compartiment aqueux volumineux; leur taille moyenne varie entre 200 et 1000 nm⁸. Quant aux MLV, elles comptent deux ou plusieurs bicouches lipidiques dont la taille moyenne varie entre 400 et 3500 nm⁹. La taille des liposomes est une caractéristique importante car elle a un impact sur le taux d'encapsulation (quantité des substances dans les liposomes). Reconnus pour leur pouvoir d'encapsuler plusieurs substances¹⁰, les liposomes peuvent en encapsuler

zation and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres », *Biomaterials*, vol. 23, 2002, p. 3175–3181.

⁴ M. Budai et M. Szogyi, « Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes », *Acta Pharm Hung*, vol. 71, 2001, p. 114–118.

⁵ F. Bordi, C. Cametti, T. Gili *et al.*, « Time evolution of the formation of different size cationic liposome-polyelectrolyte complexes », *Bioelectrochemistry*, vol. 59, 2003, p. 99–106.

⁶ T. Lahiri, A. Chakrabarti et A. K. Dasgupta, « Multilamellar vesicular clusters of phosphatidylcholine and their sensitivity to spectrin : a study by fractal analysis », *Journal of Structural Biology*, vol. 123, 1998, p. 179–186.

⁷ M. S. Nagarsenker et V. Y. Londhe, « Preparation and evaluation of a liposomal formulation of sodium cromoglicate », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 251, 2003, p. 49–56.

⁸ M. E. Lutsiak, G. S. Kwon et J. Samuel, « Analysis of peptide and lipopeptide content in liposomes », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, 2002, p. 279–284.

⁹ R. Wiese, « Analysis of several fluorescent detector molecules for protein microarray use », *Luminescence*, vol. 18, 2003, p. 25–30.

¹⁰ J. Zhang, D. A. Qin, B. X. Cheng *et al.*, « Preparation, characteristics and toxicity of Ricin-containing Galactosyl Ceramide liposomes », *Sheng*

trois types : les substances hydrophiles, dans les compartiments aqueux, les substances lipophiles, dans les couches lipidiques et, en dernier lieu, les substances amphiphiles, dans les deux compartiments¹¹.

Les liposomes sont des vecteurs de plusieurs substances actives comme des substances antivirales, antifongiques, antiparasitaires et immunorégulatrices. Ils sont utilisés en dermatologie, en cosmétologie et en toxicologie de même qu'en cancérologie, en ophtalmologie et en thérapie génique¹².

Plusieurs chercheurs ont tenté l'encapsulation de la gentamicine dans les liposomes; cela produit une diminution de sa toxicité et une augmentation de l'effet thérapeutique de l'antibiotique¹³. Par exemple, l'encapsulation de la gentamicine dans les liposomes provoque une augmentation de l'efficacité thérapeutique contre la *Klebsiella pneumoniae*, dans les infections pulmonaires des rats¹⁴.

L'objectif principal de cette étude consiste à développer une formulation de gentamicine sous forme liposomale avec un taux optimal d'encapsulation, une stabilité adéquate à la température corporelle et à celle de la conservation ainsi qu'une activité antibactérienne efficace.

Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao, vol. 31, 1999, p. 472–474.

¹¹ R. Agarwal, O. P. Katare et S. P. Vyas, « Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antipsoriatic drug dithranol », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 228, 2001, p. 43–52.

¹² A. Omri et M. Ravaoarino, « Les liposomes : intérêts et limites en pharmacologie dans la thérapeutique des infections bactériennes », *Canadian Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 5, 1998; M. Ravaoarino et E. Toma, « Liposomes in the treatment of infections », *Annales de médecine interne*, vol. 144, 1993, p. 182–187.

¹³ M. Budai et M. Szogyi, « Liposomes as drug carrier systems. . . »; R. M. Schiffelers, G. Storm, M. T. Kate et I. A. Bakker-Woudenberg, « Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated gentamicin in rat *Klebsiella pneumoniae* in relation to impaired host defense and low bacterial susceptibility to gentamicin », *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 45, 2001, p. 464–470.

¹⁴ R. M. Schiffelers, G. Storm, M. T. Kate et I. A. Bakker-Woudenberg, « Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated. . . ».

Méthodologie

Produits chimiques

Provenance du produit	Nom du produit
Sigma Aldrich Canada Ltd. (Oakville)	– chlorure de sodium (NaCl - Lot 107598) – dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄ - Lot 20K0229) – triton X-100 ou t-octylphénoxy polyéthoxythale (Lot 121H0382)
Praxair (Mississauga)	– azote gazeux
Northerm Lipids (Vancouver)	– cholestérol (Lot 50K5304) – distéarylphosphatidylcholine (DSPC) – 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3 -phosphocholine (DPPC) – dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) – distéaroylphosphatidylethanolamine – polyéthylène glycol (DSPE-PEG)
Analar (Toronto)	– chloroforme (Lot 112206/15770)
Fisher Scientific (Ottawa)	– gentamicine (Lot B 0706185)

Espèces bactériennes

Espèces bactériennes utilisées :

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145)
- *Escherichia coli* (ATCC 11303)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Jusqu'à leur utilisation, elles sont conservées dans le congélateur, à -80°C , dans un bouillon (Mueller-Hinton Broth) contenant 10 % de glycerol (v/v).

Préparation des liposomes

Les liposomes ont été préparés en mélangeant les lipides, le cholestérol et/ou le polymère (PEG - rapport molaire 2:1:0,2). Ce mélange est dissous dans 1 ml de chloroforme qui, en s'évaporant, forme une couche lipidique à laquelle on ajoute 3 ml d'une solution aqueuse contenant la gentamicine (0,75 mg/ml).

Nous avons préparé six types différents de liposomes, séparés en deux catégories. La première comprend des liposomes composés de lipides et de cholestérol (rapport molaire 2:1) et la seconde, des liposomes composés de lipides, de cholestérol et de polymère (DSPE-PEG) (rapport molaire 2:1:0,2).

Voici maintenant comment les liposomes composés de lipides et de cholestérol ont été préparés :

- 3,5 mg de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) ou 3,8 mg de 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholine (DPPC) et/ou 4,1 mg de distéarylphosphatidylcholine (DSPC)
- 1 mg de cholestérol dissous dans 1 ml de chloroforme dans un ballon à fond rond de 50 ml.

Le chloroforme s'évapore en plaçant, pendant 10 minutes, le ballon dans une hotte; il sera évaporé complètement quand le ballon passera sous l'azote gazeux pendant trois minutes. Une fois cette étape terminée, une couche de lipides et de cholestérol se forme au fond du ballon; on l'hydrate avec une solution aqueuse de 3 ml de gentamicine dont la concentration est de 0,75 mg/ml, pendant 30 minutes. Puis, cette solution est vortexée une minute pour favoriser la formation des liposomes. L'apparition d'une consistance laiteuse indique la formation des liposomes. Cette solution est alors soniquée avec un bain

ultrason pendant deux minutes. Les liposomes qui contiennent l'antibiotique sont maintenant formés; pour enlever la gentamicine non encapsulée, la centrifugation est nécessaire. Toute la solution liposomale est partagée dans deux tubes d'Eppendorf de 1,5 ml chacun. À une vitesse de 14 000 tours par minute, les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes, à 4 °C. Pour enlever l'antibiotique non encapsulé, on élimine le surnageant. Le culot est suspendu dans le PBS, puis centrifugé une deuxième fois dans les mêmes conditions. Le surnageant est enlevé afin de laver la gentamicine à l'extérieur des vésicules.

Les liposomes, qui sont composés de lipides, de cholestérol et de polyéthylène glycol (PEG) (rapport molaire 2:1:0,2) sont préparés de la même manière sauf que, ici, 1,4 mg de distéaroylphosphatidylethanolamine-polyéthylène glycol (DSPE-PEG) est ajouté au mélange de lipides et de cholestérol.

Le test de stérilité des liposomes

En utilisant la méthode aseptique, trois boîtes de pétris contenant la gélose (Mueller-Hinton) stérile sont préparées puis étalées par une solution de liposome, une solution de liposome détruite par le Triton X-100 et une solution du tampon (PBS). Les boîtes de pétris sont incubées à 37 °C pendant une période de 18 heures. Après la période d'incubation, la présence ou l'absence de la croissance bactérienne est déterminée.

Détermination de la taille des liposomes

Un analyseur de particules Nicomp 270 (Particle Sizing Systems, Santa Barbara), couplé à un ordinateur doté d'un programme de traitement de données, détermine la taille des liposomes.

Détermination du taux d'encapsulation

Par la technique du dosage microbiologique, et en utilisant le *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) en tant qu'organisme indicateur¹⁵, on détermine la concentration de gentamicine à l'intérieur des liposomes.

Détermination de la stabilité des liposomes

Le mélange de gentamicine liposomale est transféré dans 16 tubes d'Eppendorf étiquetés ainsi :

- 4 °C (0,25, 0,5, 1, 3, 6, 12, 24 et 48 heures)
- 37 °C (0,25, 0,5, 1, 3, 6, 12, 24 et 48 heures).

Puis, on ajoute, dans chaque tube, 150 μ l de la solution liposomale. Les tubes étiquetés 4 °C sont entreposés dans le réfrigérateur et remués, de temps à autre; ceux de 37 °C sont dans un bain-marie, et remués de façon continue. L'incubation terminée, les tubes sont centrifugés à 14 000 tours par minute, pendant 15 minutes, à 4 °C. Le surnageant et le culot sont enlevés et conservés dans le réfrigérateur. Quarante-huit heures plus tard, le dosage microbiologique permet de déterminer la stabilité des formulations de gentamicine.

L'activité antimicrobienne de gentamicine liposomale

L'activité antimicrobienne est réalisée en déterminant la concentration minimale inhibitrice des formulations de la gentamicine envers le *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), l'*Escherichia coli* (ATCC 11303) et le *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). La concentration minimale inhibitrice (MIC) a été déterminée par la technique de dilution de bouillon recommandée par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)¹⁶. En bref, voici comment on a réalisé

¹⁵ A. Omri, Z. E. Suntres et P. N. Shek, « Enhanced activity of liposomal polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of lung infection », *Biochemical Pharmacology*, vol. 64, 2002, p. 1406-1413.

¹⁶ NCCLS, « Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically », *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Approved Standard, Sixth edition, M7-A6, 2003.

une série de dilutions de gentamicine, dans un milieu de culture (Mueller Hinton Broth) :

64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 et 0,125 $\mu\text{g/ml}$.

Ensuite, 100 μl d'une solution bactérienne dont la turbidité équivalait à une solution McFarland 0,5 est ajoutée et incubée pendant 18 heures, à 37 °C. L'examen des tubes permet d'observer la croissance bactérienne. La plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe complètement la croissance visible des bactéries est définie comme la concentration minimale inhibitrice (MIC). La MIC de gentamicine, sous forme liposomale, est déterminée de la même manière, sauf que c'est par la technique du dosage microbiologique qu'on détermine la concentration de gentamicine à l'intérieur des liposomes.

Tests statistiques

En utilisant le programme d'analyse statistique *Student's t-test*, nous avons effectué des tests statistiques pour déterminer s'il existe des différences significatives entre les groupes.

Résultats

La stérilité des liposomes

Les liposomes, la solution de Triton X-100 et la solution de PBS utilisés lors de ces études sont stériles, car il n'y a pas de croissance bactérienne visible après la période d'incubation.

La taille des liposomes

La taille des liposomes est déterminée à l'aide d'un analyseur de particules Nicomp 270. Elle varie entre 408 ± 28 et 440 ± 12 nm. Il n'y a pas de différence significative entre la taille moyenne des liposomes composés de lipides et de cholestérol, et ceux qui contiennent un polymère (DSPE-PEG) à leur surface (voir le tableau 1).

Le taux d'encapsulation de gentamicine dans les liposomes

Le taux d'encapsulation est défini comme le taux de gentamicine incorporée dans les liposomes par rapport au taux

de gentamicine ajoutée initialement. Le taux d'encapsulation est exprimé en pourcentage. En général, les taux d'encapsulation obtenus sont faibles et inférieurs à 10 % (voir le tableau 1). On observe une augmentation significative ($P < 0.05$) du taux d'encapsulation lorsque les liposomes possèdent un polymère (PEG) à leur surface. Le taux d'encapsulation moyen de gentamicine dans les liposomes composés de DMPC : CHOL (rapport molaire 2:1) est de $4.00 \pm 0,33$ %, tandis que le taux d'encapsulation moyen de gentamicine dans les liposomes composés de DMPC : CHOL : DSPE-PEG (rapport molaire 2:1:0,2) est de $6,17 \pm 0,43$ %. Il y a aussi une augmentation significative ($P < 0.05$) du taux d'encapsulation de gentamicine dans les liposomes composés de DPPC : CHOL : DSPE-PEG et DMPC : CHOL : PEG, comparativement à celui des liposomes dépourvus de DSPE-PEG (voir le tableau 1).

La stabilité de la gentamicine liposomale à 4 °C et à 37 °C

La stabilité de la gentamicine liposomale a été étudiée pendant une période de 48 heures, dans un tampon à 4 °C et à 37 °C. Toutes les préparations liposomales ont retenu plus de 70 % de la gentamicine encapsulée initialement pendant une période de 48 heures, quelle que soit la température d'incubation (voir les figures 1 et 2). Par contre, les préparations liposomales conservées à 4 °C montrent une augmentation significative ($P < 0.05$) du taux de rétention moyen de la gentamicine, comparé à celui des liposomes conservés à 37 °C. Les liposomes composés de DMPC : CHOL ont retenu 84 ± 1 % de la gentamicine encapsulée à 4 °C, alors qu'à 37 °C, ils en ont retenu 76 ± 1 %. Les préparations liposomales qui contiennent un polymère à leur surface (DSPE-PEG) ont retenu plus de gentamicine pendant 48 heures, quelle que soit la température (voir les figures 1 et 2). Les liposomes composés de DSPC : CHOL ont retenu 77 ± 1 % de la gentamicine encapsulée initialement, alors que ceux composés de DSPC : CHOL : PEG en ont retenu 80 ± 1 %.

L'activité antimicrobienne de gentamicine antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des formulations de gentamicine

a été obtenue en déterminant les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (MIC) de gentamicine contre le *Pseudomonas aeruginosa*, l'*Escherichia coli* et le *Staphylococcus aureus* (voir le tableau 2). L'activité antimicrobienne de la gentamicine liposomale composée de DMPC montre une augmentation significative ($P < 0.05$) envers le *Pseudomonas aeruginosa*. La MIC de gentamicine libre envers le *P. aeruginosa* est de 4 $\mu\text{g/ml}$, tandis que celle de gentamicine liposomale composée de DMPC : CHOL est de 1 $\mu\text{g/ml}$. Les autres formulations montrent une augmentation d'activité antimicrobienne envers le *P. aeruginosa*, mais d'une façon non significative. Par ailleurs, l'activité antimicrobienne des formulations de la gentamicine reste inchangée envers l'*Escherichia coli* et le *Staphylococcus aureus*, à l'exception de la gentamicine sous forme liposomale composée de DMPC et de DPPC, où il y a une augmentation non significative de l'activité antimicrobienne envers l'*Escherichia coli* et le *Staphylococcus aureus*, respectivement (voir le tableau 2). La présence de PEG, à la surface des liposomes, n'influence pas leur activité antimicrobienne.

Interprétation des résultats

La taille des liposomes utilisés varie entre 410 et 450 nm (voir le tableau 1). Cette taille caractérise les liposomes de grandes vésicules unilamellaires (LUV). Les chercheurs qui ont utilisé la méthode de sonication, lors de la préparation des liposomes, ont obtenu les liposomes de type LUV dont la taille ressemble à celle que nous avons obtenue¹⁷. Dans leur étude, Berger et Brandl ont préparé des liposomes généralement plus petits (20–100 nm) en utilisant la méthode d'extrusion¹⁸. Cette

¹⁷ P. Lutwyche, C. Cordeiro, D. J. Wiseman *et al.*, « Intracellular delivery and antibacterial activity of gentamicin encapsulated in pH-sensitive liposomes », *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 42, 1998, p. 2511–2520.

¹⁸ N. Berger, A. Sachse, J. Bender, R. Schubert et M. Brandl, « Filter extrusion of liposomes using different devices : comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics », *International*

différence est causée par la méthode de préparation, car l'extrusion utilise une membrane de polycarbonate et une haute pression. Les liposomes obtenus ont alors une taille qui dépend du diamètre des pores de cette membrane¹⁹.

Le taux d'encapsulation obtenu de la gentamicine dans les liposomes est inférieur à 10 % (voir le tableau 1). D'autres chercheurs ont obtenu des taux d'encapsulation des aminoglycosides dans les liposomes inférieurs à 10 %²⁰. Berger et ses collaborateurs, par exemple, en ont obtenu un de 2,9 % dans les liposomes de type DPPC²¹. En utilisant les mêmes lipides, nous avons obtenu un taux d'encapsulation plus élevé (5,18 %). Nous pensons que cette différence est un effet de la concentration élevée de cholestérol. Ces chercheurs ont utilisé une quantité élevée en cholestérol, soit 81 % (concentration molaire). Normalement, lorsque la teneur en cholestérol excède 50 %, les liposomes deviennent instables²². Par ailleurs, certains ont obtenu des taux d'encapsulation d'autres aminoglycosides semblables aux nôtres en utilisant la gentamicine²³. Ils ont utilisé l'amikacine, la netilmicine et la tobramycine et leurs taux sont, respectivement, de 5,36 %, 3,0 % et 5,06 %. Leur méthode de préparation est semblable à la nôtre, à la différence que leur concentration en cholestérol est plus faible²⁴.

Journal of Pharmaceutics, vol. 223, 2001, p. 55–68.

¹⁹ *Ibid.*

²⁰ P. Lutwyche, C. Cordeiro, D. J. Wiseman *et al.*, « Intracellular delivery and antibacterial activity of gentamicin encapsulated in pH-sensitive liposomes », *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 42, 1998, p. 2511–2520.

²¹ N. Berger, A. Sachse, J. Bender, R. Schubert et M. Brandl, « Filter extrusion of liposomes using. . . »

²² Y. J. Kim, T. W. Kim, H. Chung, *et al.*, « The effects of serum on the stability and the transfection activity of the cationic lipide mulsion with various oils », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 252, 2003, p. 241–252.

²³ A. Omri et M. Ravaoarino, « Preparation, properties and effects of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulations on Gram-negative and Gram-positive bacteria », *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 7, 1996, p. 9–14.

²⁴ *Ibid.*

Nous avons observé une augmentation significative ($P \leq 0.05$) du taux d'encapsulation de gentamicine dans les liposomes qui contiennent un polymère (PEG) à leur surface, comparativement à celui des liposomes qui en sont dépourvus (voir le tableau 1). Augmentation provoquée, sans doute, par la présence de PEG à la surface des liposomes, car les liposomes qui contiennent un polymère à la surface sont moins perméables que ceux qui en sont dépourvus²⁵. Ces observations concordent avec celles d'autres recherches selon lesquelles la présence de PEG à la surface des liposomes augmente le taux d'encapsulation de l'adriamycine (un agent anticancéreux) dans des liposomes de type DPPC²⁶.

La stabilité de la gentamicine liposomale est évaluée dans un tampon à 4 °C et à 37 °C pendant 48 heures. Les liposomes restent stables, à ces températures, puisqu'ils ont retenu plus de 70 % de la gentamicine encapsulée initialement (voir les figures 1 et 2). Lorsqu'on compare la stabilité des liposomes à 4 °C et à 37 °C, on découvre que les premiers sont plus stables, car ils ont un taux de rétention de gentamicine plus élevé. Les statistiques indiquent une différence significative ($P \leq 0.05$) du taux de rétention entre les liposomes à 4 °C et ceux à 37 °C. Ces observations confirment celles d'autres groupes²⁷. Une étude sur la stabilité des liposomes de type DPPC contenant de la tobramycine montre que ces liposomes sont plus stables à 4 °C qu'à 37 °C²⁸. Par contre, les liposomes qui possèdent un polymère à leur surface (PEG) montrent une augmentation non significative de la stabilité des liposomes (voir les figures 1 et 2).

²⁵ F. Bordi, C. Cametti, T. Gili *et al.*, « Time evolution of the formation... ».

²⁶ A. Berger, J. Sachse, J. Bender, R. Schubert et M. Brandl, « Filter extrusion of liposomes using... »; M. Singh, A. J. Ferdous et T. L. Jackson, « Stealth monensin liposomes as a potentiator of adriamycin in cancer treatment », *Journal of Controlled Release*, vol. 59, 1999, p. 43–53.

²⁷ C. Beaulac, S. Sachtelli et J. Lagace, « In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against gram-negative and gram-positive bacteria », *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 41, 1998, p. 35–41.

²⁸ *Ibid.*

L'activité antimicrobienne de la gentamicine liposomale envers le *Pseudomonas aeruginosa* augmente (voir le tableau 2). Quand on compare les valeurs de la MIC des formulations liposomales avec le *P. aeruginosa*, on trouve une différence significative entre la gentamicine sous forme libre et celle sous forme liposomale composée de DMPC. Par ailleurs, d'autres recherches ont montré une augmentation des activités antibactériennes des aminoglycosides sous forme liposomale envers des bactéries intracellulaires (*Salmonella sp*, *Klebsiella pneumoniae*)²⁹. L'augmentation non significative de l'activité antibactérienne est obtenue en utilisant la gentamicine sous forme liposomale composée de DSPC et DPPC envers le *P. aeruginosa*. Ces résultats confirment ceux d'autres groupes qui ont aussi vu une augmentation non significative d'activité antibactérienne de la gentamicine sous forme liposomale de type DPPC³⁰. Par contre, l'activité antibactérienne de la gentamicine reste inchangée envers l'*E-coli* et le *S. aureus*. Les autres groupes sont arrivés aux mêmes résultats et, parfois, à une diminution de l'activité antibactérienne de la gentamicine sous forme liposomale envers des bactéries extracellulaires³¹.

Conclusion

En conclusion, la présence du polymère PEG, à la surface des liposomes, augmente le taux d'encapsulation. Les liposomes

²⁹ R. M. Schiffelers, G. Storm, M. T. Kate *et al.*, « Liposome-enabled synergistic interaction of antimicrobial agents », *Journal of Liposome Research*, 12, 2002, p. 121–127; C. Cordeiro, D. J. Wiseman, P. Lutwyche *et al.*, « Antibacterial efficacy of gentamicin encapsulated in pH-sensitive liposomes against an *in vivo* Salmonella enterica serovar typhimurium intracellular infection model », *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 44, 2000, p. 533–539; R. M. Schiffelers, G. Storm, M. T. Kate et I. A. Bakker-Woudenberg, « Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated... ».

³⁰ P. Lutwyche, C. Cordeiro, D. J. Wiseman *et al.*, « Intracellular delivery and antibacterial activity... »; C. Cordeiro, D. J. Wiseman, P. Lutwyche *et al.*, « Antibacterial efficacy of gentamicin... ».

³¹ A. Berger, J. Sachse, J. Bender, R. Schubert et M. Brandl, « Filter extrusion of liposomes using... ».

à 4 °C sont plus stables que ceux à 37 °C. En outre, la gentamicine, sous forme liposomale de type DMPC, permet une augmentation significative de l'activité antibactérienne envers le *P. aeruginosa*.

Liste des abréviations et symboles

°C :	degré Celsius
CHOL :	Cholestérol
DMPC :	Dimyristoylphosphatidylcholine
DPPC :	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPC :	Distéarylphosphatidylcholine
LUV :	Grande vésicule unilamellaire
MIC :	Concentration minimale inhibitrice
mg :	Milligramme
ml :	Millilitre
MLV :	Vésicule multilamellaire
nm :	Nanomètre
PBS :	Tampon du phosphate
PEG :	Polyéthylenglycol
SUV :	Petite vésicule unilamellaire
μl :	Microlitre

Tableau 1
 Taille et taux d'encapsulation de la gentamicine
 dans les différents types de liposomes

Composition des liposomes	Taille (nm)	Taux d'encapsulation (%)
DMPC-CHOL	410,67 ± 8,09	4,00 ± 0,33
DPPC-CHOL	418,33 ± 21,66	5,18 ± 0,35
DSPC-CHOL	408,67 ± 28,08	4,68 ± 0,26
DMPC-CHOL-PEG	425,00 ± 17,32	6,17 ± 0,43
DPPC-CHOL-PEG	437,67 ± 16,79	7,76 ± 0,22
DSPC-CHOL-PEG	440,33 ± 11,57	7,47 ± 0,82

La taille des différentes préparations de gentamicine sous forme liposomale est déterminée à l'aide d'un analyseur de particules NICOMP 270. Le taux d'encapsulation est défini comme le taux de gentamicine incorporée dans les liposomes par rapport au taux ajouté initialement. La technique du dosage microbiologique a permis de déterminer le taux d'encapsulation, en utilisant le *S. aureus* (ATCC 29213) en tant qu'organisme indicateur. En général, les taux d'encapsulation obtenus sont inférieurs à 10 %. Ces résultats indiquent la moyenne des trois expériences.

Tableau 2

Activité antimicrobienne des formulations de la gentamicine

Formulation de la gentamicine	Espèces bactériennes		
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	<i>E. coli</i> (ATCC 11303)	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)
Libre	4	4	1
DMPC-CHOL	1	2	1
DMPC-CHOL-PEG	1	2	1
DPPC-CHOL	2	4	0,5
DPPC-CHOL-PEG	2	4	0,5
DSPC-CHOL	2	4	1
DSPC-CHOL-PEG	2	2	1

Les concentrations minimales inhibitrices (MICs) des formulations de la gentamicine contre le *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), l'*Escherichia coli* (ATCC 11303) et le *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) sont déterminées par la technique de dilution de bouillon, recommandée par le NCCLS. Les bactéries sont incubées avec les différentes formulations de la gentamicine pendant 18 heures. La MIC est définie comme la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe complètement la croissance visible des bactéries et est exprimée en $\mu\text{g/ml}$.

Figure 1

Stabilité des différentes compositions de la gentamicine
sous forme liposomale 4 °C

[le graphique apparaît à la page suivante]

Les différentes préparations liposomales sont incubées dans le PBS à 4 °C. Le mélange de gentamicine liposomale est transféré dans différents tubes et entreposé dans le réfrigérateur et agité de temps à autre. Après la période d'incubation, les tubes sont prélevés et centrifugés à 14 000 tours par minute, pendant 15 min., à 4 °C. La quantité de gentamicine dans le culot et le surnageant est déterminée par la méthode microbiologique. Toutes les préparations liposomales ont retenu plus de 70 % de la gentamicine encapsulée initialement pendant 48 heures. Les résultats indiquent les moyennes des trois expériences.

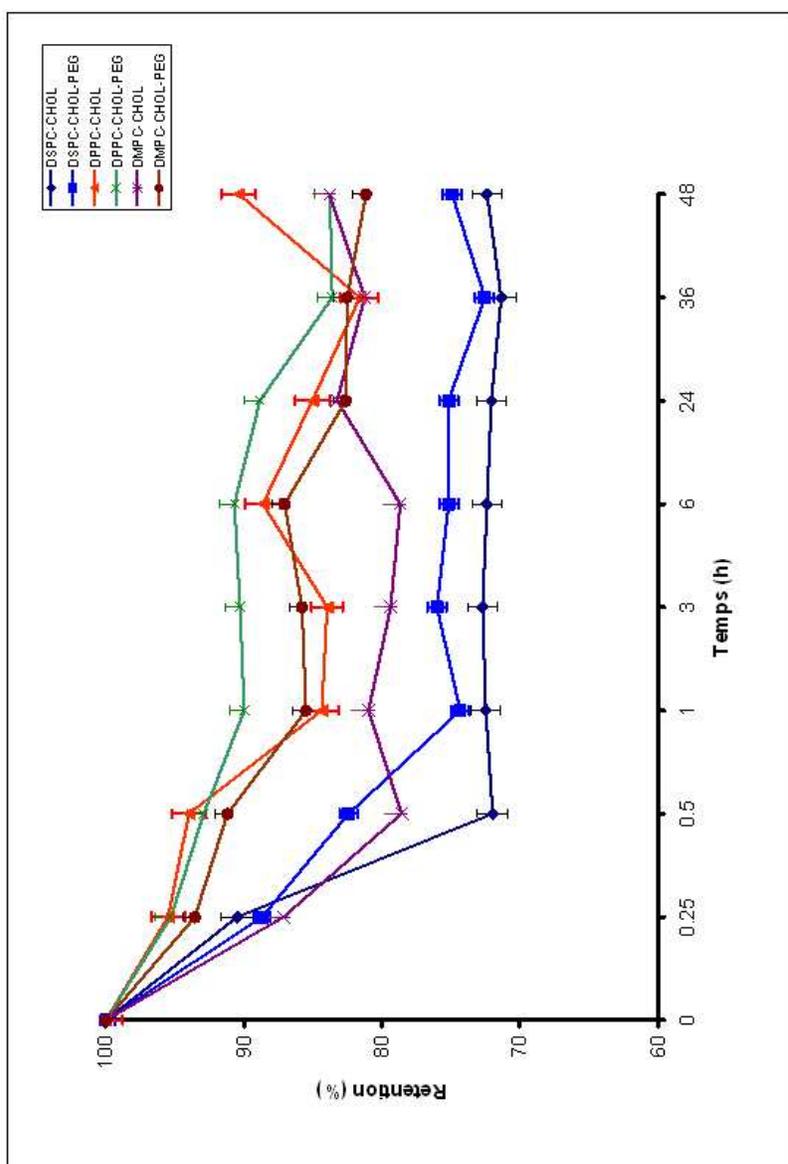


Figure 2
Stabilité des différentes compositions de gentamicine
sous forme liposomale à 37 °C

[le graphique apparaît à la page suivante]

Les différentes préparations liposomales sont incubées dans le PBS, à 37 °C. Le mélange de gentamicine liposomale est transféré dans différents tubes, placé dans le bain-marie, puis agité. Après la période d'incubation, les tubes sont prélevés et centrifugés à 14 000 tours par minute pendant 15 min., à 4 °C. La quantité de gentamicine dans le culot et le surnageant est déterminée par la méthode microbiologique. Les liposomes à 4 °C sont plus stables que ceux à 37 °C, car ils ont un taux de rétention de gentamicine plus élevé. Les statistiques montrent une différence significative ($P \leq 0.05$) du taux de rétention entre les liposomes à 4 °C et ceux à 37 °C. Les résultats indiquent les moyennes des trois expériences.

