

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE**

**PAR
ANNIE CHARETTE**

**MISE AU POINT D'UN NOUVEAU TRANSPORTEUR DE
MÉDICAMENTS DÉRIVÉ DE LA MEMBRANE DES
ÉRYTHROCYTES : LES VÉSICULES DE KOBAYASHI.**

JANVIER 2000

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

Deux approches sont envisagées pour augmenter l'index thérapeutique d'un médicament :

- Maintenir la dose thérapeutique de manière prolongée en relarguant le médicament lentement dans la circulation sanguine.
- Diriger le médicament seulement vers les cellules à traiter à l'aide d'un vecteur.

Une des solutions envisagées afin d'augmenter le ciblage et de prolonger la demi-vie de certains médicaments est leur encapsulation à l'intérieur d'un véhicule. Les liposomes furent les premiers transporteurs utilisés, mais comme ce sont des substances étrangères à l'organisme, ils sont rapidement détruits par les systèmes de défense. Afin d'éviter qu'ils ne soient détruits, les chercheurs ont développé des transporteurs constitués de la membrane ou de fragments de membranes des érythrocytes. Ainsi ont été développés les érythrosomes et les nanoérythrosomes. Bien qu'ils soient constitués de la membrane de l'érythrocyte, les érythrosomes et les nanoérythrosomes sont rapidement retirés de la circulation sanguine. La membrane qui les constitue a donc subi des dommages au cours de leur préparation.

L'objectif de notre travail est de développer un vecteur qui soit composé de la membrane des érythrocytes, mais préparé de manière plus douce que les érythroosomes ou les nanoérythroosomes. Nous nous sommes basés sur la technique de Kobayashi pour développer ce nouveau transporteur de médicaments. Les vésicules de Kobayashi se forment spontanément par bourgeonnement de la membrane des érythrocytes lors du contact entre un lipide, le DLPC, et des érythrocytes. Les vésicules ainsi formées ont un diamètre inférieur à 200nm et contiennent de l'hémoglobine. Comme les vésicules de Kobayashi sont constituées d'un fragment de l'érythrocyte et que leur méthode de préparation n'implique pas de traitement susceptible d'endommager leurs membranes, elles devraient être bien tolérées par l'organisme et demeurer longtemps dans la circulation sanguine.

Nos résultats montrent que :

- Les vésicules de Kobayashi demeurent deux fois plus longtemps que les nanoérythroosomes dans la circulation sanguine. Trente minutes après l'injection, il reste moins de 5% de la quantité de nanoérythroosomes injectée alors qu'il reste plus de 10% des vésicules de Kobayashi.

- Les vésicules de Kobayashi sont captées principalement par le foie et la rate. Cependant, les vésicules de Kobayashi sont moins rapidement détruites par ces organes. Elles sont donc mieux tolérées. Par conséquent, le mode de préparation des vésicules de Kobayashi est une méthode plus douce que celle des nanoérythrocytes, qui endommage moins leur membrane.
- Il est possible de modifier la vitesse d'élimination de la circulation sanguine ainsi que la biodistribution des vésicules de Kobayashi en changeant la composition des lipides utilisés pour induire la formation des vésicules. En effet, il reste dans la circulation 9% des vésicules induites par la laurylamine 30 minutes après l'injection, alors qu'il reste moins de 7% des vésicules induites par le DLPS. De plus, les vésicules induites par la laurylamine sont davantage captées par les reins et moins par le foie et la rate que les vésicules induites par le DLPC, le DLPG et le DLPS.

Notre étude permet d'envisager l'utilisation des vésicules de Kobayashi comme vecteur de médicament, cependant, la méthode de préparation doit être améliorée afin d'augmenter suffisamment leur demi-vie dans l'organisme et en faire un système pour relarguer les médicaments de manière lente.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii

CHAPITRE I

INTRODUCTION	1
1.1. Notions générales de pharmacocinétique.	2
1.1.1. Définition de la pharmacocinétique.....	2
1.1.2. Influence de la vitesse d'absorption d'un médicament par l'organisme.....	3
1.1.2.1. Influence de la route d'administration d'un médicament sur la vitesse d'absorption.	4
1.1.2.1.1. Voie d'administration entérale	5
1.1.2.1.2. Voie d'administration parentérale	7
1.1.2.2. Influence de la taille du médicament sur la vitesse d'absorption.	7
1.1.3. Patron de distribution des médicaments.	8
1.1.4. Facteurs affectant l'efficacité des médicaments.	9
1.1.5. Problèmes engendrés par les médicaments.....	13
1.2. Alternatives aux médicaments sous forme libre.....	14

1.2.1. Utilisation de molécules spécialisées qui sont spécifiques à une cible : les anticorps monoclonaux.....	14
1.2.2. Utilisation de transporteurs qui encapsulent un médicament.	16
1.2.2.1. Les transporteurs d'origine artificielle.....	18
1.2.2.1.1. Les microsphères ou microcapsules	18
1.2.2.1.2. Les liposomes.....	20
1.2.2.2. Les transporteurs d'origine naturelle.....	23
1.2.2.2.1. Les plaquettes.....	24
1.2.2.2.2. Les érythrocytes	24
1.2.2.2.3. Les fantômes d'érythrocytes (ghosts).....	30
1.2.2.2.4. Les nanoérythrocytes.....	32
1.2.2.2.5. Les vésicules de Kobayashi	34
1.3. Objectif général du projet de recherche.....	37
1.4. Objectifs spécifiques du projet de recherche.	38

CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	40
2.1. Préparation des lipides pour induire la formation de vésicules.	40
2.2. Préparation des vésicules de Kobayashi.	43
2.3. Purification des vésicules de Kobayashi.....	46

2.4.	Caractérisation des vésicules de Kobayashi.	47
2.4.1.	Dosage des protéines.....	47
2.4.2.	Dosage de l'acétylcholinestérase.....	48
2.5	Préparation des nanoérythrocytes.	51
2.6.	Marquage à l'iodo-GEN®.	53
2.7.	Purification des vésicules de Kobayashi ou des nanoérythrocytes.....	55
2.8.	Vérification de la pureté des vésicules de Kobayashi ou des nanoérythrocytes marqués.....	56
2.9.	Cinétique de décrochage de l'iode-125 des vésicules de Kobayashi.....	58
2.10.	Injection des préparations par voie intraveineuse.....	59
2.11.	Prélèvement des organes.....	59
2.12.	Comptage de la radioactivité dans les différents organes.....	61
2.13.	Analyse des résultats.....	62
2.13.1.	Analyse statistique des résultats.....	63
CHAPITRE III		
RÉSULTATS		66
3.1.	Mise au point de la technique de préparation des vésicules de Kobayashi pour les besoins de nos expériences.	66
3.1.1.	Optimisation du rendement.....	67

3.1.1.1. Influence de la température d'incubation sur le rendement.	68
3.1.1.2. Influence du rapport lipides/érythrocytes sur le rendement.	70
3.1.1.3. Influence du temps d'incubation entre les lipides et les érythrocytes sur le rendement.....	73
3.1.1.4. Résumé des conditions optimales pour la préparation des vésicules de Kobayashi.....	75
3.1.2. Vérification de la morphologie des vésicules de Kobayashi au microscope électronique.....	76
3.2. Marquage des vésicules de Kobayashi à l'iode-125.....	79
3.2.1. Étude de la stabilité du marquage des vésicules à l'iode-125.	80
3.2.2. Biodistribution de l'iode-125 libre injecté par voie intraveineuse. .	82
3.3. Étude de reproductibilité des résultats obtenus avec les nanoérythrocytes.	88
3.3.1. Comparaison de la cinétique de dégradation des préparations de nanoérythrocytes de Jean Désilets et moi-même.....	89
3.3.2. Biodistribution des nanoérythrocytes.....	91
3.4. Comparaison de la cinétique et de la biodistribution des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.....	93
3.4.1. Comparaison de la cinétique d'élimination des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes de la circulation sanguine.....	94
3.4.2. Comparaison des cinétiques de dégradation.....	96
3.4.3. Comparaison de la biodistribution des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.....	98

3.5. Étude pharmacocinétique des vésicules préparées avec différents lipides.	109
3.5.1. Optimisation de la méthode de préparation des vésicules-DLPG, des vésicules-DLPS et des vésicules-LA.	111
3.5.2. Observation par microscopie électronique des différentes vésicules de Kobayashi.	113
3.5.3. Comparaison de la cinétique d'élimination de la circulation sanguine des différents types de vésicules de Kobayashi.....	117
3.5.4. Comparaison de la cinétique de dégradation des 4 types de vésicules de Kobayashi.	119
3.5.5. Comparaison de la biodistribution des différents types de vésicules de Kobayashi.	121

CHAPITRE IV

DISCUSSION	133
4.1. Remarques sur la captation de l'iode-125 libre par la glande thyroïde et l'estomac.	133
4.2. Critique de la technique de marquage à l'iode-125 par l'IDO-GEN®.	137
4.3. Remarques sur le calcul du rendement.	139
4.4. Remarques sur la quantité de vésicules de Kobayashi et de nanoérythroosomes injectée.....	140
4.5. Remarques sur la cinétique de dégradation des vésicules de Kobayashi et des nanoérythroosomes.	141

4.6.	Utilisation des vésicules de Kobayashi comme système de transport de médicaments à relargage lent dans la circulation sanguine.	144
4.7.	Utilisation potentielle des vésicules de Kobayashi (vésicules-DLPC) comme système permettant le ciblage de médicaments.....	150
4.8.	Modification de la pharmacocinétique des vésicules de Kobayashi en utilisant d'autres lipides pour induire leur formation.	151
 CHAPITRE V		
CONCLUSION		154
 BIBLIOGRAPHIE		156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Liste des organes prélevés pour comptage de radioactivité.....	60
Tableau 2.	Caractéristiques des érythrocytes (10^{10} érythrocytes/mL).....	68
Tableau 3.	Dosage des protéines et de l'acétylcholinestérase pour des préparations incubées à 22°C et 37°C.....	69
Tableau 4.	Influence de la quantité de lipides sur le rendement en vésicules de Kobayashi.....	71
Tableau 5.	Détermination du temps d'incubation qui donne le meilleur rendement en vésicules.....	74
Tableau 6.	Caractéristiques des vésicules de Kobayashi préparées dans les conditions optimales.....	75
Tableau 7.	Caractéristiques du marquage des vésicules de Kobayashi.....	80
Tableau 8.	Influence du rapport molaire (DLPC :LA) sur le rendement en vésicules de Kobayashi.....	112
Tableau 9.	Synthèse des études de cinétique et de biodistribution de 5 types de vésicules.....	132

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Processus impliqués dans le transport des médicaments.....	2
Figure 2.	Cinétique plasmatique de trois médicaments qui sont absorbés à des vitesses différentes.....	3
Figure 3.	Trajet du médicament dans l'organisme selon la voie d'administration.	4
Figure 4.	Voie d'administration orale.	5
Figure 5.	Représentation des différents patrons de distribution des drogues.....	9
Figure 6.	Mécanismes d'absorption des médicaments.....	11
Figure 7.	Distribution et liaison d'un médicament aux protéines plasmatiques et tissulaires.....	13
Figure 8.	Anticorps monoclonal lié à un médicament reconnaissant sa cible sur une cellule.	15
Figure 9.	Exemple de transporteurs de médicaments qui permettent le ciblage.	16
Figure 10.	Comparaison des cinétiques de relargage d'un médicament libre et encapsulé.....	17
Figure 11.	Structure d'une microsphère et d'une microcapsule.	18
Figure 12.	Caractéristiques des liposomes.....	20
Figure 13.	Morphologie du globule rouge mature.	25
Figure 14.	Structure de la membrane du globule rouge.....	27

Figure 15. Mécanisme de formation des vésicules de Kobayashi par contact du DLPC avec les érythrocytes.....	35
Figure 16. Étapes de préparation des suspensions de lipides.....	41
Figure 17. Étapes de préparation des vésicules de Kobayashi.....	44
Figure 18. Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry.	48
Figure 19. Réaction catalysée par l'acétylcholinestérase.....	49
Figure 20. Formation du composé coloré de la réaction d'Ellman.....	49
Figure 21. Courbe étalon pour le dosage de l'acétylcholinestérase.....	50
Figure 22. Étapes de préparation des nanoérythrocytes selon Lejeune et collaborateurs.	52
Figure 23. Marquage des vésicules, et réaction de l'iode avec la tyrosine.....	54
Figure 24. Radioactivité en fonction de la distance de migration.....	57
Figure 25. Photographie de vésicules de Kobayashi prise par microscopie électronique à transmission.....	76
Figure 26. Histogramme de la répartition de la taille des vésicules de Kobayashi.....	77
Figure 27. Photographie à un plus fort grossissement des vésicules de Kobayashi.....	78
Figure 28. Cinétique de décrochage de l'iode-125 des vésicules de Kobayashi.....	81
Figure 29. Distribution tissulaire de l'iode-125 injecté par voie intraveineuse.	83

Figure 30. Activité spécifique de l'iode-125 dans les organes	85
Figure 31. Cinétique d'élimination de l'organisme de l'iode-125 libre.....	86
Figure 32. Cinétique d'excrétion de l'iode-125 libre dans l'urine.....	87
Figure 33. Comparaison des cinétiques de dégradation des nanoérythrocytes préparés par deux expérimentateurs.....	90
Figure 34. Comparaison de la biodistribution 30 minutes après injection de nanoérythrocytes préparés par deux expérimentateurs.....	92
Figure 35. Comparaison des cinétiques d'élimination sanguine.....	95
Figure 36. Comparaison des cinétiques de dégradation des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.....	97
Figure 37. Distribution tissulaire des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes, 30 minutes après injection.....	99
Figure 38. Activité spécifique dans les organes pour les vésicules de Kobayashi et les nanoérythrocytes, 30 minutes après injection.	101
Figure 39. Comparaison de l'activité spécifique en fonction du temps, dans les différents organes, des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.	104
Figure 40. Photographies des vésicules-DLPG, vésicules-DLPS et vésicules-LA prises par microscopie électronique à transmission.....	114
Figure 41. Histogramme de la taille, déterminée par microscopie électronique, des vésicules-DLPC, des vésicules-DLPG, des vésicules-DLPS et des vésicules-LA.....	116
Figure 42. Comparaison des cinétiques d'élimination sanguine des différents types de vésicules de Kobayashi.	117

Figure 43. Comparaison de la cinétique de dégradation des 4 types de vésicules de Kobayashi.....	119
Figure 44. Distribution tissulaire, 30 minutes après injection, des différentes vésicules de Kobayashi.....	122
Figure 45. Activité spécifique des vésicules retrouvée dans chaque organe, 30 minutes après injection.	124
Figure 46. Activité spécifique en fonction du temps des principaux organes, pour les différentes vésicules de Kobayashi.	127
Figure 47. Pourcentage relatif de vésicules retrouvé, en fonction du temps, dans les principaux organes, pour les différentes vésicules de Kobayashi	129

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Plusieurs agents thérapeutiques ne se dirigent pas uniquement vers les cellules à traiter, mais vont aussi s'attaquer aux cellules saines de l'organisme, ce qui entraîne des effets secondaires. Le concept de ciblage de médicaments, « drug targetting », qui a été décrit il y a près d'un siècle, consiste à utiliser des transporteurs qui vont diriger les médicaments seulement vers les cellules cibles et ainsi diminuer les effets secondaires.

Les vésicules de Kobayashi sont de petites vésicules qui se forment par bourgeonnement des érythrocytes soumis à certains traitements. Ces vésicules sont donc formées de la membrane des globules rouges, contiennent de l'hémoglobine et, par conséquent, ces vésicules devraient être bien tolérées par l'organisme.

Notre travail se veut une étude pharmacologique préliminaire pour voir s'il est possible d'utiliser les vésicules de Kobayashi comme transporteurs de médicaments.

Ce premier chapitre traite d'abord de généralités concernant la pharmacocinétique. Puis, nous présenterons les divers vecteurs utilisés pour le transport des médicaments. Finalement, nous définirons les objectifs de ce projet de maîtrise.

1.1. Notions générales de pharmacocinétique.

1.1.1. Définition de la pharmacocinétique.

La pharmacocinétique est l'étude de ce qui arrive à un médicament entre son entrée et sa sortie de l'organisme : absorption, distribution, dégradation et élimination (Ritschel, 1976).

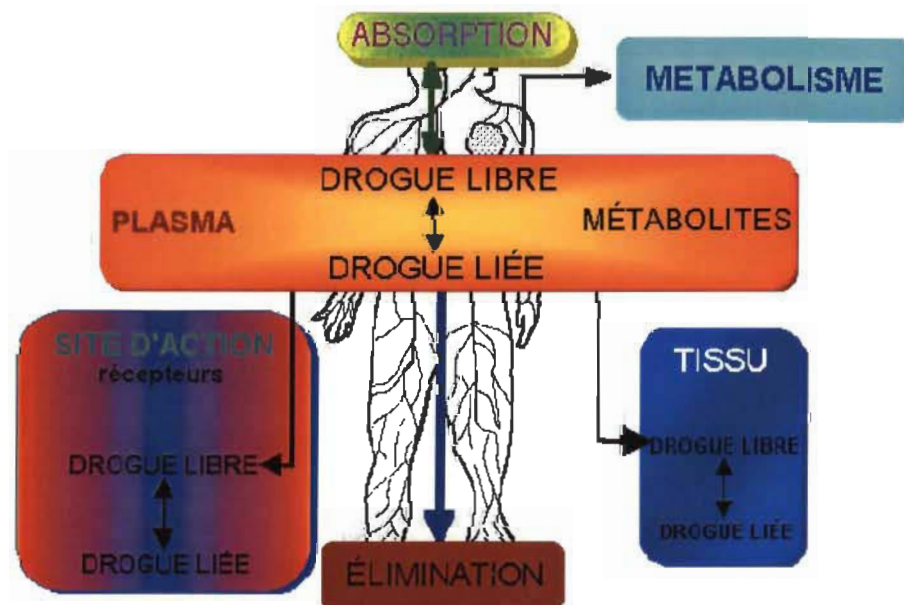


Figure 1. Processus impliqués dans le transport des médicaments.
(Tiré de Bourne, 1995-1999)

1.1.2. Influence de la vitesse d'absorption d'un médicament par l'organisme.

La figure 2 représente, de façon théorique, la concentration plasmatique de trois médicaments qui ont des vitesses d'absorption différentes (Bourne, 1995-1999). La courbe A correspond à une situation où la limite supérieure de la zone thérapeutique est dépassée; le médicament est alors toxique. Lorsque la dose est trop forte ou lorsque l'absorption est trop rapide, la limite maximale tolérable est atteinte et les effets secondaires apparaissent.

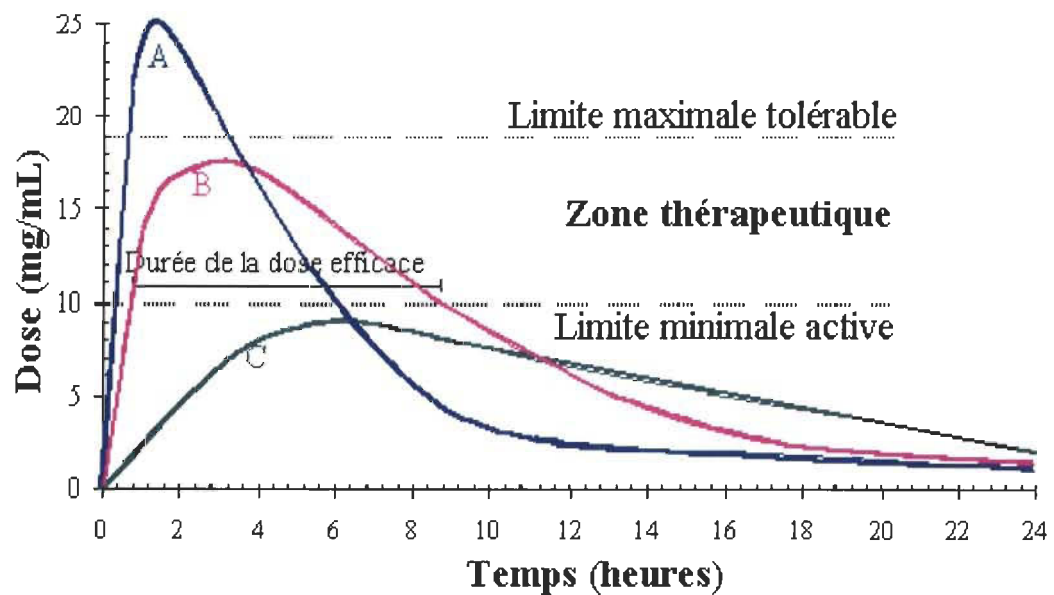


Figure 2. Cinétique plasmatique de trois médicaments qui sont absorbés à des vitesses différentes.

(Reproduit à partir de Bourne, 1995-1999)

Le médicament est efficace s'il atteint la limite inférieure de la zone thérapeutique (limite minimale active), il devient toxique s'il dépasse la limite maximale de la zone thérapeutique (limite maximale tolérable). Il est donc efficace uniquement si sa concentration plasmatique se situe entre ces deux limites, définie comme étant la zone thérapeutique.

La courbe B est l'exemple où le seuil thérapeutique est rapidement franchi. La limite maximale tolérable n'est jamais atteinte et la dose est maintenue dans la zone thérapeutique durant un intervalle suffisamment long. La courbe C représente le cas où la dose injectée est trop faible et la zone thérapeutique n'est jamais atteinte. La courbe C représente l'exemple où il y a échec du traitement.

1.1.2.1. Influence de la voie d'administration d'un médicament sur la vitesse d'absorption.

La biodisponibilité est un des paramètres de la pharmacocinétique qui mesure la quantité de médicament, toujours actif, qui atteint la circulation générale (Shargel & Yu, 1985).

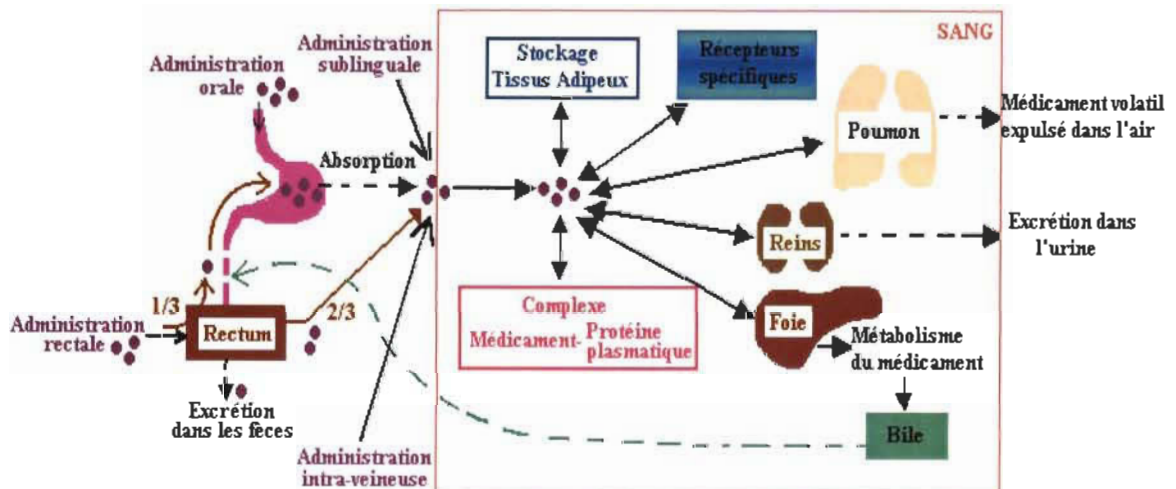


Figure 3. Trajet du médicament dans l'organisme selon la voie d'administration.

(Tiré de Bourne, 1995-1999)

La voie d'administration de la drogue a une influence sur sa biodisponibilité (Bourne, 1995-1999). Les deux principales voies d'administration sont l'administration entérale, c'est-à-dire toutes les voies qui ont un rapport avec le tractus gastro-intestinal et l'administration parentérale, c'est-à-dire par injection. Chacune de ces voies a ses avantages et ses inconvénients. Commençons par la voie entérale, qui se divise en trois catégories : l'administration orale, sublinguale et rectale.

1.1.2.1.1. Voie d'administration entérale.

L'administration orale a comme principal avantage que le médicament est facile à prendre. Le principal désavantage est que le médicament peut être inefficace dû à une faible absorption. De plus, le médicament ingéré par voie orale peut être dégradé par l'acidité de l'estomac, ou encore il peut être métabolisé par le foie.

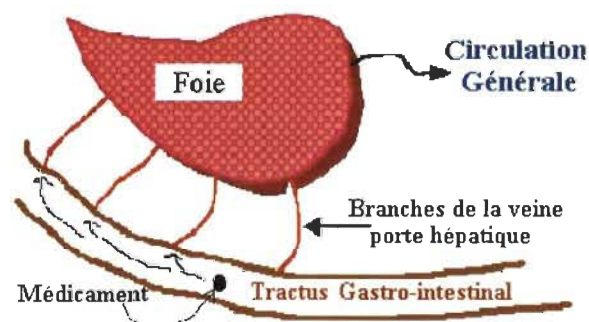


Figure 4. Voie d'administration orale.
(Tiré de Bourne, 1995-1999)

L'administration sublinguale a pour principal avantage que la drogue est absorbée très rapidement, sans passer ni par l'estomac ni par le foie, et dans un environnement où le pH est neutre. Le risque de modification de la drogue est donc plus faible. Le désavantage d'une telle administration est qu'il n'est pas toujours facile de dissoudre le médicament dans la bouche, surtout pour les enfants. Si une partie est avalée, elle suivra la voie orale et pourra être dégradée.

Les agents thérapeutiques administrés par voie rectale sont mieux connus sous le nom de suppositoires. Ils sont très utilisés pour donner des médicaments à de jeunes enfants ou à des personnes qui ne peuvent prendre de médicaments par la bouche. Les suppositoires sont utilisés pour produire soit un effet local, soit un effet systémique. En effet, le rectum possède un environnement vasculaire et lymphatique très riche. On estime que les 2/3 d'une dose rectale sont réabsorbés directement dans la circulation via les veines hémorroïdales inférieures et médianes, ce qui shunte la circulation portale et évite le passage par le foie. Le principal désavantage est que l'absorption est irrégulière et parfois incomplète. De plus, l'administration rectale n'est pas toujours bien acceptée par le patient.

1.1.2.1.2. Voie d'administration parentérale.

L'administration parentérale se divise en trois catégories, les injections musculaires, intraveineuses et sous-cutanées. L'administration intraveineuse est la plus répandue. Les principaux avantages de la voie intraveineuse sont : une réponse rapide, la dose est administrée totalement et on peut maintenir la dose thérapeutique durant un temps prolongé en injectant de manière continue. De plus, les veines sont en général peu sensibles aux médicaments, il n'y a donc pas d'irritation. Cependant, il peut parfois être difficile de trouver une bonne veine et l'injection requiert un personnel entraîné.

1.1.2.2. Influence de la taille du médicament sur la vitesse d'absorption.

La taille des particules de médicament est un facteur très important qui influence la vitesse d'absorption surtout pour les molécules qui ont une faible solubilité dans les liquides biologiques, tels les fluides intestinaux et gastriques (Ritschel, 1976). En diminuant la taille de la particule, la surface de contact avec les fluides biologiques augmente, la vitesse de dissolution augmente et par conséquent, la vitesse d'absorption augmente. De façon générale, plus la particule est fine, plus l'absorption est rapide. Cependant, si la taille est trop faible, il y a possibilité que les particules s'unissent entre elles

et forment des agrégats qui sont moins facilement absorbés. Par conséquent, la diminution de la taille des particules n'est pas la solution ultime à tous les problèmes de dissolution et d'absorption de médicament.

1.1.3. Patron de distribution des médicaments.

La distribution peut se faire selon quatre patrons (Bourne, 1995-1999). Le premier patron est le cas où la drogue demeure en majorité dans le système circulatoire. Des substituts plasmatiques, par exemple le dextran, sont des exemples de ce type. Des drogues qui sont fortement liées à des protéines plasmatiques peuvent aussi suivre ce patron. Le deuxième patron est celui des drogues qui se distribuent uniformément dans les compartiments aqueux de l'organisme, par exemple l'éthanol. Le troisième patron est le cas où les drogues se concentrent spécifiquement dans un ou plusieurs tissus qui sont ou ne sont pas le site d'action. Un exemple de composé qui suit ce patron est l'iode. L'iode lorsqu'il est injecté dans la circulation se dirige presque exclusivement vers la thyroïde. Le quatrième patron de distribution est une distribution non uniforme du médicament qui dépend de plusieurs facteurs. C'est la combinaison des trois premiers cas. Dans la plupart des cas, la plus

grande concentration du médicament se retrouve dans les reins, les intestins et le foie. Les intestins et les reins accumulent habituellement ce qui est excrété.

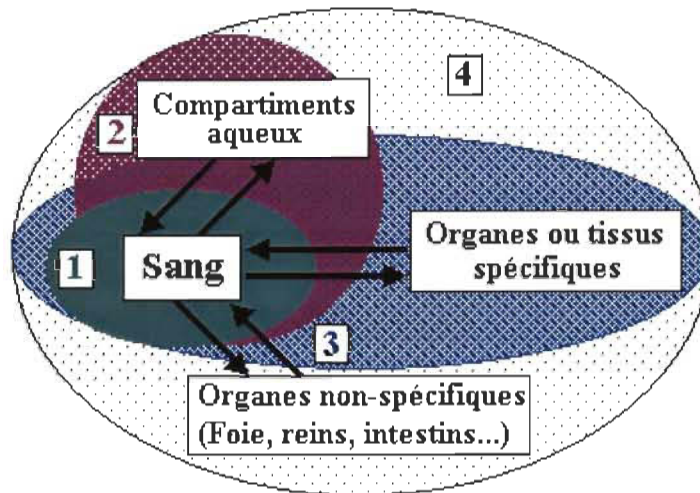


Figure 5. Représentation des différents patrons de distribution des drogues.

(Tiré de Bourne, 1995-1999)

1. Cas où la drogue demeure en majorité dans le système circulatoire.
2. Cas où la drogue se distribue uniformément dans les compartiments aqueux.
3. Cas où la drogue se concentre dans un ou plusieurs tissus.
4. Cas où la distribution n'est pas uniforme. C'est la combinaison des 3 premiers cas.

1.1.4. Facteurs affectant l'efficacité des médicaments.

Le premier facteur qui affecte l'efficacité d'un médicament est la vitesse à laquelle il se disperse dans l'organisme (Bourne, 1995-1999). La vitesse de dispersion dépend de deux facteurs : la perméabilité membranaire et la vitesse de perfusion sanguine. Comme la membrane est composée d'une bicouche lipidique, les composés liposolubles passent rapidement, alors que les

substances hydrosolubles traversent la membrane moins rapidement et à une vitesse qui dépend surtout de leur poids moléculaire. En général, les drogues de faibles poids moléculaires diffusent simplement à travers la membrane alors que les composés dont le poids moléculaire est plus élevé (plus de 100 Daltons) sont transférés par des transporteurs membranaires qui contrôlent la vitesse de passage de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. En ce qui concerne les drogues ionisables, leur pK , ainsi que le pH du milieu, auront une influence sur la vitesse de passage à travers la membrane.

La vitesse de perfusion sanguine influe aussi sur la vitesse de dispersion du médicament. La vitesse de perfusion sanguine est la vitesse à laquelle le sang circule vers les divers organes. Cette vitesse varie d'un organe à l'autre. Les organes où la perfusion sanguine est la plus rapide sont les reins, le foie, le cœur et le cerveau (Shargel & Yu, 1985).

Les mécanismes d'absorption des médicaments sont la diffusion passive, la diffusion facilitée, le transport actif, le transport couplé (une molécule est transportée grâce au passage symport ou antiport d'un ion) et la pinocytose. Ces 5 mécanismes sont représentés à la figure 6.

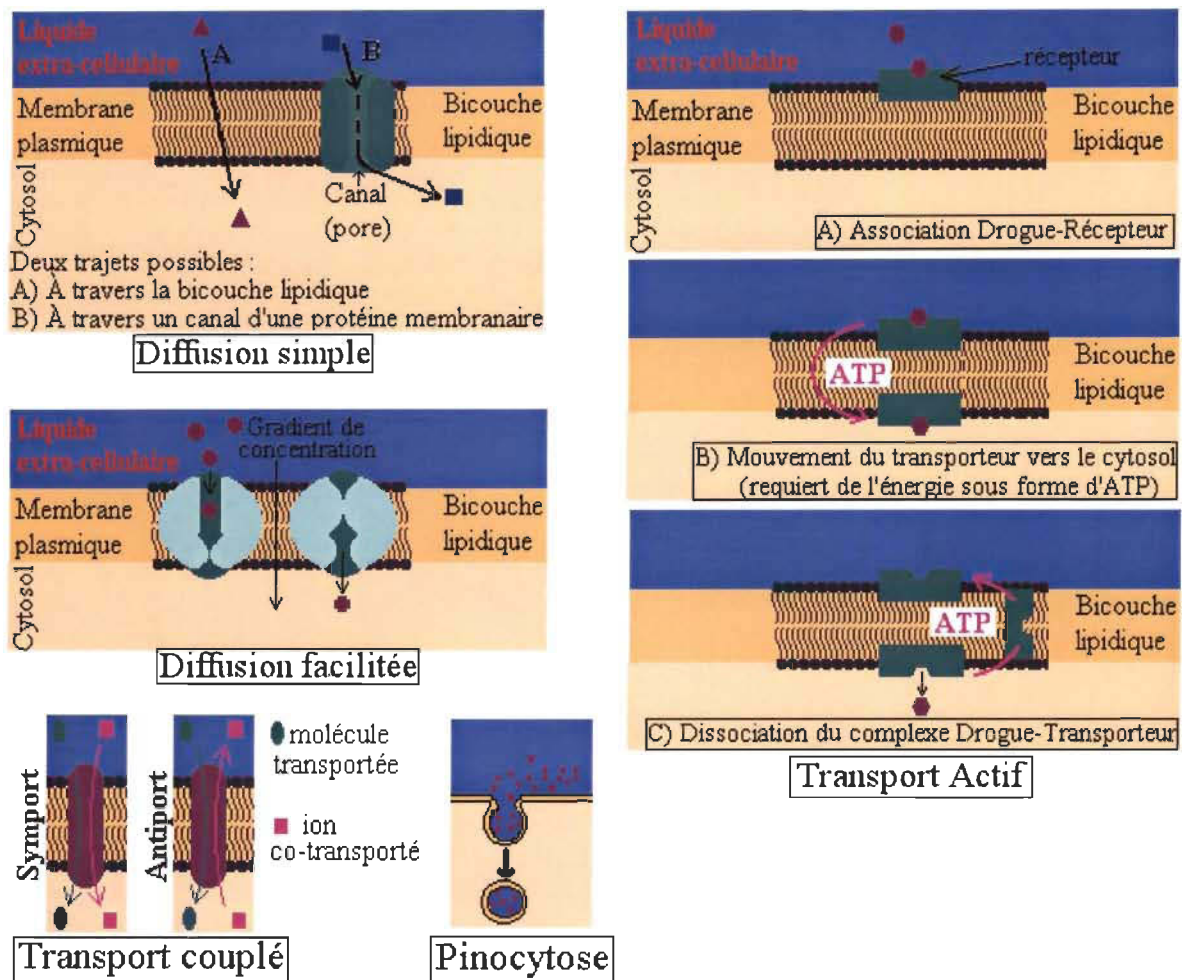


Figure 6. Mécanismes d'absorption des médicaments.
(Reproduit de Tortora & Grabowski, 1994)

Le deuxième facteur qui affecte l'efficacité d'un médicament est l'étendue de sa distribution, c'est-à-dire la dispersion du médicament dans l'organisme, qui dépend de trois éléments :

→ Le premier élément qui peut affecter l'étendue de la distribution d'un médicament est la liaison possible de l'agent thérapeutique avec les protéines

plasmatiques. Cette liaison permet à l'agent thérapeutique de demeurer plus longtemps dans le compartiment sanguin et, par conséquent, diminue l'étendue de sa distribution. Les protéines impliquées sont l'albumine qui lie les substances à caractère acide, les lipoprotéines et α -glyco protéines acides qui lient les composés à caractère basique, et les globulines qui lient, entre autres, les stéroïdes, les vitamines et les ions métalliques (Houin, 1990). Comme c'est le médicament sous sa forme libre qui est actif, l'activité d'un médicament est grandement influencée par le pourcentage de la drogue non-liée aux protéines plasmatiques.

→ Le deuxième élément qui peut affecter l'étendue de la distribution d'un médicament est l'étendue de sa biodistribution tissulaire. En plus de la liaison avec les protéines plasmatiques, les drogues peuvent se lier à des molécules qui sont à l'intérieur des cellules (Bourne, 1996-1999). Certaines de ces molécules peuvent être des récepteurs de la drogue et l'action pharmacologique résulte de cette interaction. L'affinité d'un tissu pour une substance active peut être due à différentes causes telles que la liaison à des protéines, à l'acide désoxyribonucléique ou encore, dans le cas du tissu adipeux à la solubilité dans les lipides.

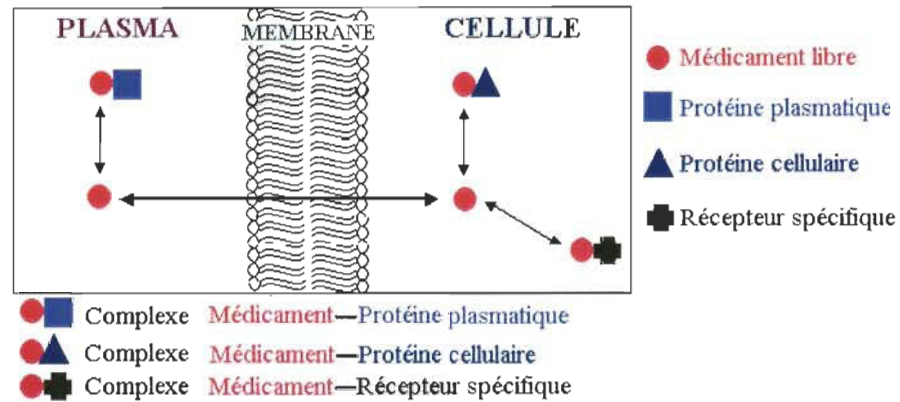


Figure 7. Distribution et liaison d'un médicament aux protéines plasmatiques et tissulaires.

(Tiré de Ritschel, 1976)

→ Le troisième élément qui influence l'étendue de la distribution d'une drogue est la destruction du médicament par le système immunitaire, par les macrophages, la dégradation par le foie, ainsi que l'élimination urinaire ou fécale. Cette destruction ou élimination du médicament diminue la réponse prévue.

1.1.5. Problèmes engendrés par les médicaments.

Le premier problème est la toxicité du médicament lui-même. Un exemple classique est celui des médicaments pour traiter le cancer. Les agents cytotoxiques destinés à tuer les cellules cancéreuses ne vont pas s'attaquer uniquement aux cellules malades, mais aussi à celles qui sont saines (Leyland-Jones, 1993). La faible sélectivité d'action des drogues utilisées en

chimiothérapie cause plusieurs effets secondaires tels que la perte des cheveux, la nausée, et les vomissements. Le deuxième problème est dû au fait que des doses répétées sont requises. La plupart des médicaments produisent une réponse relativement rapide sur une courte période de temps. Il faut donc administrer la dose à plusieurs reprises afin de maintenir l'effet désiré et prolonger le traitement. Un exemple, les comprimés d'antihistaminiques qui sont habituellement efficaces durant un certain temps au bout duquel il faut reprendre un comprimé pour que l'effet désiré persiste. Afin d'augmenter l'index thérapeutique des médicaments, il faudrait dans certains cas, augmenter le ciblage, et dans d'autres cas, augmenter le temps de circulation du médicament dans le sang, c'est-à-dire maintenir la dose thérapeutique durant une plus longue période. C'est l'objet de notre travail de maîtrise.

1.2. Alternatives aux médicaments sous forme libre.

1.2.1. Utilisation de molécules spécialisées qui sont spécifiques à une cible : les anticorps monoclonaux.

Afin de diminuer la toxicité, grâce à un ciblage du médicament vers les cellules à traiter, les chercheurs ont concentré leurs efforts sur des systèmes qui pourraient intrinsèquement reconnaître leur cible (Gregoriadis, 1977). En

ciblant les cellules à détruire ou à guérir, on peut diminuer la dose, donc l'effet sur les cellules saines. Les anticorps sont des molécules qui reconnaissent des antigènes présents à la surface de certaines cellules. Les anticorps qui sont spécifiques au même antigène sont appelés anticorps monoclonaux (Kuby, 1994). Ces anticorps, auxquels sont liés un médicament, peuvent être utilisés pour diriger ce médicament vers les cellules cibles. Ce phénomène est appelé le ciblage.

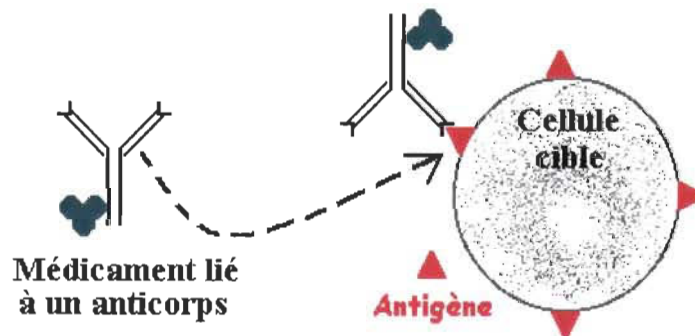


Figure 8. Anticorps monoclonal lié à un médicament reconnaissant sa cible sur une cellule.

Cependant, on peut rencontrer de nombreuses difficultés lors de la production ou de l'utilisation des anticorps monoclonaux (Gregoriadis, 1977). La préparation et la purification de l'antigène contre lequel on veut produire l'anticorps est difficile. La purification de l'anticorps monoclonal est aussi une étape critique. De plus, la drogue attachée aux anticorps peut masquer le site de reconnaissance de l'antigène ou modifier la structure tertiaire de l'anticorps qui entraîne la destruction du complexe drogue-anticorps par le

système immunitaire. Un autre désavantage des anticorps monoclonaux est que ce ne sont pas toutes les cellules cibles qui ont un antigène spécifique à leur surface. Finalement, même si l'anticorps est très spécifique à un antigène de surface, la quantité de drogue sur un anticorps est très faible, souvent trop faible pour provoquer un effet sur les cellules cibles.

1.2.2. Utilisation de transporteurs qui encapsulent un médicament.

Les avantages de l'administration de substances encapsulées sont nombreux. Nous ne nommerons que les trois principaux : Premièrement, certains transporteurs permettent le ciblage. Les liposomes sont un bon exemple de véhicules pouvant transporter une substance vers une cible. Ils sont phagocytés par les macrophages et peuvent donc être utilisés pour transporter des substances qui sont actives sur les macrophages.

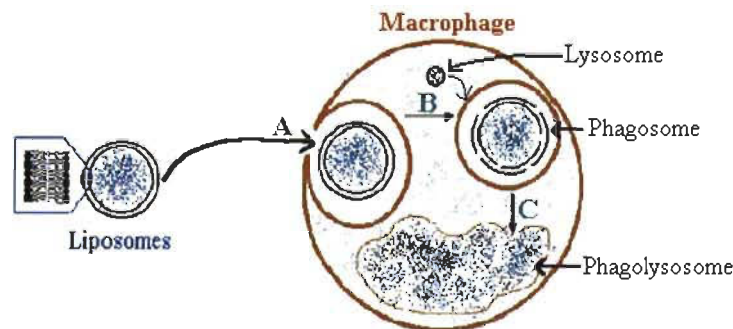


Figure 9. Exemple de transporteurs de médicaments qui permettent le ciblage.

- A. Le liposome est phagocyté par le macrophage.
- B. Le phagosome fusionne avec un lysosome .
- C. Déversement du contenu du liposome dans le phagolysosome.

Deuxièmement, certains transporteurs permettent de maintenir une dose thérapeutique sur une plus longue période car la sortie du médicament est progressive. Il n'est alors pas nécessaire de répéter l'administration du médicament, ou de la répéter moins souvent. La figure 10 compare les cinétiques de relargage d'un médicament sous forme libre et encapsulé. La sortie progressive du médicament du transporteur prolonge la dose thérapeutique.

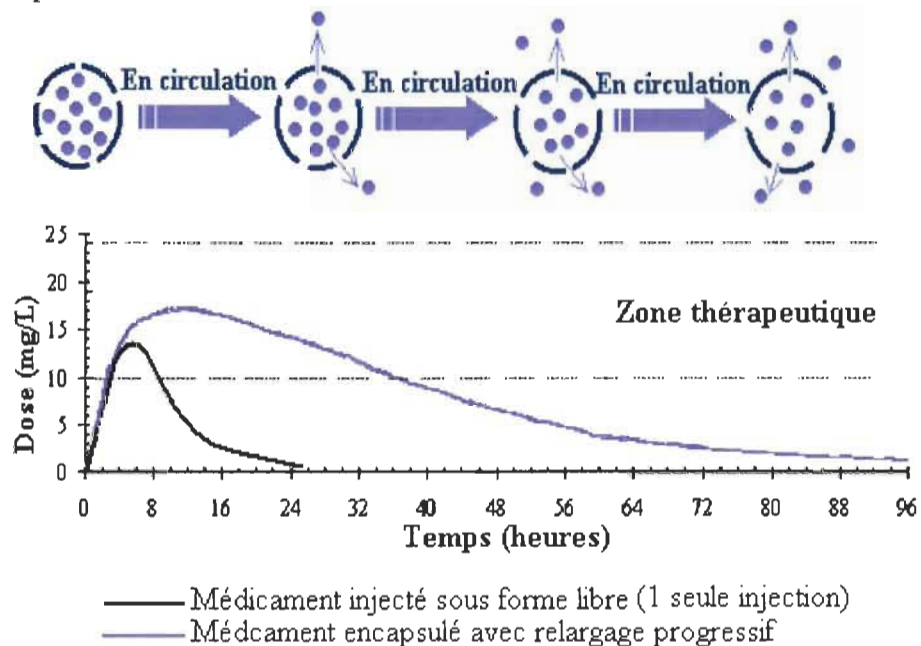


Figure 10. Comparaison des cinétiques de relargage d'un médicament libre et encapsulé.

Troisièmement, les transporteurs peuvent limiter la dégradation ou l'inactivation du médicament. La drogue n'est pas en contact avec le sang et n'est donc pas détruite, entre autres, par le système immunitaire, les enzymes

ou le système réticulo-endothélial. Elle ne peut pas non plus, se lier à des protéines plasmatiques qui peuvent causer une diminution de son effet. De plus, comme le médicament est à l'intérieur d'un véhicule, il peut y avoir diminution de la toxicité causée par l'action du médicament sur les cellules saines.

1.2.2.1. Les transporteurs d'origine artificielle.

1.2.2.1.1. Les microsphères ou microcapsules.

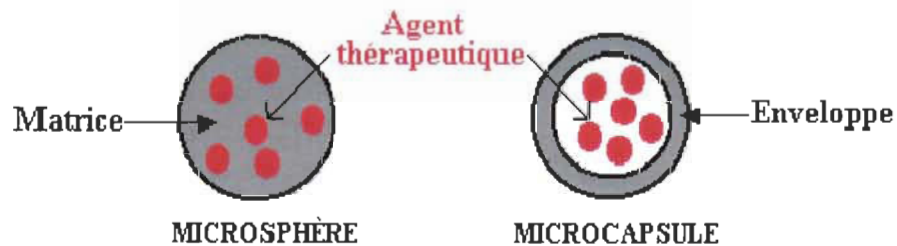


Figure 11. Structure d'une microsphère et d'une microcapsule.

Les microsphères ou microcapsules sont de petites sphères dont la taille peut varier de quelques micromètres à plusieurs centaines de micromètres (Benoît, 1985). Elles peuvent être préparées à partir de matériaux variés, entre autres les polyesters, l'éthylcellulose, l'acide polylactique ou l'albumine. Certains matériaux sont biodégradables, d'autres ne le sont pas. Les microsphères sont généralement pleines et solides. Le médicament est donc

mélangé à la matrice. Les microcapsules sont des systèmes creux, c'est-à-dire que le médicament est entouré d'une membrane.

Les microsphères peuvent être utilisées pour diverses applications thérapeutiques. Edman et coll., en 1980, ont montré que des enzymes pouvaient être protégées de la destruction par les systèmes de défense de l'organisme en étant encapsulées dans des microsphères d'acrylate. Morimoto et coll., en 1981, et Verdun et coll., en 1986, ont montré que l'incorporation de Doxorubicine, un agent anti-tumoral, dans des microsphères d'albumine réduisait la cardiotoxicité de la drogue qui est un effet secondaire de la Doxorubicine sous forme libre.

En changeant la composition du matériel de la matrice des microsphères ou de l'enveloppe des microcapsules, ainsi qu'en variant la taille de ces véhicules, il est possible de cibler un médicament vers une cible (Benoît, 1985). Une attention particulière doit cependant être portée sur le choix du matériau utilisé car certains matériaux peuvent entraîner la formation d'un complexe qui est plus immunogène que le médicament lui-même et qui peut provoquer une réaction immunitaire.

1.2.2.1.2. Les liposomes.

Les liposomes sont des vésicules sphériques formées d'une enveloppe de lipides (Omri & Ravaoarino, 1998). Ce sont des structures formées d'une ou de plusieurs bicouches concentriques de lipides qui entourent des compartiments aqueux. Des médicaments hydrosolubles peuvent être piégés dans ces compartiments aqueux, alors que des médicaments liposolubles peuvent être incorporés aux couches de lipides.

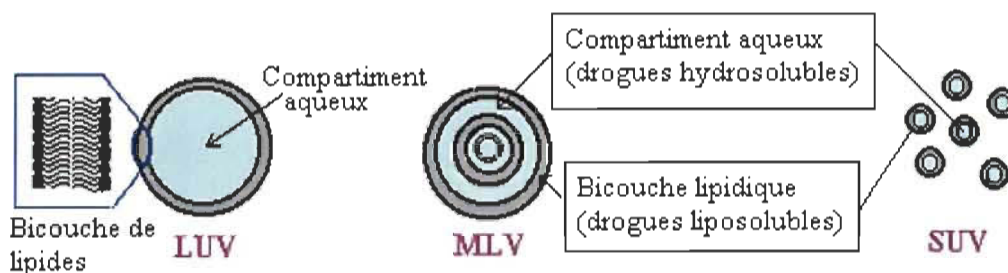


Figure 12. Caractéristiques des liposomes.

LUV (large unilamellar vesicles) sont des liposomes de grande taille composés d'une seule bicouche lipidique.

MLV (multilamellar vesicles) sont des liposomes composés de plusieurs bicouches lipidiques.

SUV (small unilamellar vesicles) sont des liposomes de petite taille composés d'une seule bicouche lipidique.

Les liposomes sont classés selon leur taille et selon la nature et le nombre de bicouches lipidiques qui les composent. Les petites vésicules unilamellaires (SUV–small unilamellar vesicles) ont un diamètre qui varie entre 20 et 50nm, les grandes vésicules unilamellaires (LUV–large unilamellar vesicles) ont un diamètre de 200 à 1000nm, et les vésicules multilamellaires

(MLV–multilamellar vesicles) dont le diamètre varie entre 400 et 3500nm sont constituées de plusieurs bicouches concentriques.

On peut modifier la diffusion vers l'extérieur de molécules encapsulées ainsi que la stabilité des liposomes en changeant la composition en lipides. On peut rajouter, par exemple, du cholestérol qui rigidifie la membrane, ce qui empêche la fuite des molécules encapsulées à l'intérieur du liposome (Gregoriadis, 1985).

Les liposomes peuvent être administrés par différentes voies, mais la voie intraveineuse est la plus couramment utilisée. Dans la circulation sanguine, les liposomes interagissent avec 2 groupes de protéines plasmatiques. Le premier groupe est celui des opsonines, qui sont des protéines qui vont s'adsorber à la surface des liposomes et induire leur phagocytose par les cellules du système réticulo-endothélial. Le second groupe est celui des lipoprotéines de haute densité, qui attaquent la vésicule liposomale par l'action de la phosphatidylcholine transférase et remodelent les phospholipides de la bicouche (Omri & Ravaoarino, 1998). Une fois dans la circulation sanguine, les liposomes sont rapidement captés par les cellules du système

réticulo-endothélial, surtout par les cellules de Kupffer et les macrophages spléniques (Roerdink & coll., 1981). La majorité des liposomes est donc captée par le foie et la rate.

La charge et la taille des liposomes sont deux facteurs qui influencent leur clairance. Plusieurs chercheurs ont constaté que les liposomes de petite taille sont retirés moins rapidement de la circulation sanguine (Scherphof, 1991) que les gros liposomes. Les liposomes chargés négativement sont plus rapidement éliminés que ceux qui sont chargés positivement ou qui n'ont pas de charge (Juliano & Stamp, 1975, Gregoriadis & coll., 1983). Ceci est probablement relié au fait que les liposomes qui ont une charge négative adsorbent de plus grandes quantités d'Immunoglobulines G, qui provoquent l'activation du complément et donc l'adhésion d'opsonines, que les liposomes neutres ou chargés positivement (Bonte, 1987).

Plusieurs applications des liposomes en médecine sont actuellement envisagées notamment dans le traitement des maladies infectieuses (Wasan & Lopez-Berestein, 1995), la chimiothérapie des cancers (Fidler & Kleinerman, 1994) et la thérapie génique (Mizuguchi & coll., 1997). Cependant, il existe

de nombreux problèmes liés à l'utilisation des liposomes, le plus important étant leur élimination rapide. De plus, les méthodes de production actuelles ne sont pas encore au point et les liposomes ne peuvent par conséquent, servir à relarguer des médicaments de façon lente.

L'utilisation de transporteurs de médicaments a pour but de protéger le médicament de sa destruction par l'organisme. Si les liposomes sont reconnus comme étrangers par les systèmes de défense et sont détruits, l'encapsulation dans les liposomes n'a plus d'intérêt.

Depuis quelques années, des chercheurs ont envisagé d'éviter cette destruction en utilisant des transporteurs qui ne seraient pas reconnus comme étranger par l'organisme.

1.2.2.2. Les transporteurs d'origine naturelle.

Il est possible de définir les transporteurs d'origine naturelle comme étant des cellules, ou des dérivés de cellules, extraits d'un organisme et qui peuvent être utilisés pour transporter des substances dans cet organisme. Voici les principaux transporteurs d'origine naturelle qui ont fait l'objet de recherches :

1.2.2.2.1. Les plaquettes.

Les plaquettes sont des cellules sanguines, dont le diamètre varie entre 2 et 4 μm , qui contiennent des organites, mais qui sont dépourvues de noyau (Tortora & Grabowski, 1994). Elles participent à la réparation des vaisseaux sanguins légèrement endommagés. Leurs granulations contiennent des substances chimiques qui provoquent la coagulation du sang. Les plaquettes ont une vie brève; elles ne survivent que cinq à neuf jours. Les macrophages de la rate et du foie se chargent de retirer les plaquettes de la circulation sanguine et de les détruire par phagocytose. Comme les plaquettes se localisent spontanément aux sites de lésions des vaisseaux, elles ont été utilisées, après marquage à l'Indium, en imagerie des lésions chez les animaux et les humains (Gregoriadis, 1981).

1.2.2.2.2. Les érythrocytes.

La disponibilité des érythrocytes et les connaissances que nous avons de ces cellules ont largement contribué à leur popularité en tant que transporteurs de substances biologiquement actives ou de médicaments. Les érythrocytes sont des cellules en forme de disques biconcaves dont le diamètre est d'environ 8 μm (figure 13).

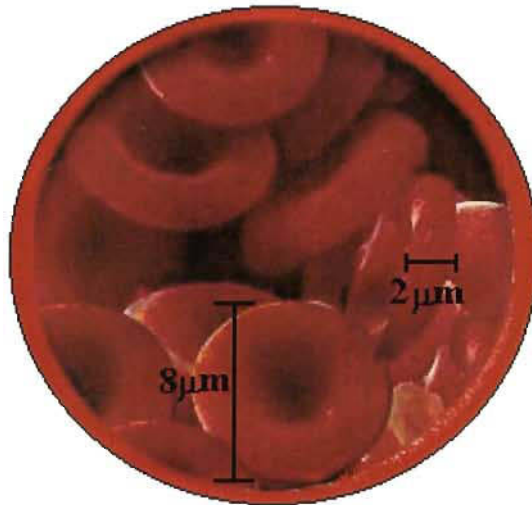


Figure 13. Morphologie du globule rouge mature.

Leur déformabilité leur permet de franchir des capillaires étroits mesurant $3\mu\text{m}$ de diamètre. La structure des érythrocytes matures est assez simple. Ces cellules ne possèdent ni noyau, ni organite. Elles ne peuvent pas se reproduire et n'ont pas d'activité métabolique importante (Tortora & Grabowski, 1994).

Le rôle de l'érythrocyte est de transporter l'oxygène, par le biais de l'hémoglobine, des poumons jusqu'aux tissus, et l'anhydride carbonique des tissus vers les poumons. La durée moyenne de vie d'un globule rouge est de 120 jours. Lorsque les érythrocytes sont trop vieux ou endommagés, ils restent emprisonnés entre autre, dans le foie et la rate où ils seront dégradés par les macrophages (Tortora & Grabowski, 1994).

La composition en phospholipides des deux feuillets membranaires du globule rouge est différente (Darnell & coll., 1993). La face externe de la bicouche lipidique est riche en phosphatidylcholine, sphingomyéline, ainsi qu'en glycolipides. La face interne contient principalement de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylsérine. La membrane de l'érythrocyte contient 2 catégories de protéines, les protéines intrinsèques et les protéines extrinsèques. Les protéines intrinsèques, telles que la glycophorine A, l'acétylcholinestérase et la bande 3, sont enfouies dans la bicouche lipidique. Les protéines extrinsèques, telle que la spectrine et l'actine, sont attachées à la face cytoplasmique de la membrane grâce à des interactions avec des protéines intrinsèques. L'actine et la spectrine sont des composantes du cytosquelette qui est le principal support de la rigidité membranaire et qui sert à limiter la diffusion latérale des glycoprotéines membranaires. La figure 14 représente les constituants de la membrane érythrocytaire.

Les érythrocytes qui sont présents dans la circulation sanguine, ne devraient pas provoquer de réaction immunitaire lors de transfusions autologues. Les globules rouges devraient donc demeurer plus longtemps que

les liposomes dans la circulation, sans être captés par le foie ou la rate. C'est cet avantage théorique qui a incité des chercheurs à encapsuler et à lier des médicaments dans les érythrocytes, puis à les réinjecter.

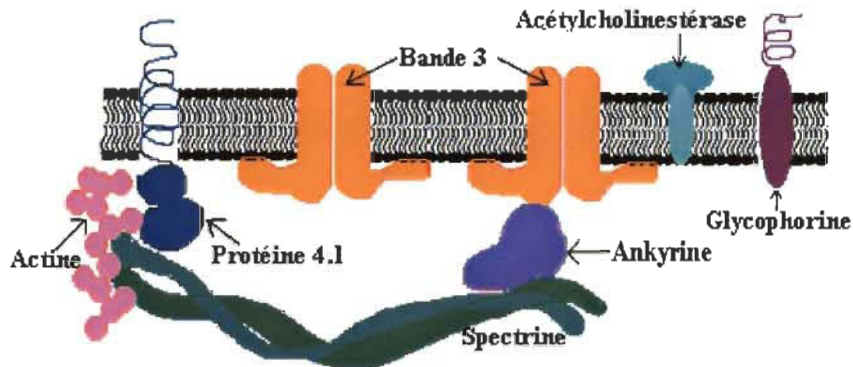


Figure 14. Structure de la membrane du globule rouge.

C'est au début des années 1970 que les essais d'encapsulation de substances dans les érythrocytes ont commencé. En 1975, Thorpe et coll. ont employé les érythrocytes afin de traiter des désordres lysosomiaux tels que la maladie de Gaucher de type I. Cette maladie, due à la déficience enzymatique de la β -glucosidase, provoque des accumulations de substrats non-hydrolysés (cérébrosides) dans les lysosomes, entraînant une hépatomégalie et une splénomégalie. La β -glucosidase étant une protéine, on ne peut l'injecter libre dans la circulation sanguine puisqu'elle serait reconnue par le système immunitaire et serait détruite (cette enzyme est habituellement à l'intérieur des cellules et non pas dans la circulation sanguine). D'autre part,

même si la β -glucosidase réussissait à échapper au système immunitaire, elle ne pourrait pas passer la membrane cellulaire et se rendre dans les lysosomes où se trouve son site d'action.

Thorpe et coll. ont encapsulé de la β -glucosidase dans les érythrocytes et ont observé que le complexe érythrocyte-enzyme demeurait quatre fois plus longtemps en circulation que l'enzyme seule. De plus, 70% de la dose injectée, encapsulée dans l'érythrocyte, a été retrouvée dans le foie et le complexe érythrocyte-enzyme est demeuré cinq fois plus longtemps dans les macrophages hépatiques que l'enzyme libre. La majorité de la dose injectée retrouvée dans le foie s'est rendue dans les lysosomes des macrophages qui est le site d'action de la β -glucosidase. Dans ce cas, les érythrocytes ont été utilisés afin d'orienter l'agent thérapeutique vers sa cible tout en le protégeant de la destruction par le système immunitaire.

Les érythrocytes pourraient aussi être, en principe, très utiles pour traiter certaines maladies qui demandent un traitement prolongé à relargage lent afin de maintenir, sur une période allant de quelques jours à quelques semaines, la concentration du médicament dans la zone thérapeutique.

Deloach, en 1983, a encapsulé la cytosine arabinoside (ara-C), un agent anti-tumoral, dans des érythrocytes de chiens. Il a montré que l'ara-C était relargué lentement dans le compartiment sanguin et que l'encapsulation de l'ara-C dans les érythrocytes augmentait de 50 fois sa demi-vie comparativement à la drogue sous forme libre.

Cependant, deux facteurs limitants sont à considérer pour l'utilisation des érythrocytes comme transporteur de médicaments. La quantité de substance à encapsuler dans les érythrocytes est le premier facteur limitant. Comme l'érythrocyte est déjà rempli d'hémoglobine, il y a peu de place pour y stocker des médicaments.

La taille de la substance à encapsuler est le deuxième facteur limitant. Certains agents anti-tumoraux, tels que la Daunorubicine, n'ont pu être encapsulés car ils fuient trop rapidement hors de la membrane du globule rouge. En 1978, Kitao et coll. ont montré que la diffusion est si rapide qu'une heure seulement après injection, 85% de la Daunorubicine se retrouve dans le compartiment sanguin sous forme libre. Dans ce cas, il y a peu d'intérêt à encapsuler la Daunorubicine dans les globules rouges.

1.2.2.2.3. Les fantômes d'érythrocytes (ghosts).

Afin d'encapsuler une plus grande quantité de médicament dans l'érythrocyte, Ihler en 1973, a pensé à le vider de son contenu en hémoglobine par la technique du choc osmotique.

En solution hypotonique, les pores de la membrane des globules rouges s'ouvrent et laissent échapper l'hémoglobine ainsi que d'autres protéines. Lorsque l'isotonie du milieu est rétablie, les pores se referment. Comme la membrane de l'érythrocyte vidée de son contenu conserve les dimensions de la cellule de départ et qu'elle se décolore, on l'appelle *fantôme* d'érythrocytes ou *érythroosome*. Ihler a suggéré que les *fantômes* seraient de bons transporteurs de médicaments puisqu'ils sont composés de la membrane des érythrocytes. Ces érythroosomes autologues ne devraient donc pas être reconnus par les systèmes de défense de l'organisme, et par conséquent devraient demeurer longtemps en circulation.

Lorsque les médicaments ne demeurent pas très longtemps encapsulés dans les fantômes d'érythrocytes, il est parfois possible de les lier chimiquement à la membrane. En 1989, Gaudreault et coll. ont lié de façon

covalente la Daunorubicine, un agent chimiothérapeutique qui est cardiotoxique lorsqu'il est injecté sous forme libre. L'idée de coupler la drogue à la membrane des érythrocytes est d'abord d'empêcher la Daunorubicine d'être captée par le cœur et donc de réduire l'action cardiotoxique. Ces auteurs ont montré que le complexe *fantôme*-Daunorubicine était plus efficace que la drogue libre lorsqu'il est injecté à des souris porteuses de cellules tumorales (P388D₁). Le temps de survie moyen des souris porteuses de cellules tumorales traitées par les complexes *fantôme*-Daunorubicine est augmenté de 35% par rapport aux souris traitées avec la drogue libre. Gaudreault et coll. concluent que l'efficacité du système est probablement due au détachement progressif de la drogue qui permet de prolonger le temps durant lequel la concentration de Daunorubicine est dans la zone thérapeutique.

Bien que l'efficacité de ce véhicule ait été démontrée, il n'en demeure pas moins que les *fantômes* sont rapidement éliminés par le foie et la rate (Sprandel & coll., 1980). Cette observation est inattendue car les *fantômes* sont composés de la membrane de l'érythrocyte, et par conséquent, ne devraient pas être reconnus et détruits par l'organisme. Leur membrane a

donc subi des dommages durant la préparation, dommages qui provoquent leur retrait rapide de la circulation. Il a été suggéré que la membrane devient moins déformable, donc plus visqueuse, et lorsque les *fantômes* traversent les petits capillaires de la rate, ils restent emprisonnés et sont alors phagocytés par les macrophages.

1.2.2.2.4. Les nanoérythroosomes.

La solution envisagée par Lejeune et coll. en 1994, pour permettre aux membranes d'érythrocytes de passer la rate, est de fragmenter les *fantômes* en petites vésicules, dont la taille est inférieure à celle des sinusoides spléniques. Ces vésicules devraient alors passer la rate sans être dégradées. Ces petites vésicules, qui peuvent aussi en principe servir à transporter des médicaments, sont appelées *nanoérythroosomes*.

Lejeune et coll. ont montré que les nanoérythroosomes pouvaient être utilisés comme transporteurs de médicaments. Ces auteurs ont lié de façon covalente la Daunorubicine aux nanoérythroosomes et ont comparé l'efficacité thérapeutique du complexe nanoérythroosome-Daunorubicine avec la drogue libre pour le traitement de souris leucémiques. Ils ont établi que la

conjugaison de la drogue aux nanoérythrocytes augmentait le temps de survie des souris leucémiques de près de 25%. Le mécanisme par lequel les nanoérythrocytes augmentent l'effet de la Daunorubicine n'est pas évident car l'étude pharmacocinétique des nanoérythrocytes n'avait pas été faite.

Par la suite, Jean Désilets (thèse de doctorat, 2000) a réalisé une analyse pharmacocinétique des nanoérythrocytes afin de connaître leur comportement et leur devenir après injection à des souris. Ces travaux ont permis de conclure que les nanoérythrocytes, tels que préparés actuellement, ne pourraient pas être utilisés comme système à relargage progressif de médicament dans la circulation sanguine puisqu'ils sont éliminés rapidement de la circulation. De plus, l'hypothèse selon laquelle les *fantômes* restent emprisonnés dans la rate parce qu'ils sont plus visqueux et moins déformables que les érythrocytes est fautive. L'élimination rapide de la circulation des *fantômes* et des nanoérythrocytes est donc due à une autre raison. La cause probable est les dommages dus à la méthode de préparation, surtout au choc hypotonique et à l'extrusion des membranes sous pression d'azote pour fragmenter les érythrocytes. Les nanoérythrocytes sont donc reconnus par les macrophages, dont une des fonctions est de retirer de la circulation les

cellules endommagées. La nature de ces dommages n'a pas été établie, mais l'oxydation des protéines membranaires et la perte de l'asymétrie du feuillet bilipidique sont fort probables.

1.2.2.2.5. Les vésicules de Kobayashi.

Préparer des vésicules, à partir des érythrocytes, mais de façon « plus douce » que les nanoérythrocytes, c'est-à-dire sans choc osmotique ni extrusion, devrait donner des vésicules dont la membrane est moins endommagée. Par conséquent, elles devraient être, en principe, moins reconnues par le système réticulo-endothélial et devraient demeurer plus longtemps en circulation.

Des travaux effectués par Kobayashi et coll. en 1983, qui concernent l'aspect physique de l'interaction entre les lipides et les érythrocytes, ont montré que l'interaction des liposomes composés de dilauroylglycérophosphatidylcholine (DLPC) avec des érythrocytes induit la formation de vésicules de 150 à 200 nanomètres de diamètre. Nous avons appelé ces vésicules les *vésicules de Kobayashi*.

Le processus de formation des vésicules reste encore obscur puisqu'il n'a jamais fait l'objet d'une étude approfondie, mais selon Kobayashi et coll. (1983) la formation des vésicules résulterait de l'incorporation de molécules de DLPC dans la membrane de l'érythrocyte (figure 15).

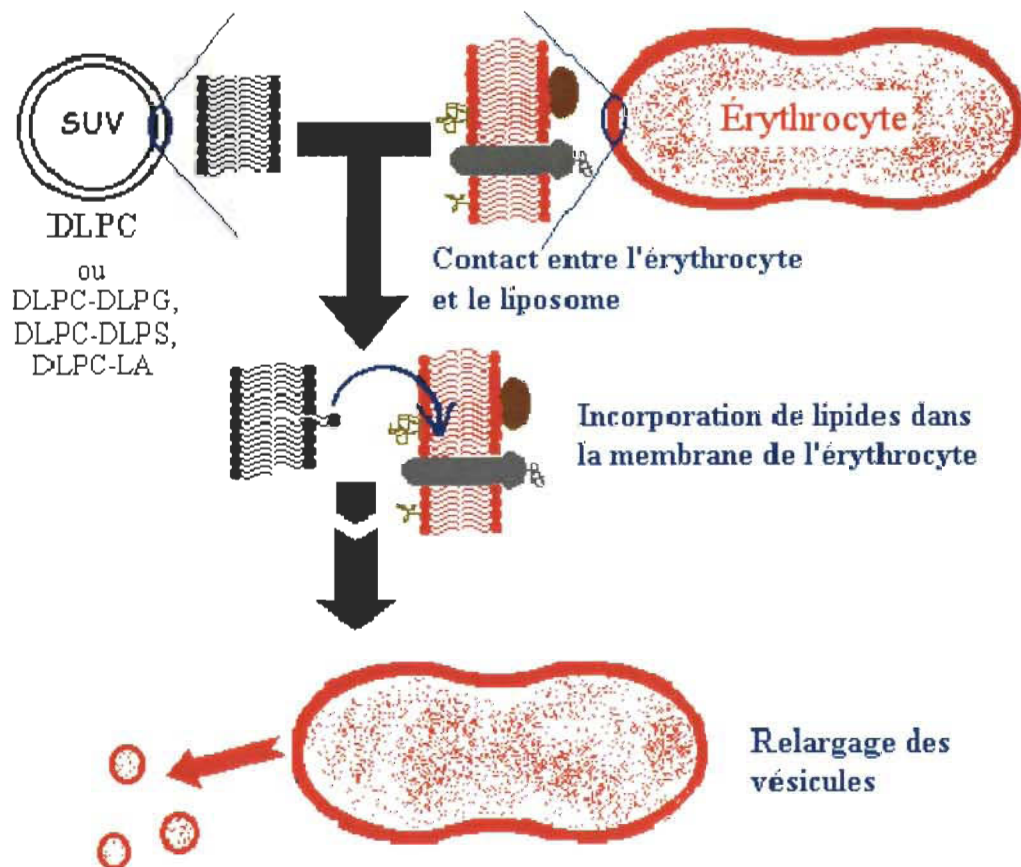


Figure 15. Mécanisme de formation des vésicules de Kobayashi par contact du DLPC avec les érythrocytes.

Cette insertion de lipides provoquerait une déstabilisation de la membrane et la formation de vésicules aurait alors un effet stabilisateur. La membrane des vésicules formées est enrichie en acétylcholinestérase, une

enzyme qui se trouve dans la membrane de l'érythrocyte (voir figure 14). Lors de la vésiculation, il y a donc sélection de certains domaines membranaires.

Ces vésicules de Kobayashi sont fabriquées de façon plus douce que les nanoérythrocytes puisque la méthode de préparation n'implique pas de choc osmotique ni de fragmentation sous haute pression. La membrane devrait donc, en principe, avoir subi moins de dommages que les nanoérythrocytes.

De plus, ces vésicules contiennent de l'hémoglobine et des protéines de l'érythrocyte. Elles sont donc plus proches de l'érythrocyte que les nanoérythrocytes. Il est donc probable que les vésicules de Kobayashi ne soient pas reconnues aussi vite que les nanoérythrocytes par le système d'élimination des globules rouges sénescents et demeurent plus longtemps dans la circulation.

Ces vésicules pourraient donc être, théoriquement, un transporteur qui peut être utilisé pour relarguer lentement des médicaments dans la circulation sanguine.

D'autre part, il est possible d'utiliser différents lipides pour induire la formation des vésicules de Kobayashi. Comme les lipides qui induisent la formation des vésicules sont incorporés en partie dans les vésicules, il est possible de préparer des vésicules qui contiennent des lipides différents et qui ont, par conséquent, des propriétés différentes. Nous avons donc préparé des vésicules de Kobayashi avec le DLPC, utilisé originellement par Kobayashi, mais aussi mis au point des vésicules qui contiennent un lipide avec une charge globale positive, la Laurylamine (LA) et deux autres lipides qui ont une charge globale négative, le dilauroylphosphatidylglycérol (DLPG) et le dilauroylphosphatidylsérine (DLPS). Nous avons donc obtenu donc des vésicules qui ont plus de charges positives ou négatives selon le lipide utilisé pour leur formation.

1.3. Objectif général du projet de recherche.

L'objectif de notre travail est de faire une étude pharmacologique des vésicules de Kobayashi, c'est-à-dire d'établir leur cinétique et leur biodistribution chez la souris afin de voir si on peut envisager de les utiliser comme transporteurs de médicaments.

1.4. Objectifs spécifiques du projet de recherche.

Les objectifs spécifiques de notre projet de maîtrise sont de répondre aux questions suivantes concernant les vésicules de Kobayashi :

1. Est-ce que les vésicules de Kobayashi demeurent plus longtemps en circulation que les nanoérythrocytes?

Les vésicules de Kobayashi qui sont préparées selon une méthode « plus douce » que les nanoérythrocytes, devraient être moins endommagées, et par conséquent devraient demeurer plus longtemps en circulation.

2. Est-ce que la biodistribution des vésicules de Kobayashi est différente de celle des nanoérythrocytes?

Une étude de la biodistribution des vésicules de Kobayashi va nous permettre de déterminer par quels organes et à quelle vitesse ces vésicules sont captées. Nous pourrions ensuite comparer le patron de distribution des vésicules de Kobayashi avec le patron de distribution des nanoérythrocytes. Nous pourrions alors envisager des applications potentielles des vésicules de Kobayashi.

3. Est-ce que les propriétés pharmacocinétiques des vésicules de Kobayashi peuvent être changées en modifiant la technique de préparation?

Selon le mécanisme de formation des vésicules de Kobayashi, il y aurait incorporation de lipides utilisés pour induire la formation des vésicules. En changeant la composition de ces lipides, les vésicules formées devraient incorporer des lipides différents et par conséquent les vésicules résultantes pourraient se comporter de façon différente dans l'organisme.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Préparation des lipides pour induire la formation des vésicules.

Afin d'obtenir les vésicules de Kobayashi, nous devons tout d'abord préparer les suspensions de lipides qui vont induire la formation des vésicules.

Les lipides utilisés sont le 1,2-dilauroyl-sn-glycéro-3-[phosphatidylcholine] (DLPC), le 1,2-dilauroyl-sn-glycéro-3-[phospho-L-sérine] (DLPS), le 1,2-dilauroyl-sn-glycéro-3-[phospho-rac-glycérol] (DLPG) et la laurylamine (LA) (le DLPC, le DLPS et le DLPG proviennent de Avanti® Polar-lipids Inc et la LA de Aldrich® Canada).

Nous avons préparé des suspensions de lipides sous forme de liposomes de quatre compositions différentes : Premièrement, des liposomes composés de DLPC uniquement. Deuxièmement des liposomes formés d'un mélange de lipides, DLPC + DLPG, DLPC + DLPS, DLPC + LA dans des proportions de 14 moles de DLPC pour 1 mole de DLPG, de DLPS ou de LA.

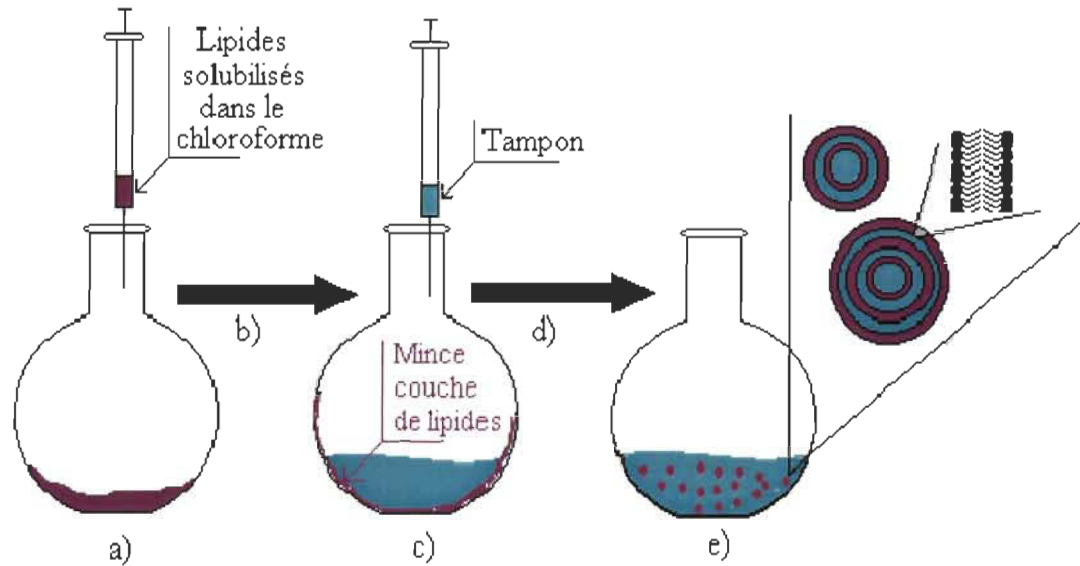


Figure 16. Étapes de préparation des suspensions de lipides.

a) Les lipides solubilisés dans le chloroforme sont déposés dans un ballon de 100mL. b) Le chloroforme est évaporé grâce à un évaporateur rotatif. c) Une mince couche de lipides se forme sur les bords du ballon. puis on ajoute le tampon. d) Le ballon est agité vigoureusement afin de permettre aux lipides de se détacher de la paroi du ballon et aux liposomes de se former. e) Les liposomes formés sont multilamellaires et sont constitués de plusieurs bicouches séparées par une couche de tampon.

Nous avons d'abord préparé des solutions-stock de suspensions de lipides de 1, 2.5, 7.5, 9, 10, 11.1, 12.5, 25 et 50mM. Les étapes de préparations de ces suspensions sont illustrées à la figure 16. La quantité nécessaire de lipides pour 10mL de suspension est d'abord pesée dans un bécher de 10mL. Environ 1mL de chloroforme est versé dans le bécher contenant les lipides. Les lipides solubilisés sont ensuite transférés dans un ballon de 100mL. Un second mL de chloroforme est ensuite versé dans le bécher qui contenait les lipides et le contenu du bécher est ensuite vidé dans le ballon. Cette étape est répétée 3

fois afin de transvider tous les lipides dans le ballon. On ajoute des petites billes de verre de 4mm de diamètre (Fisher Scientific, 11-312B) dans le ballon, billes qui facilitent l'agitation et augmentent la surface disponible sur laquelle vont se déposer les lipides lors de l'évaporation du chloroforme.

Le ballon est ensuite placé sur l'évaporateur rotatif (Rotavapor R-110, Büchi) afin d'évaporer le chloroforme. Une fois évaporé, nous obtenons un mince film de lipides sur les parois du ballon et sur les billes de verre. Les lipides sont ensuite resuspendus dans 10mL de tampon phosphate salin PBS (137mM NaCl; 2,68mM KCl; 8,1mM Na₂HPO₄; 1,47mM KH₂PO₄; pH=7,4). Après cette étape, les liposomes formés sont de grand diamètre et multilamellaires. Afin d'obtenir de petits liposomes unilamellaires, qui pourront mieux réagir avec les érythrocytes, la suspension de liposomes est transférée dans un tube de 15mL et une série de gels dans l'azote liquide et de dégels à température ambiante est effectuée, ce qui casse les liposomes multilamellaires en liposomes unilamellaires de petite taille. Nous avons fait 4 séries de gel et dégel (10 minutes de gel et 10 minutes de dégel) pour chaque préparation. Avant la quatrième série de gel et dégel, la suspension de liposomes est divisée en aliquots de 1,2mL dans des tubes eppendorfs. Ces

aliquots sont stockés au congélateur jusqu'à utilisation. Après dégel, et juste avant utilisation, une dilution de 100x est effectuée avec du tampon phosphate salin. La concentration finale en lipides est donc de 10, 25, 75, 90, 100, 111, 125, 250 ou 500 μ M.

La dernière étape est la sonication durant 15 minutes (Sonicator® W-385, Ultrasonic Processor) à 18W sur glace pour briser les LUV (large unilamellar vesicles) en SUV (small unilamellar vesicles). Ces liposomes sont ensuite filtrés sur filtre Millipore de 0.45 μ m afin de les stériliser.

2.2. Préparation des vésicules de Kobayashi.

Les vésicules de Kobayashi sont préparées en se basant sur la méthode originale décrite par Kobayashi et coll. en 1983. La figure 17 résume les étapes de préparation. Le sang de 5 souris mâles CD1 est recueilli par ponction cardiaque dans des seringues héparinées de 1mL. Ce sang est placé dans un tube de 15 mL en plastique Falcon ou Fisher. Les érythrocytes sont ensuite séparés du plasma par 4 séries de centrifugation à 500g x 10minutes (IEC clinical Centrifuge) et lavages dans du tampon phosphate salin (PBS), ce qui élimine le plasma.

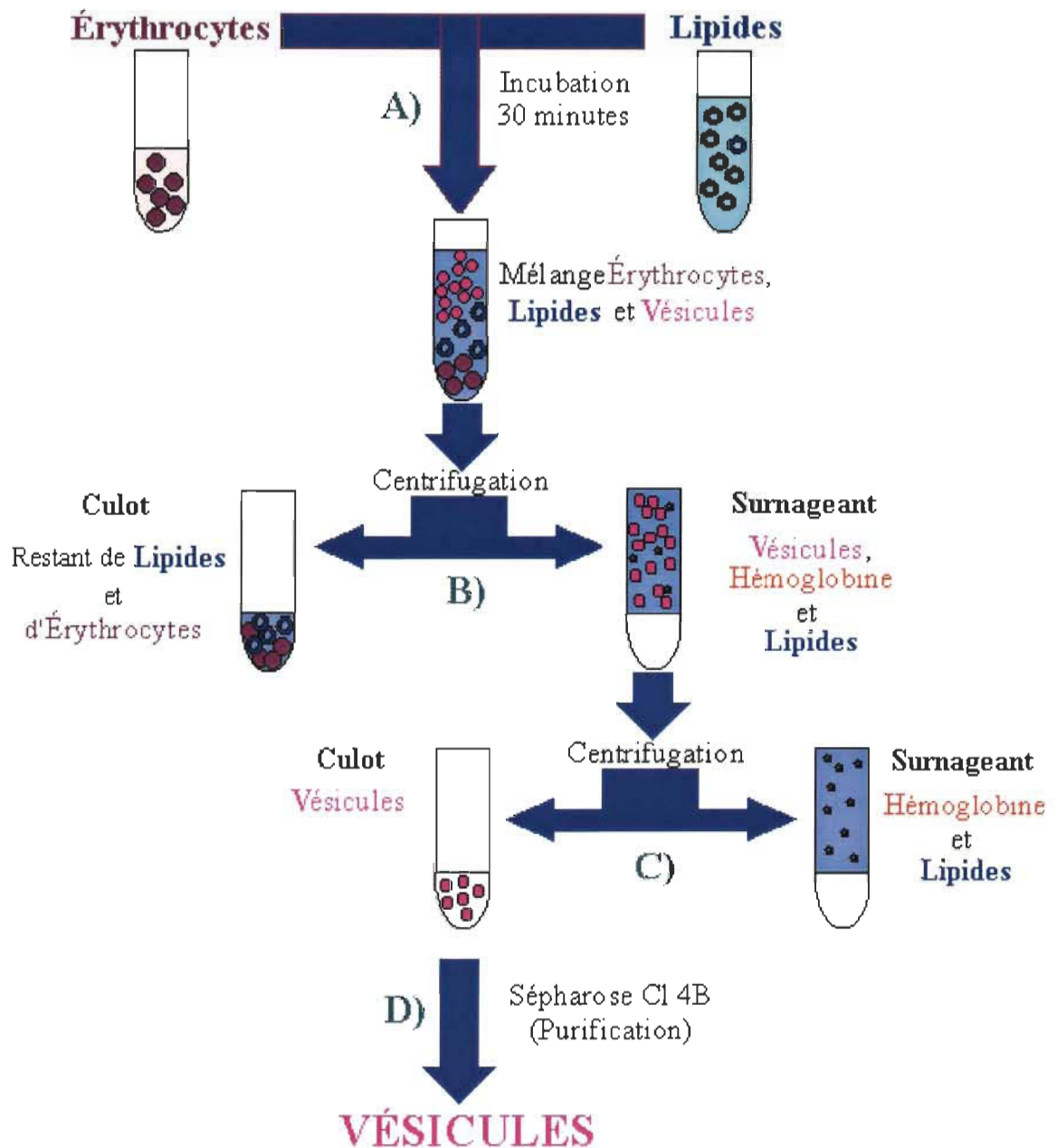


Figure 17. Étapes de préparation des vésicules de Kobayashi.

- Incubation durant 30 minutes des érythrocytes avec la suspension de lipides.
- Le mélange est centrifugé à 500g x 10minutes pour séparer les restants d'érythrocytes et de lipides.
- Le surnageant est recueilli et centrifugé à 20000g x 18minutes.
- Le culot est alors passé sur colonne de sépharose CL 4B afin de purifier les vésicules de Kobayashi.

Après la dernière centrifugation, les érythrocytes, tassés dans le fond du tube, sont comptés à l'aide d'un hémacimètre afin de déterminer la dilution nécessaire pour obtenir une concentration finale en érythrocytes de 10^{10} érythrocytes/mL.

Les érythrocytes lavés et dilués, sont incubés avec les lipides. L'incubation se fait dans des tubes en plastique Falcon ou Fisher de 15mL. Nous avons mélangé 1mL d'érythrocytes (10^{10} érythrocytes/mL) avec 9mL de lipides de concentration égale à 9, 22.5, 67.5, 81, 90, 100, 112.5, 225 et $450\mu\text{M}$ dépendant de l'expérience. L'incubation dure 15, 30, 45 ou 90 minutes, en agitant doucement de temps en temps, soit à température pièce, soit dans un bain-marie à 37°C selon l'expérience effectuée.

Les érythrocytes forment des vésicules, mais il reste un gros résidu d'érythrocytes qui doit être séparé des vésicules de Kobayashi. Ces restants d'érythrocytes sont éliminés par centrifugation à $500\text{g} \times 10\text{minutes}$ (IEC Clinical Centrifuge). Le surnageant, qui contient les vésicules de Kobayashi, est transféré dans un tube de plastique de 50mL (Nalgène, Fisher Scientific) et centrifugé à $20000\text{g} \times 18\text{minutes}$ à 4°C (Sorvall RC-26 Plus). Les vésicules

de Kobayashi se retrouvent alors dans le culot. Le surnageant qui contient des liposomes et de l'hémoglobine est éliminé par aspiration avec une pipette Pasteur. Un lavage des vésicules de Kobayashi est ensuite effectué dans 30mL de PBS pour éliminer les liposomes et l'hémoglobine qui pourraient être restés avec les vésicules de Kobayashi. Le surnageant qui contient l'hémoglobine et les liposomes est éliminé et les vésicules, tassées au fond du tube, sont resuspendues dans 1.5 mL de tampon PBS.

2.3. Purification des vésicules de Kobayashi.

Les vésicules de Kobayashi sont purifiées par chromatographie sur colonne de sépharose Cl 4B. Le gel de sépharose est tout d'abord gonflé durant environ 2 jours dans du tampon phosphate salin (PBS). Environ 250mL de tampon PBS sont ajoutés à 5g de sépharose Cl 4B sec déposé dans un contenant autoclavable. Après deux jours, le gel gonflé est stérilisé à 110°C durant 1 heure. Une fois stérilisé, le gel peut être conservé à 4°C.

Le jour de l'expérience, le gel gonflé est déposé dans une petite colonne PD-10 (Fisher Scientific). Lorsque le gel est tassé dans la colonne, il est lavé avec 30mL de tampon PBS. Nous déposons ensuite la suspension de

vésicules. La fraction rosée qui contient les vésicules de Kobayashi est recueillie.

2.4. Caractérisation des vésicules de Kobayashi.

Les vésicules de Kobayashi purifiées sont dosées et caractérisées selon les trois critères suivants : Dosage des protéines, dosage de l'acétylcholinestérase, forme et taille des vésicules de Kobayashi déterminées par microscopie électronique à transmission.

2.4.1. Dosage des protéines.

Les protéines sont dosées par la méthode de Folin-Lowry (Lowry & coll., 1951) qui consiste à faire réagir les protéines avec un réactif à base de sulfate de cuivre. Les ions cuivriques réagissent avec les liens peptidiques des protéines et donne une coloration bleue. L'ajout d'une solution de réactif au phénol provoque aussi la formation d'un composé coloré, le bleu de tungstène, qui est le résultat de la réaction de l'acide phosphotungstomolybdique avec les groupements aromatiques des protéines. L'intensité de la coloration bleue est lue par spectrophotométrie (Milton Roy Spectronic 3000 Array) à 750nm et la

concentration en protéines est déduite à l'aide d'une courbe étalon faite avec de l'albumine de boeuf.

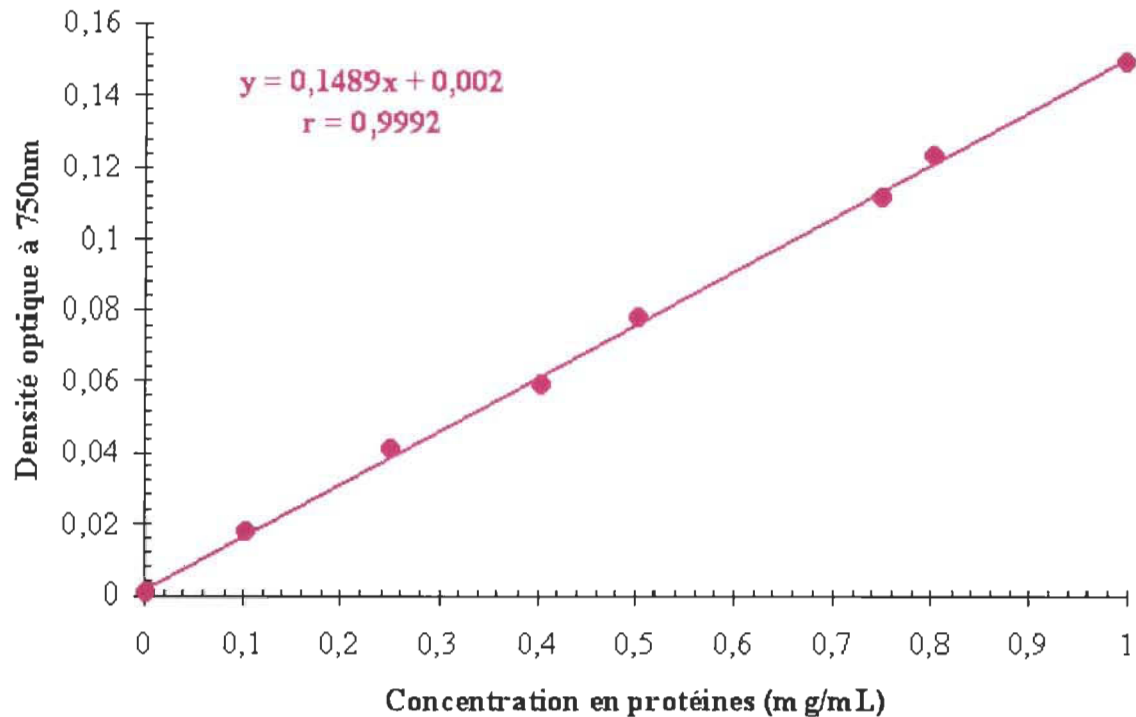


Figure 18. Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry.

2.4.2. Dosage de l'acétylcholinestérase.

La deuxième méthode qui permet de caractériser les vésicules de Kobayashi est le dosage de l'acétylcholinestérase (AChE). Selon Kobayashi et coll., il y a un important enrichissement en acétylcholinestérase des vésicules formées par rapport aux érythrocytes.

L'acétylcholinestérase catalyse la réaction suivante :

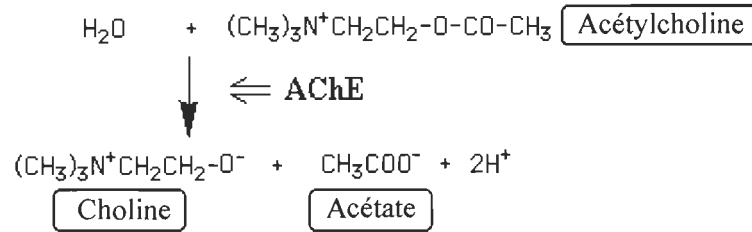


Figure 19. Réaction catalysée par l'acétylcholinestérase.

La méthode d'Ellman (1961) consiste à doser la thiocholine, produite par la réaction d'hydrolyse par l'acétylcholinestérase de l'acétylthiocholine, ajoutée à la suspension de vésicules, par l'acide 5,5' dithiobis(2-nitro)benzoïque (DTNB). La figure 20 montre cette réaction qui produit un composé coloré jaune qui est dosé par spectrophotométrie.

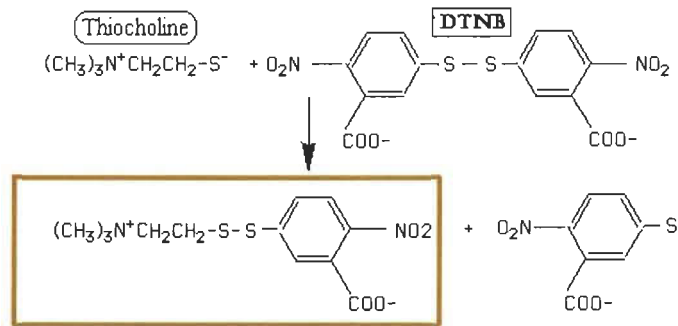


Figure 20. Formation du composé coloré de la réaction d'Ellman.

Cent microlitres de suspension de vésicules sont mis dans une cuvette de spectrophotomètre à laquelle on ajoute 800 μ L de **solution A** (100mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄; pH 8.0) et 50 μ L de **solution B** (0.01M de DTNB (acide

5,5' Dithiobis(2-nitrobenzoïque)); 100mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/ \text{NaH}_2\text{PO}_4$; pH 7.0). Cinquante microlitres de **solution C** (12.5mM de chlorure d'acétylthiocholine) sont ensuite ajoutés. Le tout est rapidement mélangé et la cuvette est placée dans le spectrophotomètre. Trente secondes après l'ajout de la solution C, l'absorbance à 412nm est lue. Cette valeur est le zéro.

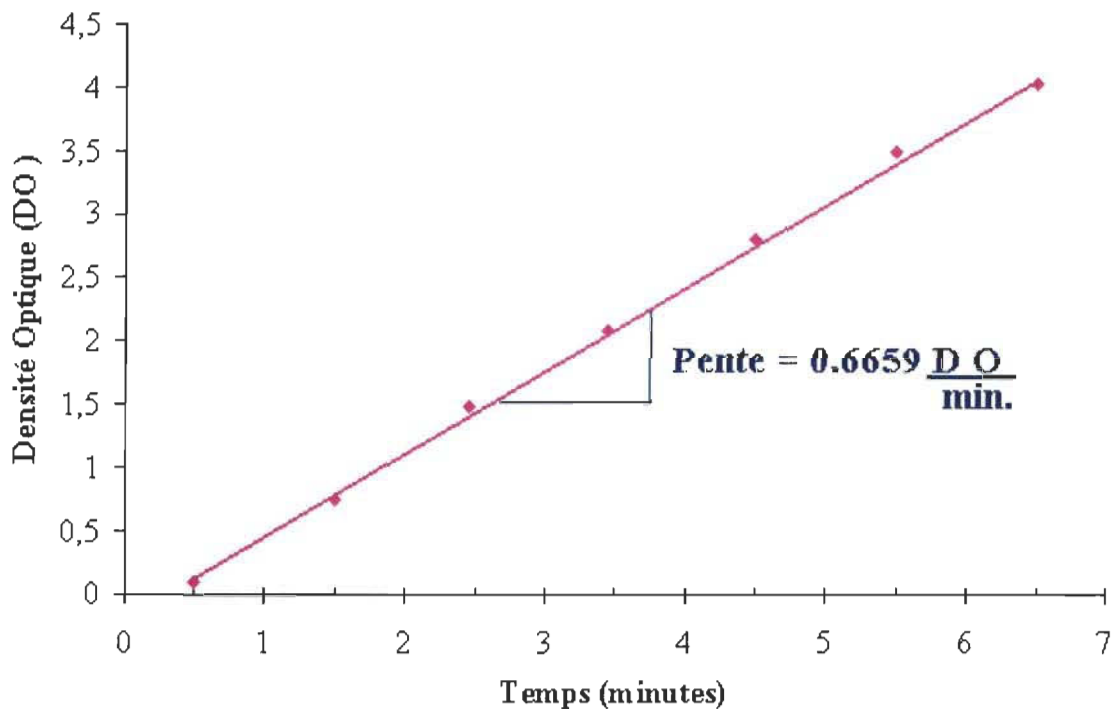


Figure 21. Courbe étalon pour le dosage de l'acétylcholinestérase.

La densité optique à 412nm est suivie durant au moins 6 minutes. La figure 21 représente un exemple de courbe qui est obtenue. La pente de la droite nous donne la valeur de l'activité enzymatique qui est exprimée en DO/min.

2.5. Préparation des nanoérythroosomes.

Les nanoérythroosomes sont préparés selon la méthode décrite par Lejeune et coll. (1994). La figure 22A résume les étapes de la préparation des érythroosomes (*fantômes*) et la figure 22B la préparation des nanoérythroosomes. Le sang de 5 souris est prélevé par ponction cardiaque dans des seringues héparinées de 1mL. Le sang des 5 souris est ensuite transféré dans un tube Falcon de 15mL et centrifugé à 500g x 10minutes (IEC Clinical Centrifuge) afin de séparer les érythrocytes du plasma.

Les érythrocytes sont ensuite lavés dans un volume de 10mL de tampon phosphate salin PBS (145mM NaCl; 5.0mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄; pH 7.4). Après le deuxième lavage, les érythrocytes sont resuspendus dans 10mL de tampon hypotonique PB (5.0mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄; pH 7.4) pour permettre la sortie de l'hémoglobine. Ces érythrocytes, dont les pores sont ouverts, sont transférés dans un tube de 50mL en plastique (Nalgene, Fisher Scientific).

Les érythrocytes « ouverts » sont ensuite centrifugés à 20000g x 18minutes à 4°C (Sorvall RC-26 Plus) pour séparer les ghosts de

l'hémoglobine qui a fuit. Quatre lavages avec 40mL de tampon hypotonique sont nécessaires pour éliminer la totalité de l'hémoglobine.

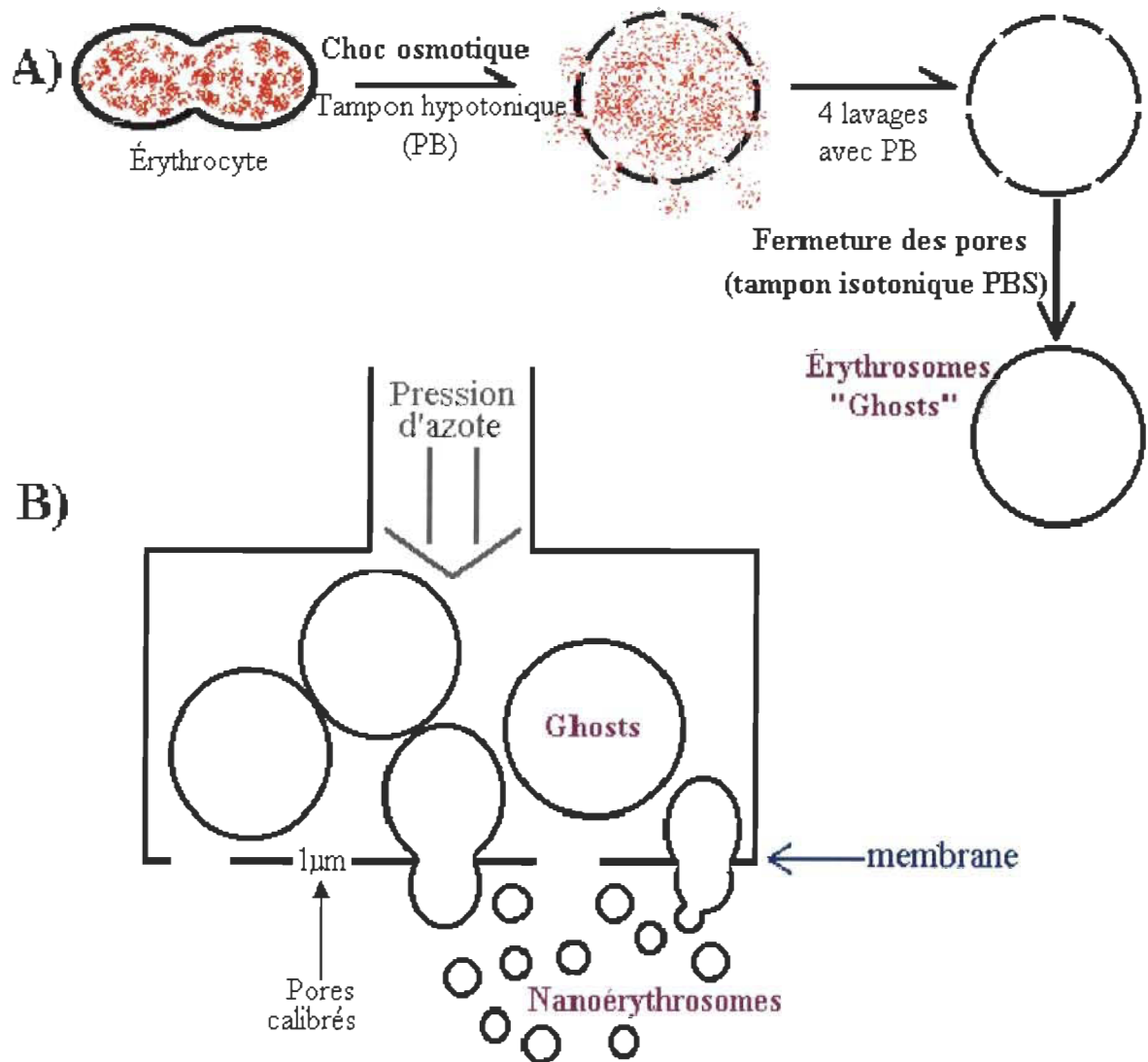


Figure 22. Étapes de préparation des nanoérythrocytes selon Lejeune et collaborateurs.

- A) Les érythrocytes subissent un choc osmotique afin de les vider de leur hémoglobine. Les membranes résultantes sont appelées érythrocytes.
- B) Les érythrocytes sont fragmentés par extrusion sous pression d'azote et les petites vésicules formées sont les nanoérythrocytes.

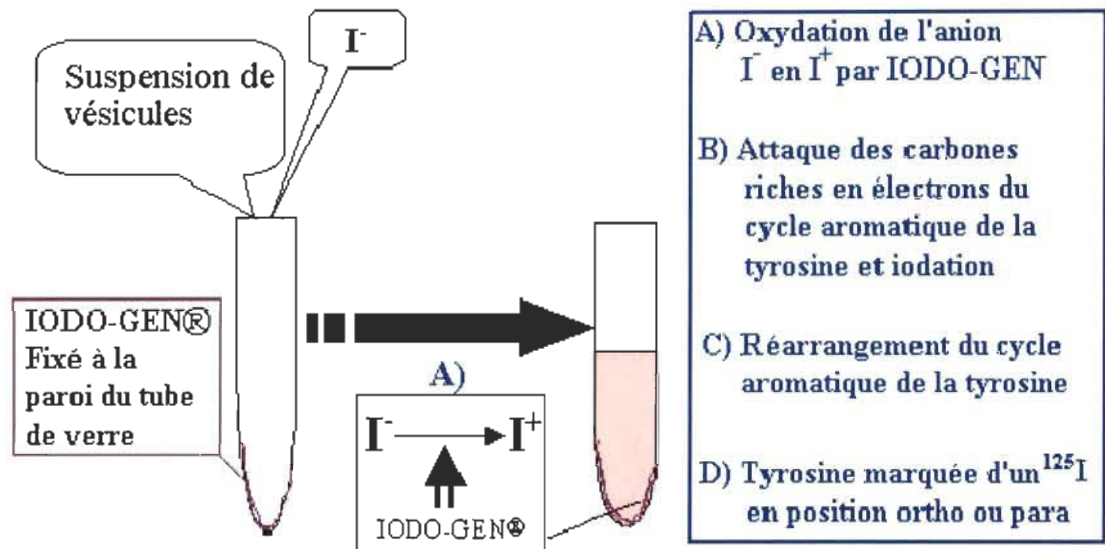
Après le dernier lavage, les érythrocytes vidés de leur hémoglobine, les *fantômes*, sont resuspendus dans un volume de tampon phosphate salin égal au volume initial de sang (5mL). Le retour à l'isotonicité provoque la fermeture des pores de la membrane des *fantômes*.

Les nanoérythrocytes sont obtenus par extrusion des *fantômes*, sous pression d'azote, à travers une membrane de polycarbonate (Costar/Nuclepore, Canada Inc.) dont les pores sont calibrés à 1 μ m de diamètre. L'extrusion est répétée 6 fois.

Une fois les nanoérythrocytes préparés, les protéines sont dosées par la méthode de Folin-Lowry (expliqué au point 2.4.1.) et la concentration est ajustée à 1mg de protéines par mL.

2.6. Marquage à l'iodo-GEN®.

La technique de marquage des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes est celle à l'iode-125 utilisant l'iodo-GEN® (Markwell et Fox, 1978). La figure 23 résume les étapes du procédé d'iodation ainsi que la réaction de l'iode avec la tyrosine.



Réaction

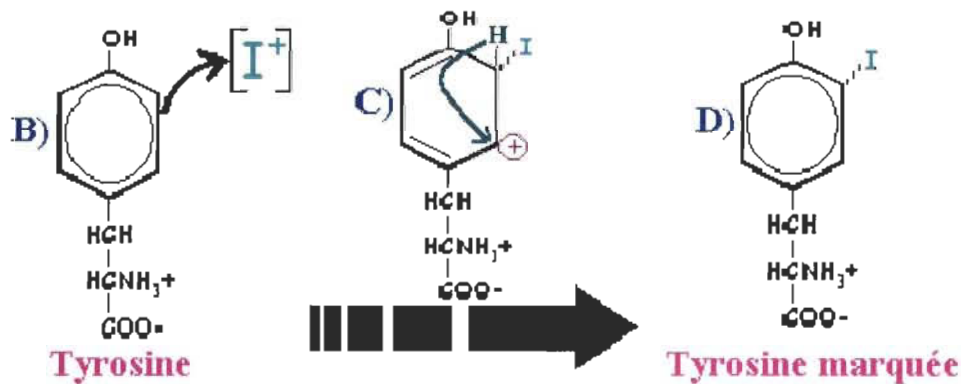


Figure 23. Marquage des vésicules, et réaction de l'iode avec la tyrosine.

L'IODO-GEN® agit comme substrat en oxydant l'anion $^{125}\text{I}^-$ en $^{125}\text{I}^+$. L'ion $^{125}\text{I}^+$ est très instable et en présence de carbones riches en électrons, il provoque la substitution d'un hydrogène en position ortho ou para du groupement aromatique des tyrosines.

Le tube où a lieu la réaction est tout d'abord préparé. Cinquante microgrammes d'IODO-GEN® (1,3,4,6-tétrachloro-3 α -6 α -diphénylglycouril) dissout dans 250 μ L de chloroforme sont déposés dans un tube à culture de 12x75mm. Le chloroforme est évaporé lentement avec un jet doux d'azote. La pellicule d'IODO-GEN® doit être à peine visible sur les parois du tube, sinon cette opération doit être recommencée.

Un mL de suspension de vésicules de Kobayashi ou de nanoérythroosomes est ensuite ajouté (concentration en protéines de 1mg/mL). À l'aide d'une seringue Hamilton de 10 μ L, on ajoute à la suspension de vésicules 40 à 50 μ Ci d'¹²⁵INa (Mandel). L'incubation dure 45 minutes à température de la pièce et le tube est agité doucement toutes les 15 minutes.

2.7. Purification des vésicules de Kobayashi ou des nanoérythroosomes.

Lors de l'étape de marquage à l'iode-125, une certaine quantité de ¹²⁵I n'a pas réagit et reste sous forme libre dans la solution. Nous devons éliminer cet iode libre. La méthode utilisée est la dialyse. Les préparations de vésicules de Kobayashi ou de nanoérythroosomes marqués à l'iode-125 sont

transférées à l'aide d'une pipette Pasteur dans un sac à dialyse de 6.4mm de diamètre (BioDesign Dialysis Tubing, New York, MW « cut-off » 12-16kDa). Le tube à dialyse est déposé dans un tube Falcon de 50mL contenant un petit agitateur magnétique.

La dialyse est effectuée avec agitation constante en changeant le tampon de dialyse (tampon PBS), environ toutes les 2 heures, durant les 6 premières heures. Le tampon est ensuite laissé toute la nuit. Le lendemain matin, le tampon est changé trois fois à raison d'une fois toutes les 30 minutes. Nous arrêtons la dialyse lorsque 99% de l'iode libre a été éliminé. La quantité d'iode libre qui reste est dosée en mesurant la radioactivité du dialysat. Un temps de dialyse de 20 heures est généralement suffisant pour éliminer l'iode libre.

2.8. Vérification de la pureté des vésicules de Kobayashi ou des nanoérythrocytes marqués.

Afin de s'assurer qu'il ne reste pas d'iode libre dans nos préparations de vésicules de Kobayashi ou de nanoérythrocytes, nous avons fait une chromatographie sur couche mince. Les vésicules de Kobayashi ou les

nanoérythrocytes sont de très grosses structures comparativement à une molécule d'iode. L'iode-125, non attaché aux vésicules, migre avec le tampon de migration tandis que les vésicules marquées resteront au point de dépôt.

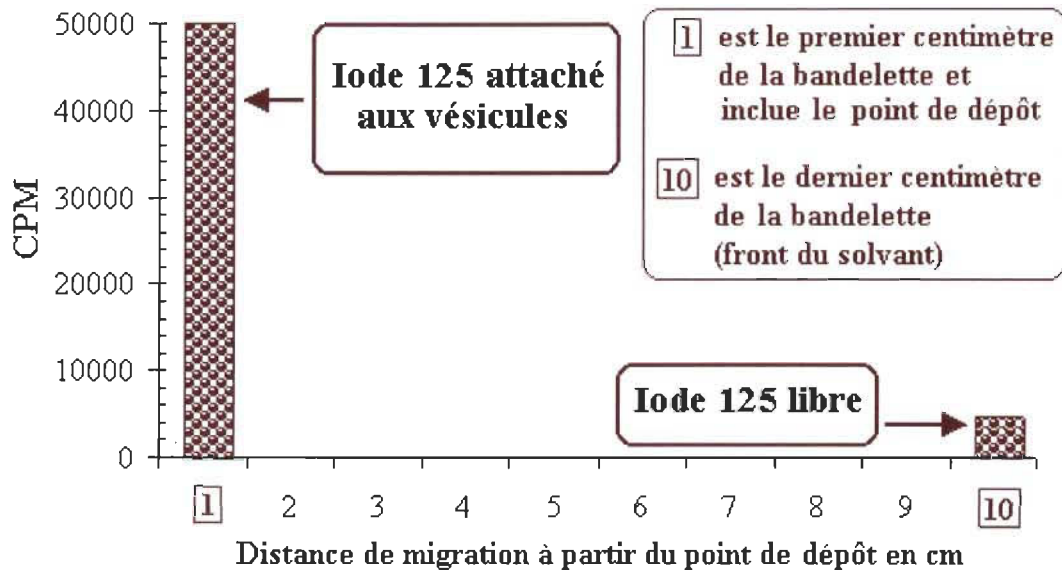


Figure 24. Radioactivité en fonction de la distance de migration.

Des plaques de gel de silice de 20x20cm (Whatman Cie.) sont découpées en bandelettes de 1x20cm. Une goutte de préparation (vésicules de Kobayashi ou nanoérythrocytes) est déposée à 1.5cm du bord de la bandelette. Il est important de bien laisser sécher la goutte. Le tampon de migration est le tampon PBS. Après migration du solvant sur 10 cm, la bandelette est séchée à l'air ambiant et découpée en morceaux de 1x1cm en partant du point de dépôt, et la radioactivité de chaque morceau est comptée au compteur Gamma. La

radioactivité de chaque morceau, comptée en fonction de la distance de migration du solvant est montrée à la figure 24. Le pourcentage d'iode libre (bandelette 10) dans la préparation ne doit pas dépasser 1% du total de la radioactivité de la suspension de vésicules.

2.9. Cinétique de décrochage de l'iode-125 des vésicules de Kobayashi.

Cette expérience a pour but de déterminer la stabilité du marquage des vésicules à l'iode-125. La stabilité est évaluée en mesurant la vitesse à laquelle se décroche l'iode-125 des vésicules de Kobayashi. Après le marquage, nous prélevons des aliquots de vésicules à des intervalles de temps réguliers, et la quantité d'iode qui s'est détachée des vésicules est mesurée par une chromatographie sur couche mince, selon la technique décrite au point 2.8.

La cinétique de décrochage est effectuée, soit à température ambiante (22°C) dans du tampon PBS, soit à 37°C dans du sérum de souris, ce qui est plus proche des conditions *in vivo*. Le reste de la procédure est la même que celle décrite précédemment.

2.10. Injection des préparations par voie intraveineuse.

Les souris sont d'abord anesthésiées au Metofan (Janssen, Ont.) afin de faciliter l'injection. Les préparations, c'est-à-dire les vésicules de Kobayashi, les nanoérythrocytes, ou l'iode-125 libre, sont injectées dans la veine de la queue. Pour chacune des expériences, 5 lots de 4 souris mâles CD1 sont utilisés. Environ 50µL de préparations de vésicules de Kobayashi ou de nanoérythrocytes, qui contiennent 50µg de protéines et qui ont une activité entre 800 000 et 1 000 000 CPM, sont injectés à chaque souris. Pour l'iode-125 libre, environ 1 000 000 CPM d'iodure de sodium (Na^{125}I) dilué dans 50µL de tampon PBS est injecté à chaque souris. Chaque expérience est faite un minimum de 3 fois.

Les souris sont ensuite sacrifiées 30 minutes, 2, 4, 24 et 48 heures après injection, puis elles sont disséquées et la radioactivité des différents organes est comptée.

2.11. Prélèvement des organes.

Après euthanasie (la souris est endormie dans une cage contenant du chloroforme et tuée par dislocation cervicale), la souris est immédiatement

ouverte au niveau de la cage thoracique, et à l'aide d'une seringue tuberculine de 1mL, le maximum de sang est prélevé directement du cœur. Les organes sont ensuite séparés et épongés sur papier buvard afin d'enlever le sang résiduel. La liste des organes et tissus prélevés est représentée au tableau 1.

Tableau 1. Liste des organes prélevés pour comptage de radioactivité.

Sang	Cœur	Poumons	Foie
Rate	Reins	Estomac	Petit Intestin
Muscle	Os	Peau	Queue
G. Lymphatiques (Inguinaux)		Glande Thyroïde	Carcasse

Tous les organes (sauf la carcasse) sont déposés dans des tubes de polypropylène de 12x75mm (Fisher Scientific). La carcasse, ne rentrant pas dans ces tubes, est découpée en morceaux et répartie dans plusieurs fioles de polypropylène de 16x57mm (VWR Canlab). Les organes sont alors pesés. Pour le cœur, le foie, les poumons, la rate et les reins, nous prélevons tout l'organe. Pour la glande thyroïde, comme il n'est pas possible de prélever uniquement la glande car elle est trop petite et peu visible, nous prélevons environ 0.1g de tissu dans la région où est située la glande. La thyroïde chez l'humain a un poids de 30g, nous estimons donc le poids de la thyroïde à 0.01g chez la souris. Ce poids sera celui utilisé pour les calculs. L'estomac et

le petit intestin sont vidés de leur contenu. L'estomac est pesé au complet, alors qu'une partie seulement de l'intestin est pesé (environ la moitié). Les muscles, la peau et les os ne sont pas entièrement prélevés et comptés. Une partie seulement est prise. Les os et les muscles sont prélevés d'une des pattes postérieures et un morceau de la peau est enlevé du dos de l'animal. La carcasse est tout le restant, c'est-à-dire les muscles, les os, la peau, le gras, une partie de l'intestin, les organes génitaux, la vessie vidée de l'urine et tous les ganglions lymphatiques non prélevés.

2.12. Comptage de la radioactivité dans les différents organes.

La radioactivité dans chaque organe et tissu est mesurée à l'aide d'un compteur Gamma (Wallac Wizard Robotic Gamma Counter). À partir de cette valeur, nous calculons pour chaque organe : (1) Le pourcentage de la dose totale injectée retrouvé dans chaque organe et (2) l'activité spécifique, c'est-à-dire, la dose par gramme d'organe qui représente l'affinité des organes pour les vésicules de Kobayashi ou pour les nanoérythroosomes.

$$(1) \% \text{ dose totale} \quad : \quad \frac{\text{CPM Organe}}{\text{CPM Injecté}} \times 100\%$$

$$(2) \text{ Activité spécifique} \quad : \quad \frac{\text{CPM Organe}}{\text{Poids de l'Organe (g)}}$$

Le pourcentage de la dose totale injectée est calculé pour le sang, le cœur, les poumons, le foie, la rate, les reins, l'estomac, le petit intestin, la queue, la glande thyroïde et la carcasse. Pour la carcasse, nous ajoutons à la carcasse l'activité des fragments de peau, os, muscles et ganglions lymphatiques qui ont été prélevés afin de calculer l'activité spécifique de ces tissus. On ne peut pas calculer l'activité totale contenue dans la peau, les muscles, les os et les ganglions lymphatiques car on ne connaît pas le poids de ces organes.

2.13. Analyse des résultats.

À partir de la mesure de la radioactivité dans les organes en fonction du temps, nous avons établi :

- 1) La cinétique d'élimination sanguine qui est le pourcentage de vésicules que l'on retrouve dans le sang en fonction du temps. Cette cinétique nous indique la vitesse à laquelle les vésicules sont éliminées de la circulation sanguine, c'est-à-dire la vitesse de captation de ces vésicules par les organes.

- 2) La cinétique d'élimination des vésicules de l'organisme au complet, c'est-à-dire la quantité de vésicules ou de produits de dégradation qui sont présents dans toute la souris en fonction du temps. Si cette quantité de vésicules diminue rapidement, cela signifie que les vésicules sont rapidement dégradées et éliminées.

- 3) La biodistribution en fonction du temps qui nous donne des informations sur deux aspects qui sont premièrement, l'affinité de chaque organe pour les vésicules et deuxièmement, la rapidité avec laquelle chaque organe dégrade les vésicules.

2.13.1. Analyse statistique des résultats.

La courbe qui représente la cinétique des vésicules dans un organe donné, c'est-à-dire la quantité de vésicules dans cet organe en fonction du temps est la résultante de deux facteurs : la vitesse de captation des vésicules ainsi que la vitesse de dégradation et d'élimination des vésicules par cet organe. La captation est rapide dans les premières minutes après l'injection. Par la suite, la vitesse de dégradation devient supérieure à la vitesse de captation. Afin de

comparer les cinétiques de captation et de dégradation de différents types de vésicules, nous avons vérifié 3 aspects en utilisant deux tests statistiques :

- 1) Y a-t-il une différence significative entre la quantité de vésicules dans un organe donné, pour différentes préparations de vésicules, 30 minutes après l'injection?

Cette comparaison a été faite en utilisant le test-t (intervalle de confiance de 95%) de comparaison des moyennes de deux petits échantillons indépendants. Nous nous basons sur la valeur p qui est le niveau de signification observé. Cette valeur de p décide s'il faut rejeter ou non l'hypothèse que les moyennes des deux petits échantillons comparés sont les mêmes ($\mu_1 = \mu_2$). C'est la probabilité qu'un résultat statistique aussi extrême que celui observé puisse survenir si l'hypothèse de $\mu_1 = \mu_2$ est vraie. Si la valeur de p est plus petite que 0.05, l'hypothèse que les deux moyennes sont semblables est rejetée.

- 2) Y a-t-il une différence significative entre les différentes courbes de cinétique de 2 à 48 heures après l'injection? Pendant cette période de temps, la vitesse de dégradation est le facteur prédominant.

- 3) Y a-t-il une différence significative entre les courbes de cinétique sur toute la période de temps, c'est-à-dire entre 30 minutes et 48 heures?

La comparaison des courbes de cinétique a été faite par le test de l'analyse de variance à deux facteurs (intervalle de confiance de 95%). Les deux facteurs qui sont simultanément testés (facteurs fixes) sont le temps et le type de vésicules alors que la variable dépendante est le pourcentage de la dose, ou l'activité spécifique. Ce test donne aussi une valeur de p et si elle est plus petite que 0.05, nous rejetons que les deux courbes comparées soient semblables.

Le test-t et l'analyse de variance à 2 facteurs ont été faits en utilisant le programme de statistiques SPSS.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1. Mise au point de la technique de préparation des vésicules de Kobayashi pour les besoins de nos expériences.

Kobayashi et coll. ont étudié la physique de l'interaction entre les lipides, principalement le DLPC, et les érythrocytes; interaction qui conduit à la formation de petites vésicules que nous avons nommées les *vésicules de Kobayashi*. Cependant, la méthode originale de préparation des vésicules de Kobayashi n'est pas adaptée à des utilisations *in vivo* car les préparations obtenues selon le protocole original de Kobayashi ne sont pas stériles. Nous avons donc dû adapter la méthode originale afin d'obtenir des préparations stériles.

De plus, Kobayashi et coll. n'ont pas cherché à déterminer quelles sont les conditions optimales pour obtenir le meilleur rendement en vésicules. Nous avons donc dû aussi modifier les conditions de préparations afin d'obtenir le meilleur rendement de formation des vésicules.

3.1.1. Optimisation du rendement.

La méthode de préparation des vésicules de Kobayashi consiste à mettre en contact les érythrocytes avec un lipide, le DLPC. Il se forme alors par bourgeonnement des érythrocytes, des petites vésicules. Ces vésicules sont séparées du restant des érythrocytes et des lipides qui n'ont pas réagi, par centrifugation. Une purification supplémentaire est effectuée par chromatographie sur colonne de sépharose.

Comme il n'est pas possible de déterminer facilement le nombre de vésicules dans une solution car elles sont trop petites pour être comptées au microscope optique, le dosage en protéines et l'activité de l'acétylcholinestérase associée à ces vésicules, sont les deux critères que nous avons utilisés pour évaluer rapidement le rendement.

Le tableau 2 montre les résultats des dosages de protéines et de l'acétylcholinestérase, ainsi que l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase des érythrocytes (solution de 10^{10} érythrocytes/mL). Ces valeurs sont celles auxquelles les vésicules de Kobayashi sont comparées.

Tableau 2. Caractéristiques des érythrocytes (10^{10} érythrocytes/mL).

Dosage des protéines	(mg/mL)	300 ± 10
Dosage de l'acétylcholinestérase	($\Delta DO/mg \cdot mL$)	17.0 ± 0.5
Activité spécifique de l'acétylcholinestérase	($\Delta DO/mg \cdot min$)	0.057 ± 0.003

Ces valeurs sont des moyennes \pm l'écart-type de 10 échantillons.

Afin de déterminer les conditions expérimentales optimales, nous avons étudié l'influence de trois facteurs sur le rendement : la quantité de lipides nécessaire pour induire la vésiculation des érythrocytes, la température, et le temps d'incubation des érythrocytes avec les lipides.

3.1.1.1. Influence de la température d'incubation sur le rendement.

Le premier facteur étudié afin d'optimiser le rendement de formation des vésicules de Kobayashi est la température à laquelle les lipides et les érythrocytes sont incubés. Nous avons comparé deux températures d'incubation qui sont $22^{\circ}C$ (température pièce) et $37^{\circ}C$. Ces deux températures ont été choisies car $37^{\circ}C$ est la température corporelle et $22^{\circ}C$ est la température ambiante qui est commode car elle ne demande pas l'utilisation d'un incubateur. En dessous de $22^{\circ}C$, le temps d'attente est beaucoup plus long avant que les vésicules ne se forment et au-delà de $37^{\circ}C$, les érythrocytes sont sujets à des altérations telles que la peroxydation des

lipides et la dénaturation de l'hémoglobine. Le tableau 3 présente les résultats obtenus.

Tableau 3. Dosage des protéines et de l'acétylcholinestérase pour des préparations incubées à 22°C et 37°C.

	Essais a 22°C	Essais à 37°C
Dosage protéines (mg/mL)	0.85± 0.06	0.69 ± 0.1
Dosage Acétylcholinestérase (Δ DO/min•mL)	1.71 ± 0.2	1.1 ± 0.1
Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (Δ DO/mg•min)	2.01 ± 0.3	1.7 ± 0.3
Enrichissement par rapport aux érythrocytes	35.1 ± 5.6	29.8 ± 5.5

9mL de DLPC (111 μ M) et 1mL d'érythrocytes (10¹⁰ érythrocytes/mL) ont été mélangés à 22°C et à 37°C. La concentration en protéines et l'activité de l'acétylcholinestérase ont été dosées dans les préparations de vésicules de Kobayashi obtenues.

Ces valeurs sont des moyennes \pm l'écart-type de 15 échantillons.

La quantité de protéines et l'activité de l'acétylcholinestérase ont des valeurs très proches que l'incubation ait lieu à 22°C ou à 37°C. Nous avons donc effectué un test statistique (test-t) pour voir s'il existe une différence significative entre les préparations de vésicules à 22°C et à 37°C. Ce test montre que les valeurs de dosages des protéines ($p < 0.05$), de l'acétylcholinestérase ($p < 0.05$), de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase ($p < 0.05$) ainsi que de l'enrichissement par rapport aux érythrocytes ($p < 0.05$) sont plus élevées à 22°C qu'à 37°C. La température d'incubation sera donc de 22°C pour les expériences futures.

3.1.1.2. Influence du rapport lipides/érythrocytes sur le rendement.

Le deuxième facteur étudié est la quantité de lipides nécessaire pour induire la vésiculation des érythrocytes. Pour induire la formation des vésicules, Kobayashi et coll. ont mélangé 1 μ mole de lipides, contenus dans 9mL, avec 10¹⁰érythrocytes, contenus dans 1mL, ce qui donnait comme concentration finale : 100 μ M de lipides et 10¹⁰érythrocytes/mL. Ils ont obtenu des vésicules dans ces conditions expérimentales, mais les auteurs n'ont pas précisé si ces conditions sont optimales.

D'autre part, comme nous devons travailler dans des conditions stériles, nous avons dû filtrer les suspensions de lipides, ce qui entraîne une perte de lipides. Nous avons mesuré par turbidimétrie cette perte due à la filtration. Elle est de 10%. Cette valeur est en accord avec la littérature pour le même type de filtre (Freise & coll., 1979). Nous avons donc tenu compte de cette perte de 10% en lipides lors de la filtration et les concentrations en lipides indiquées dans les résultats sont celles après filtration. Nous avons donc incubé, à 22°C, 1mL d'érythrocytes (10¹⁰érythrocytes) avec 9mL de lipides (concentrations variant entre 9 et 450 μ M). Le tableau 4 présente les résultats de dosage des protéines et de l'acétylcholinestérase dans les préparations.

Tableau 4. Influence de la quantité de lipides sur le rendement en vésicules de Kobayashi.

Concentration en lipides (μM)	9	22.5	67.5	81	90	100	112.5	225	450
Volume de lipides (mL)	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Quantité de lipides (μmoles)	0.08	0.2025	0.61	0.73	0.81	0.90	1.0125	2.025	4.05
Nombre de molécules de lipides par érythrocyte ($\times 10^7$)	0.5	1.2	3.7	4.4	4.9	5.4	6.1	12.2	24.4
Dosage en protéines (mg/mL)	---	0.50 ± 0.03	0.85 ± 0.06	0.91 ± 0.06	0.95 ± 0.04	1.06 ± 0.11	1.07 ± 0.07	0.38 ± 0.04	0.23 ± 0.03
Dosage de l'acétylcholinestérase (DO/min•mL)	---	0.25 ± 0.02	1.37 ± 0.06	1.52 ± 0.1	1.57 ± 0.12	1.79 ± 0.06	2.01 ± 0.10	0.18 ± 0.03	0.09 ± 0.02
Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (DO/min•mg)	---	0.50 ± 0.05	1.61 ± 0.13	1.67 ± 0.16	1.65 ± 0.14	1.69 ± 0.18	1.88 ± 0.15	0.47 ± 0.09	0.40 ± 0.09
Enrichissement par rapport aux érythrocytes	---	8.77 $\pm 0.99x$	28.24 $\pm 2.72x$	29.30 $\pm 3.20x$	28.95 $\pm 2.95x$	29.65 $\pm 3.47x$	32.98 $\pm 3.22x$	8.2 $\pm 1.72x$	7.02 $\pm 1.63x$

Ces valeurs sont des moyennes \pm l'écart-type de 15 échantillons.

Nous n'avons pas constaté de formation de vésicules en utilisant une concentration de $9\mu\text{M}$ de lipides. Pour des concentrations de 22.5, 225 et $500\mu\text{M}$, il y a eu formation de vésicules, mais le rendement est très faible. Il y a eu formation d'une quantité importante de vésicules pour des concentrations de lipides de 67.5, 81, 90, $100\mu\text{M}$ et $112.5\mu\text{M}$. D'après les résultats présentés au tableau 4, le meilleur rendement est obtenu en utilisant soit $100\mu\text{M}$ de lipides ou $112.5\mu\text{M}$ de lipides. Afin de déterminer, entre les deux conditions, quelle est la concentration en lipide qui donne le meilleur rendement de formation de vésicules, nous avons effectué le test-t entre les valeurs de dosages obtenues, pour $100\mu\text{M}$ et $112.5\mu\text{M}$. Les résultats du test-t montrent qu'il n'y a pas de différence significative pour le dosage des protéines ($p>0.05$), mais qu'il y a plus d'acétylcholinestérase, une plus grande activité spécifique de l'acétylcholinestérase et un plus grand enrichissement par rapport aux érythrocytes ($p<0.05$) pour les préparations faites avec $112.5\mu\text{M}$ de lipides. Par conséquent, le meilleur rendement de formation des vésicules de Kobayashi est obtenu lorsque nous mélangeons 9mL de lipides à $112.5\mu\text{M}$ avec 1mL d'érythrocytes (10^{10} érythrocytes/mL). Nous utiliserons donc par la suite cette concentration en lipides. Kobayashi et collaborateurs utilisaient une concentration de $111\mu\text{M}$, ce qui est à peu près la même valeur. Peut-être

ont-ils fait une étude du rendement sans l'avoir mentionné dans leurs publications.

3.1.1.3. Influence du temps d'incubation entre les lipides et les érythrocytes sur le rendement.

Dans cette expérience, nous avons déterminé quel temps d'incubation entre les lipides et les érythrocytes donne le meilleur rendement. Nous avons donc incubé à 22°C les érythrocytes avec des concentrations de 112.5µM de lipides pendant 15, 30, 45 et 90 minutes. Une fois les vésicules formées et isolées, nous avons dosé les protéines et l'activité de l'acétylcholinestérase dans les préparations et nous avons calculé l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase ainsi que l'enrichissement par rapport aux érythrocytes. Le tableau 5 résume les résultats obtenus.

Après 15 minutes d'incubation, il y a formation d'une faible quantité de vésicules. Nous notons que les préparations incubées 30 minutes sont plus riches en protéines, ont une plus grande activité de l'acétylcholinestérase, une plus grande activité spécifique de l'acétylcholinestérase ainsi qu'un plus grand enrichissement par rapport aux érythrocytes que celles incubées 45 minutes.

Tableau 5. Détermination du temps d'incubation donnant le meilleur rendement en vésicules.

	112.5 μ M 15 min	112.5 μ M 30 min	112.5 μ M 45 min	112.5 μ M 90 min
Dosage des protéines (mg/mL)	0.45 \pm 0.06	1.02 \pm 0.10	0.85 \pm 0.05	---
Dosage de l'acétylcholinestérase (Δ DO/min•mL)	0.25 \pm 0.02	1.92 \pm 0.13	1.27 \pm 0.09	---
Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (Δ DO/mg•min)	0.56 \pm 0.09	1.88 \pm 0.22	1.49 \pm 0.14	---
Enrichissement par rapport aux érythrocytes	9.82 \pm 1.61x	32.98 \pm 3.93x	26.14 2.77x	---

Ces valeurs sont des moyennes \pm l'écart-type de 15 échantillons.

Aucune vésiculation n'est observée lorsque l'incubation dure 90 minutes car il se produit une forte hémolyse, due à la destruction des vésicules. Nous avons aussi remarqué ce phénomène lorsque le rapport lipides/érythrocytes est grand. Kobayashi et coll. ont aussi fait cette observation. Lors du contact entre les lipides et les érythrocytes, il y a changement de morphologie des érythrocytes qui passent de sphériques à crénelées. Ce changement a été mis en évidence par Ott et coll. (1981) et est une étape qui précède la vésiculation des érythrocytes. Cependant, un contact trop long entre les lipides et les érythrocytes, ou une quantité trop grande de lipides par rapport aux érythrocytes provoque l'éclatement des érythrocytes et la sortie de l'hémoglobine. Il n'y a alors pas de formation de vésicules.

3.1.1.4. Résumé des conditions optimales pour la préparation des vésicules de Kobayashi.

Les essais de température, de temps d'incubation ainsi que de rapport érythrocytes/lipides ont permis d'établir les conditions optimales de préparation. Le protocole final pour préparer les vésicules est le suivant :

Incuber 9mL de lipides, 112.5 μ M, avec 1mL d'érythrocytes qui contient 10¹⁰érythrocytes et laisser incuber 30 minutes à température de la pièce (environ 22°C). Une fois l'incubation terminée, les vésicules sont séparées des restants d'érythrocytes et de lipides par une première centrifugation à 500g x 10minutes qui élimine les restants d'érythrocytes. Le surnageant est centrifugé à 20000g x 18minutes afin de séparer les vésicules des lipides qui n'ont pas réagit. Les vésicules sont ensuite purifiées sur colonne de sépharose Cl 4B. Les détails sont donnés dans le chapitre II. Le tableau 6 résume les caractéristiques des préparations obtenues dans les conditions expérimentales optimales.

Tableau 6. Caractéristiques des vésicules de Kobayashi préparées dans les conditions optimales.

Dosage protéines	(mg/mL)	1.00 \pm 0.15
Dosage de l'acétylcholinestérase	(DO/min•mL)	1.87 \pm 0.2
Activité spécifique de l'acétylcholinestérase	(DO/mg•min)	1.87 \pm 0.34
Enrichissement par rapport aux érythrocytes		32.81 \pm 6.29x

Ces valeurs sont des moyennes \pm l'écart-type de 20 échantillons.

3.1.2. Vérification de la morphologie des vésicules de Kobayashi au microscope électronique.

Afin de vérifier l'aspect des vésicules, c'est-à-dire vérifier si ce sont des vésicules fermées ou des fragments de membranes, nous avons observé les vésicules de Kobayashi, préparées selon la méthode que nous avons mis au point, par microscope électronique à transmission. Nous pouvons aussi déterminer leur diamètre ainsi que leur forme. La figure 25 montre une photo des vésicules de Kobayashi colorées négativement à l'acétate d'uranium 1%.

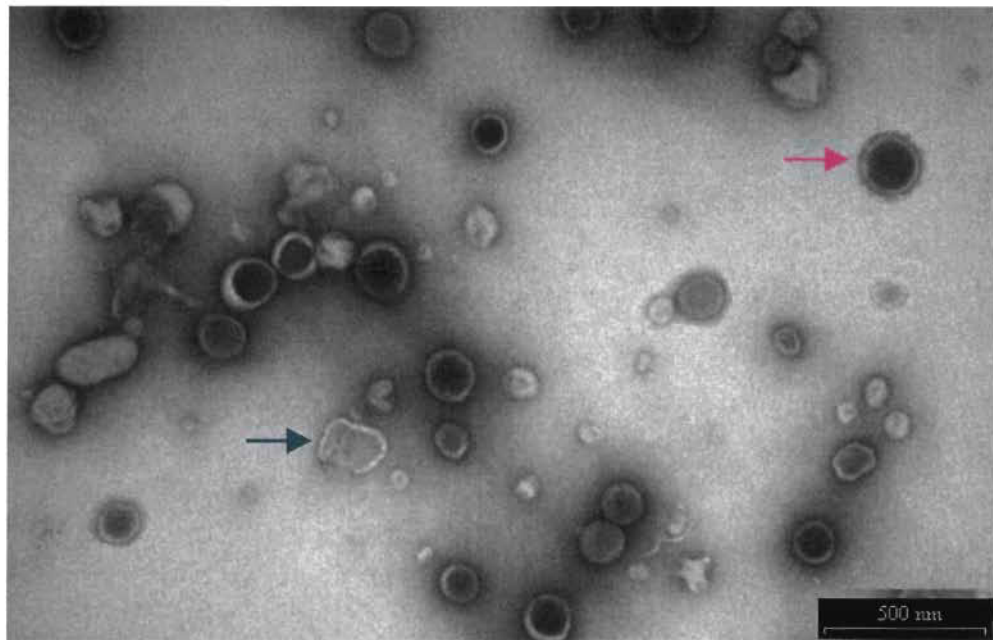


Figure 25. Photographie de vésicules de Kobayashi prise par microscopie électronique à transmission. (Grossissement = 36000x)

La flèche rose indique une vésicule de Kobayashi fermée et ronde.
La flèche verte indique un fragment de vésicule ouverte

Les vésicules de Kobayashi ont une forme généralement sphérique. Quatre-vingt-dix-sept pour-cent de toutes les vésicules sont fermées. La figure 26 montre l'histogramme de la répartition de la taille des vésicules. Le diamètre moyen est de 129 ± 31 nm.

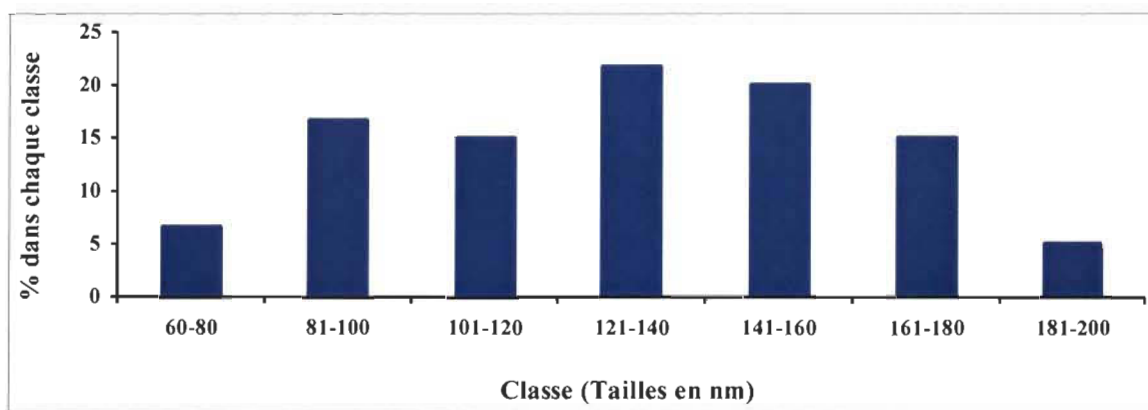


Figure 26. Histogramme de la répartition de la taille des vésicules de Kobayashi.

On remarque qu'il y a une population de vésicules qui a un diamètre petit (60 à 80 nm). Nous ne pouvons distinguer si ce sont de très petites vésicules de Kobayashi ou si ce sont des liposomes de DLPC utilisés pour induire la vésiculation et qui n'ont pas été éliminés lors de la purification des préparations.

La figure 27 montre une préparation de vésicules de Kobayashi à plus fort grossissement.

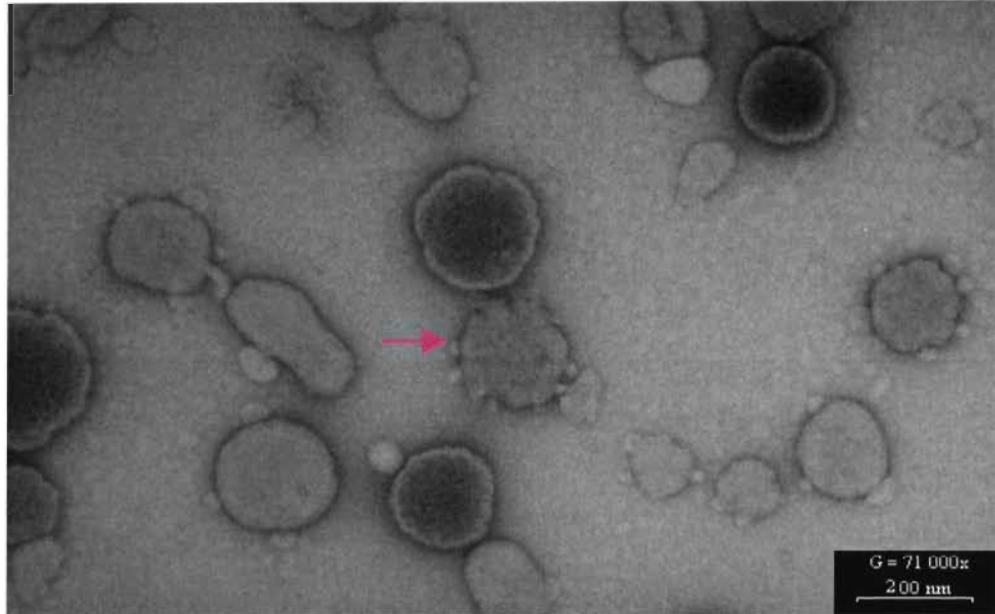


Figure 27. Photographie à plus fort grossissement de vésicules de Kobayashi.
(Grossissement = 71000x)

La flèche rose indique une vésicule de Kobayashi qui est soit en cours de fragmentation ou qui fusionne avec des liposomes de DLPC.

Nous pouvons voir que de très petites vésicules sont souvent collées aux vésicules de Kobayashi. Il se pourrait que ce soit des liposomes qui n'ont pas été éliminés lors de la purification et qui fusionnent, ou sont simplement collés aux vésicules de Kobayashi, ou encore qu'il s'agisse de vésicules de Kobayashi qui vésiculisent spontanément. Ce phénomène de vésiculation spontanée est connu chez les érythrocytes matures. On ignore si ce phénomène se produit chez les vésicules de Kobayashi, mais on ne peut pas en écarter la possibilité.

3.2. Marquage des vésicules de Kobayashi à l'iode-125.

Les vésicules de Kobayashi, une fois purifiées, sont marquées à l'iode-125 à l'aide de l'iodo-GEN®. L'iodation permet de suivre les vésicules après injection intraveineuse. Une fois les vésicules marquées, il reste toujours de l'iode libre qui n'a pas réagi et cet iode, non attaché aux vésicules, doit être éliminé. Cet iode libre a été éliminé par dialyse. Le pourcentage d'iode-125 qui s'est fixé aux vésicules de Kobayashi est calculé en mesurant la radioactivité dans la préparation de vésicules. Le pourcentage de marquage est obtenu en divisant la quantité d'iode attachée aux vésicules après dialyse par la quantité totale d'iode ajoutée.

$$\frac{\text{Radioactivité dans la solution après dialyse en CPM}}{\text{Radioactivité dans la solution avant dialyse en CPM}} \times 100\%$$

De plus, à la fin de la dialyse, nous prélevons un aliquot de la préparation de vésicules marquées à l'iode-125 et nous effectuons une chromatographie sur couche mince afin de déterminer la pureté de la solution finale, c'est-à-dire déterminer quelle est la proportion de l'iode-125 libre qui n'a pas été éliminé par la dialyse. La pureté finale de la solution déterminée par chromatographie, est calculée d'après la formule suivante :

$$\frac{\text{Radioactivité liée aux vésicules en CPM (point de dépôt)}}{\text{Radioactivité totale en CPM sur toute la bandelette}} \times 100\%$$

Le pourcentage d'iode attaché aux vésicules et la pureté de la préparation de vésicules de Kobayashi sont présentés au tableau 7.

Tableau 7. Caractéristiques du marquage des vésicules de Kobayashi.

I-125 Ajouté (μCi)	I-125 total récupéré dans le dialysat (μCi)	I-125 lié aux vésicules (μCi)	% d'iode attaché aux vésicules	Pureté de la préparation finale de vésicules (%) *
50 ± 7	37 ± 5	13 ± 3	$20,4 \pm 1,9$	98 ± 2

* Pourcentage déterminé par chromatographie sur couche mince.

Ces valeurs sont des moyennes \pm l'écart-type de 20 échantillons.

3.2.1. Étude de la stabilité du marquage des vésicules à l'iode-125.

Le but de cette expérience est de déterminer si l'iode-125 se détache spontanément des vésicules de Kobayashi. Nous voulons suivre les vésicules de Kobayashi dans les souris. Or, ce que nous détectons avec le compteur de radioactivité, c'est l'iode-125 et non les vésicules. Si l'iode se détache, nous ne suivrons plus ces vésicules, mais l'iode-125 libéré. Pour que cette méthode soit valable, il faut que l'iode-125 soit fixé aux vésicules de Kobayashi de manière stable. Afin de vérifier la stabilité du marquage des vésicules, nous avons incubé deux préparations de vésicules de Kobayashi, la première à 22°C dans du tampon PBS et la deuxième à 37°C dans du sérum de souris. Des

aliquots sont pipetés en fonction du temps et une chromatographie sur couche mince est effectuée afin de séparer l'iode libre des vésicules. La figure 28, représente la cinétique de décrochage de l'iode-125 de la membrane en fonction du temps d'incubation, à 22°C et 37°C.

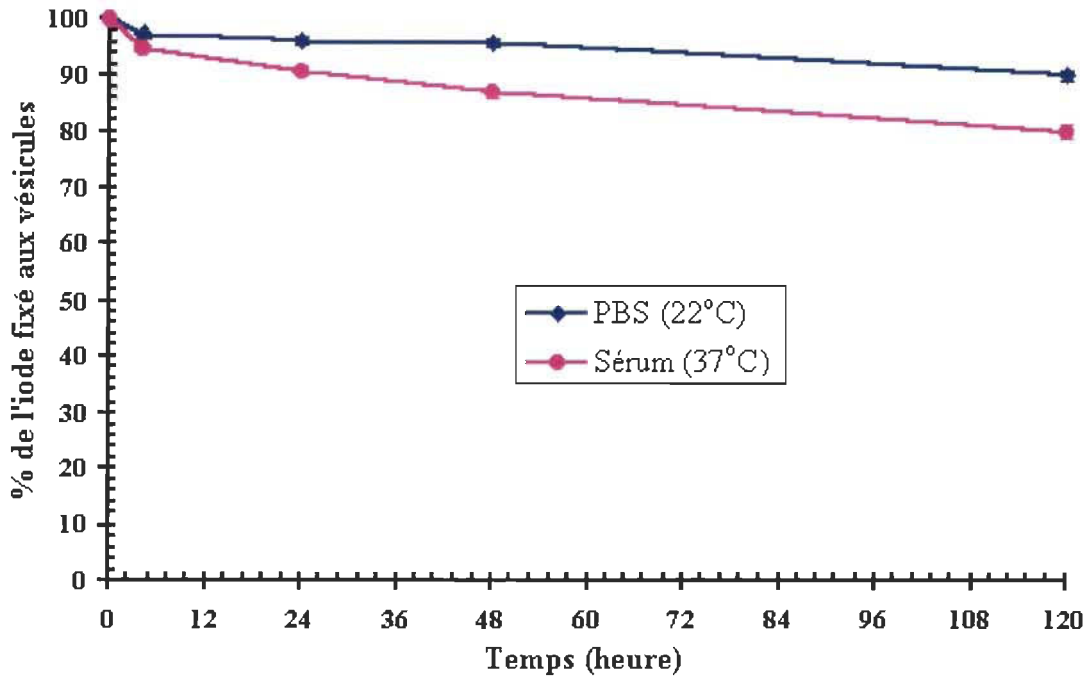


Figure 28. Cinétique de décrochage de l'iode-125 des vésicules de Kobayashi.

Chaque point représente une moyenne de trois échantillons \pm l'écart-type.

Nous pouvons constater sur cette figure que le marquage est relativement stable car après 24 heures, il y a respectivement 90 et 96% de l'iode-125 qui est resté attaché aux vésicules. Cinq jours après le marquage, environ 10% de l'iode initialement fixé aux vésicules s'est détaché lorsque les vésicules sont

incubées à 22°C dans du tampon phosphate salin et environ 20% lorsque les vésicules sont incubées à 37°C dans du sérum de souris.

L'iode demeure donc attaché aux vésicules de Kobayashi de manière suffisamment stable pour la durée de l'expérience, qui dure au maximum 4 jours. Par conséquent, la radioactivité que l'on mesure dans les organes après injection intraveineuse des vésicules de Kobayashi est majoritairement due à l'iode-125 lié aux vésicules ou à ses produits de dégradation par les cellules et très peu à de l'iode libre qui s'est détaché spontanément.

3.2.2. Biodistribution de l'iode-125 libre injecté par voie intraveineuse.

Après injection intraveineuse, les vésicules de Kobayashi marquées peuvent être dégradées par les tissus. De l'iode est donc libéré des vésicules et se retrouve libre en circulation. Le but de cette expérience est de différencier si la radioactivité retrouvée dans les organes est due aux vésicules marquées ou à l'iode-125 libre qui s'est détaché. Pour ce faire, nous avons injecté par voie intraveineuse de l'iode-125 libre à des souris. Après des temps déterminés (entre 30 minutes et 48 heures après injection), nous avons mesuré la quantité d'iode dans chaque organe.

La figure 29 représente le pourcentage de la quantité d'iode injectée retrouvé dans chaque organe en fonction du temps.

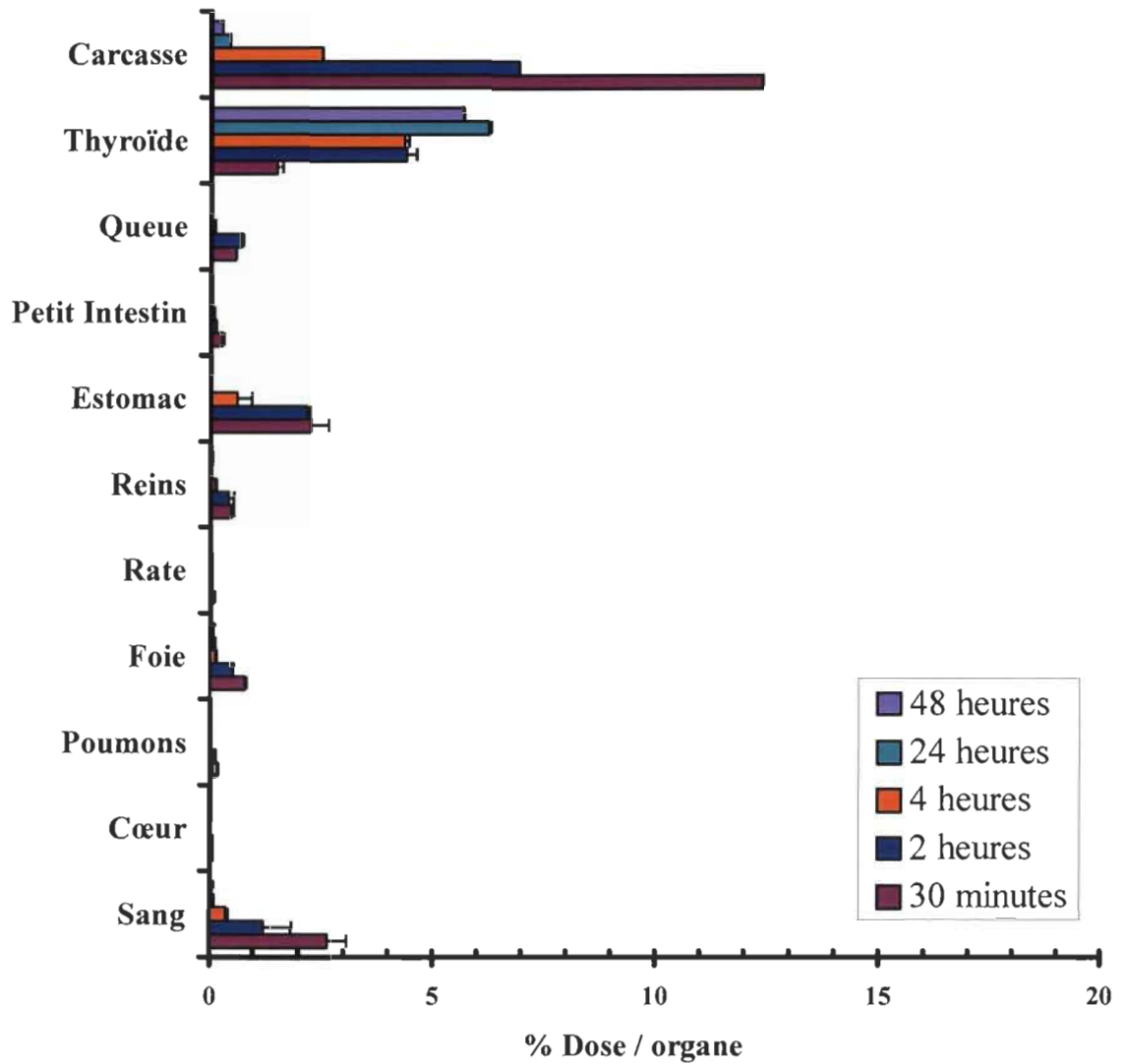


Figure 29. Distribution tissulaire de l'iode-125 injecté par voie intraveineuse.

La valeur de chaque barre correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

La première observation que nous pouvons faire sur ce graphique est que l'iode-125 se localise dans la thyroïde, la carcasse et l'estomac. On remarque une diminution de la radioactivité dans la carcasse et l'estomac en fonction du temps mais une augmentation au niveau de la thyroïde. Les autres organes ont peu de radioactivité. Ils ne captent donc pas l'iode libre.

Il y a beaucoup d'iode libre dans la carcasse, mais la carcasse a un poids élevé par rapport aux autres organes. Nous avons donc présenté, à la figure 30, l'activité spécifique de chaque organe pour l'iode libre, c'est-à-dire la quantité d'iode libre dans l'organe divisée par le poids de l'organe. Cette valeur, à 30 minutes, représente donc l'affinité d'un tissu pour l'iode.

On constate sur la figure 30 que l'organe qui a le plus d'affinité pour l'iode libre est la thyroïde. L'iode-125 libre est capté par la thyroïde jusqu'à saturation de la glande, soit durant 24 heures. Par la suite, l'activité spécifique diminue.

L'estomac a aussi une affinité pour l'iode-125, mais beaucoup plus faible. Ces résultats correspondent à ce qui est connu du métabolisme de

l'iode. La représentation de la dose par gramme de tissu (activité spécifique) montre de façon évidente que l'iode-125 n'a pas d'affinité pour la carcasse.

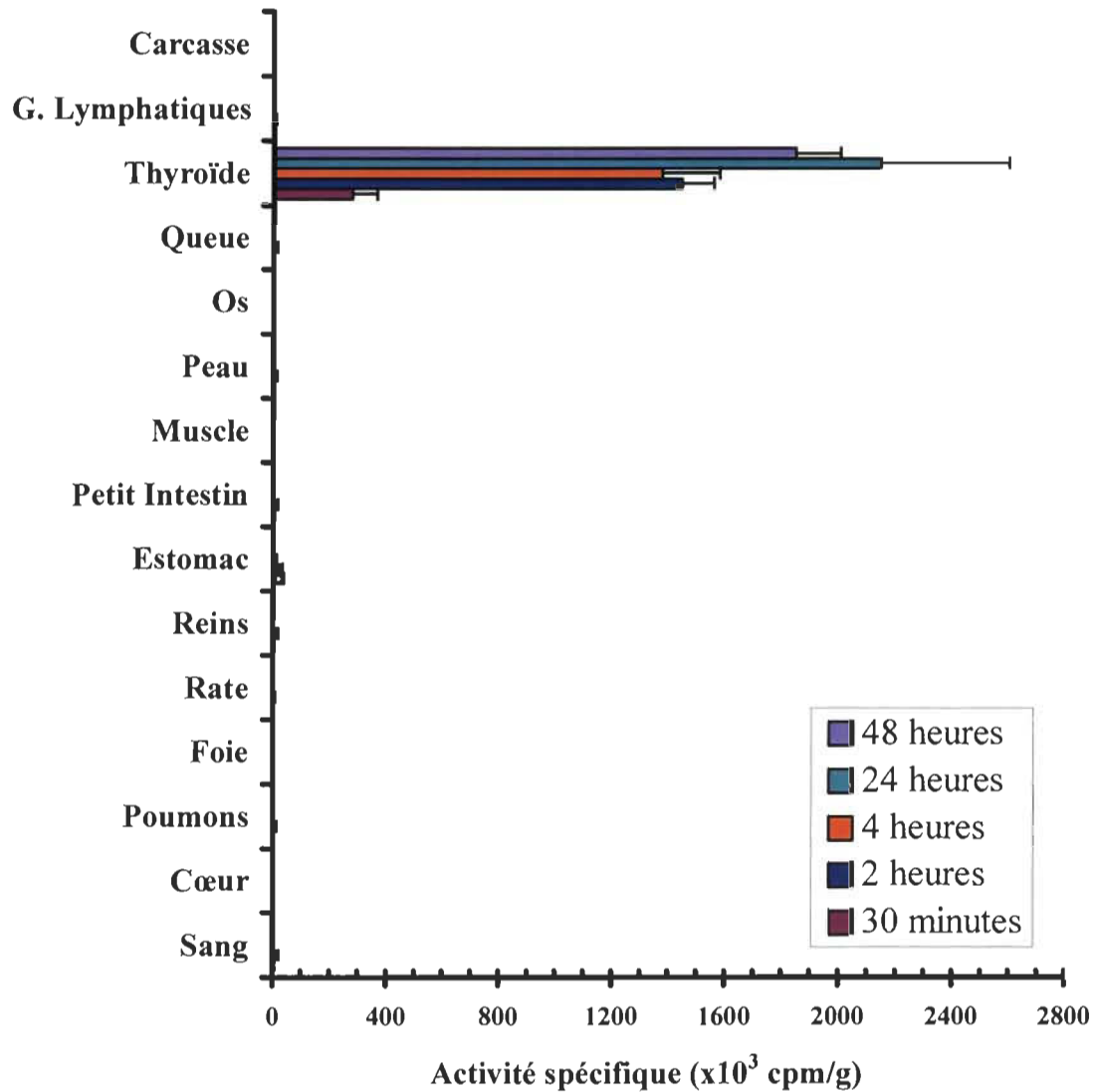


Figure 30. Activité spécifique de l'iode-125 dans les organes.

La valeur de chaque barre correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

La figure 31 représente le pourcentage de l'iode-125 qui a été injecté par voie intraveineuse, retrouvé dans toute la souris en fonction du temps.

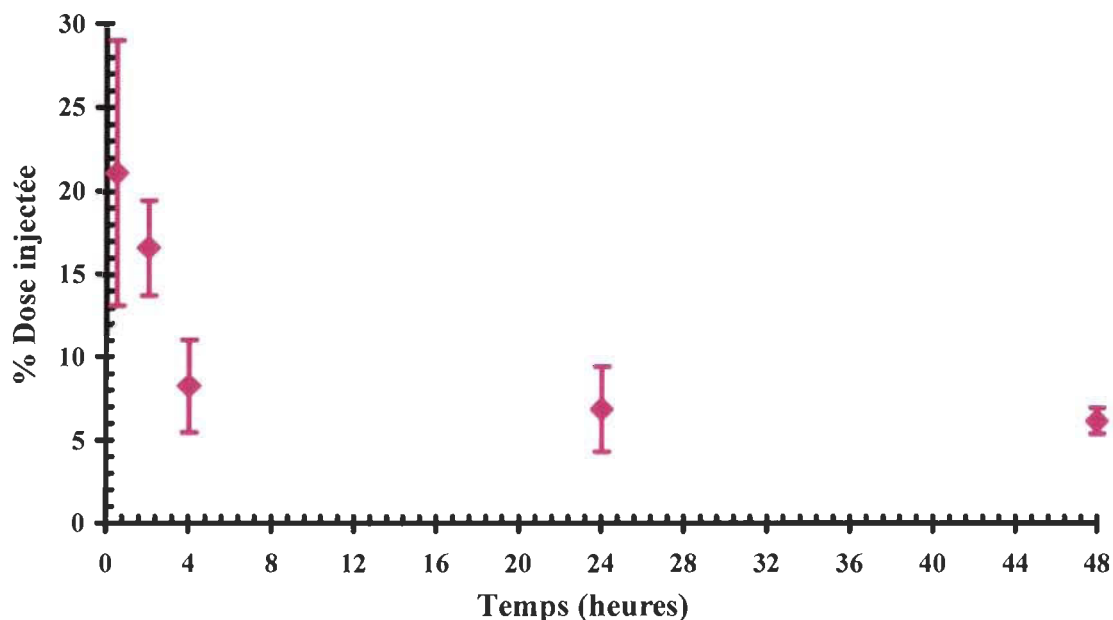


Figure 31. Cinétique d'élimination de l'organisme de l'iode-125 libre.

La valeur de chaque point correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

Nous voyons que 30 minutes seulement après l'injection, environ 20% de la dose injectée est encore dans la souris. Donc près de 80% de l'iode libre a été excrété après 30 minutes. Quarante-huit heures après injection, il ne reste que 6% de toute l'iode-125 libre injecté par voie intraveineuse qui n'a pas encore été excrété. En revenant à la figure 29 nous pouvons voir qu'une certaine quantité d'iode est retrouvée dans les reins. Cette radioactivité est probablement due à l'iode-125 libre qui va être éliminé dans l'urine. Nous

avons donc recueilli l'urine en plaçant un papier buvard dans la cage de la souris, et au moment de la dissection nous avons prélevé ce qui restait dans la vessie.

Nous avons compté la quantité d'iode dans l'urine et nous avons présenté à la figure 32 le pourcentage de la dose totale retrouvé dans l'urine en fonction du temps. Nous avons aussi recueilli les fèces de l'animal, mais la radioactivité comptée est très faible, presque nulle, donc l'iode-125 libre est très peu évacué par voie fécale.

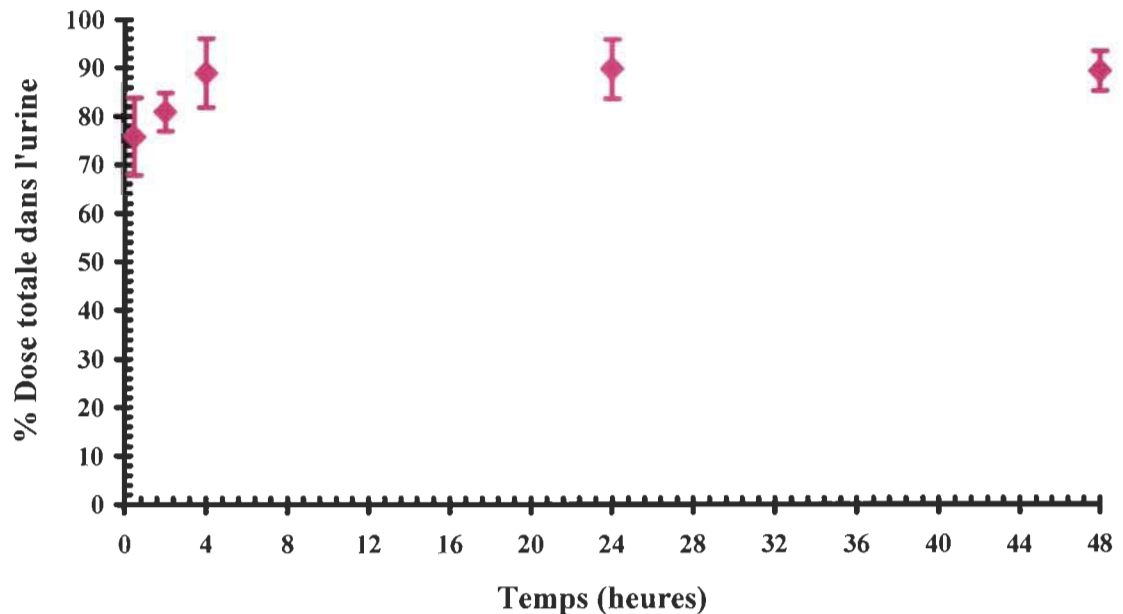


Figure 32. Cinétique d'excrétion de l'iode-125 libre dans l'urine.

La valeur de chaque point correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

D'après les figures 29, 30, 31 et 32, nous pouvons conclure que l'iode libre est rapidement éliminé par l'urine et le reste, capté par la thyroïde et l'estomac. Les autres organes n'ont aucune affinité pour l'iode.

Nous avons montré que l'iode-125 est lié aux vésicules de Kobayashi de manière stable. De plus, nous avons établi le profil de biodistribution et d'élimination de l'iode libre par la souris. Par conséquent, après injection intraveineuse des vésicules de Kobayashi, nous allons pouvoir suivre la localisation des vésicules de Kobayashi et différencier la radioactivité liée aux vésicules de celle de l'iode libre qui se sera détaché.

3.3. Étude de reproductibilité des résultats obtenus avec les nanoérythrocytes.

Au cours de ce travail, nous avons mis au point une méthode de préparation des vésicules de Kobayashi et étudié leur cinétique et leur biodistribution. Un des objectifs de notre travail est de comparer la cinétique et la biodistribution des vésicules de Kobayashi avec celles des nanoérythrocytes pour voir si les vésicules de Kobayashi ont une cinétique et une biodistribution différente de celles des nanoérythrocytes.

La cinétique et la biodistribution des nanoérythrocytes n'ont été faites que par un seul chercheur, Jean Désilets (thèse de doctorat, 2000). Nous avons donc, dans une première étape, répété une expérience faite par Jean Désilets afin de voir si l'expérimentateur influence les résultats. Nous avons donc préparé des nanoérythrocytes et nous les avons injectés à des souris selon le même protocole et les mêmes conditions que Jean Désilets. Nous avons déterminé leur cinétique et leur biolocalisation, puis comparé nos résultats à ceux de Jean Désilets.

3.3.1. Comparaison de la cinétique de dégradation des préparations de nanoérythrocytes de Jean Désilets et moi-même.

La figure 33 compare les cinétiques de dégradation, c'est-à-dire le pourcentage de la dose injectée restant dans la souris en fonction du temps, entre une préparation que nous avons faite et une préparation faite par Jean Désilets. Nous avons calculé le pourcentage retrouvé dans la souris en fonction du temps en excluant la radioactivité dans la thyroïde car cette activité est due à l'iode-125 libre. La courbe représentée par les étoiles bleues est la cinétique obtenue avec nos préparations de nanoérythrocytes alors que les losanges roses représentent les résultats obtenus par Jean Désilets.

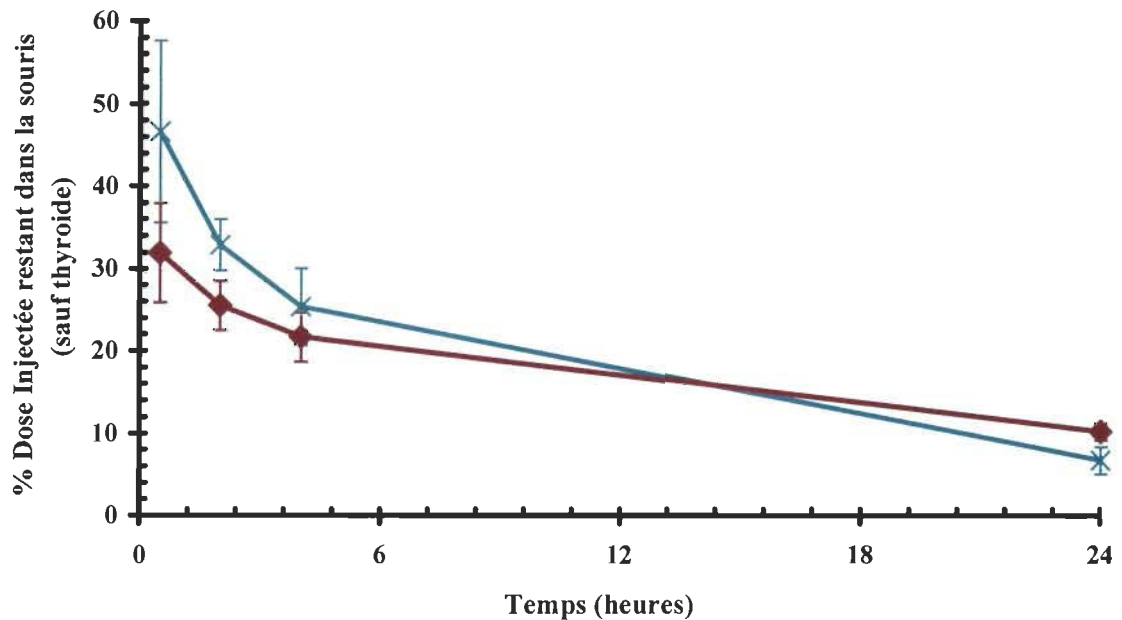


Figure 33. Comparaison des cinétiques de dégradation des nanoérythrocytes préparés par deux expérimentateurs.

- ◆ Préparations de nanoérythrocytes que Jean Désilets a préparé
- * Préparations de nanoérythrocytes que nous avons préparé

La valeur de chaque point correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

Nous pouvons remarquer que dans l'ensemble, les deux courbes sont assez semblables. Quelques petites différences peuvent être notées; durant les premières heures après injection, il reste dans les souris un peu plus de nanoérythrocytes de nos préparations que des préparations de Jean Désilets, alors que 24 heures après injection, c'est le contraire. Cependant, l'écart-type sur chaque point est assez grand. Nous avons donc effectué un test statistique d'analyse de variance à deux facteurs afin de déterminer si les deux courbes sont significativement différentes. L'analyse de variance à 2 facteurs fait avec

le programme SPSS ($p < 0.05$) montre que les deux courbes sont différentes. Cependant, avant de conclure sur l'effet qu'a l'expérimentateur sur les résultats, nous allons présenter la biodistribution.

3.3.2. Biodistribution des nanoérythrocytes.

La figure 34 permet de comparer la biodistribution, après 30 minutes, de nanoérythrocytes que nous avons préparé avec la biodistribution des nanoérythrocytes préparés par Jean Désilets. Nous pouvons noter que la biodistribution est semblable quel que soit l'expérimentateur. Seule la carcasse contient plus de nanoérythrocytes dans nos expériences que dans celles de Jean Désilets. Comme la carcasse est ce qui reste après que l'on ait enlevé tous les organes, il reste une quantité de sang qui est variable d'une fois à l'autre, la vessie n'est pas toujours vidée complètement et parfois la thyroïde n'est pas entièrement enlevée, car c'est une glande minuscule qui est peu visible. Ces restants d'organes contaminent donc la carcasse et en augmentent l'activité. Ceci se traduit par un écart-type important pour les valeurs de cet organe. La différence observée entre les nanoérythrocytes préparés par Jean Désilets et ceux que nous avons préparés peut s'expliquer par cet ensemble de facteurs.

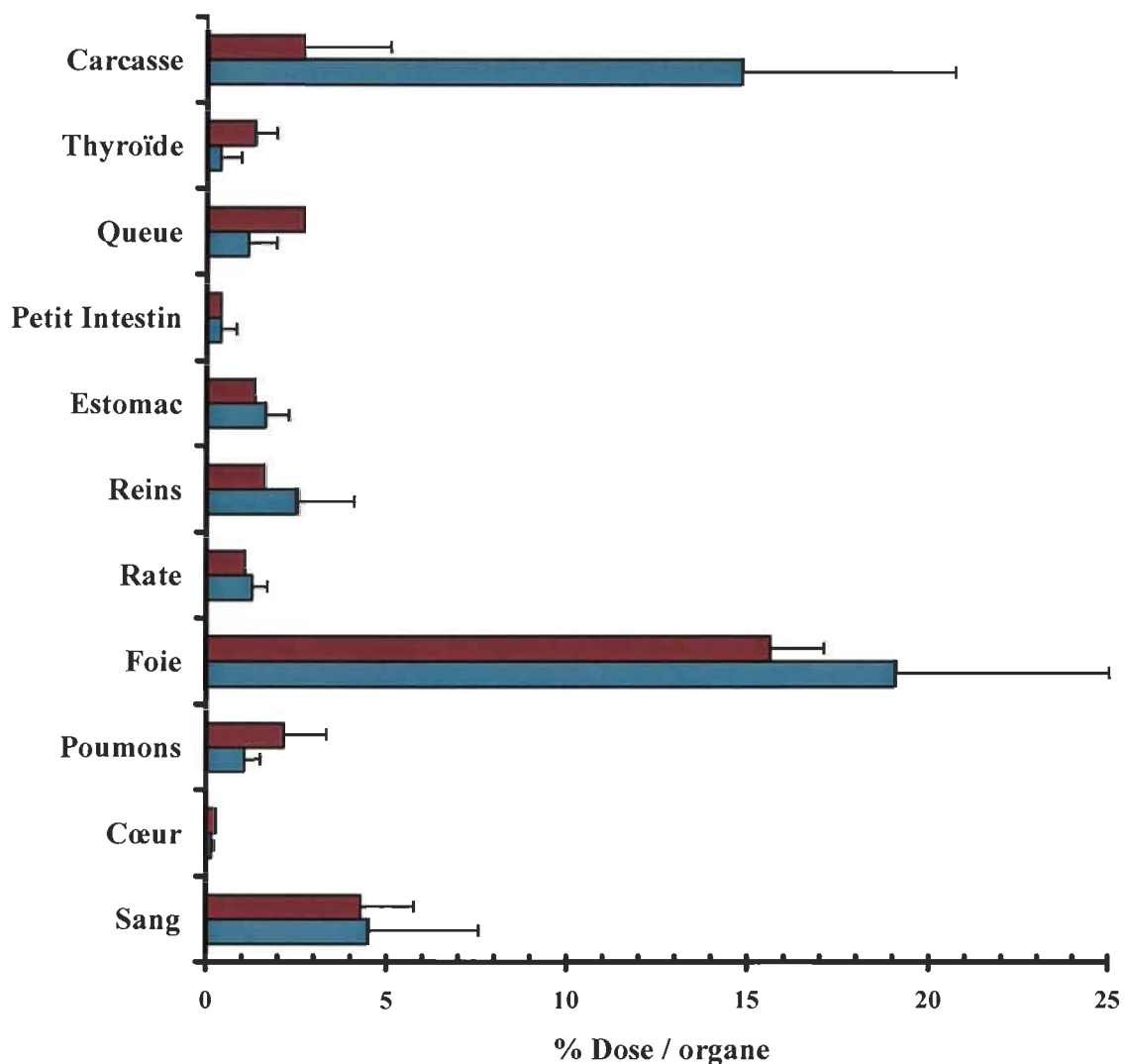


Figure 34. Comparaison de la biodistribution 30 minutes après injection, de nanoérythrocytes préparés par deux expérimentateurs.

■ Préparations de nanoérythrocytes que Jean Désilets a préparés
 ■ Préparations de nanoérythrocytes que nous avons préparés

La valeur de chaque barre correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience. Chaque souris a reçu par injection intraveineuse environ 50 μ g de protéines (nanoérythrocytes) en solution dans le PBS.

Entre 2 et 48 heures après injection (résultats non montrés), la seule différence significative de la biodistribution demeure au niveau de la carcasse. C'est cette différence qui fait que la cinétique de dégradation des nanoérythrocytes préparés par Jean Désilets diffère légèrement de la cinétique des nanoérythrocytes que nous avons préparé (figure 33). Comme c'est la seule différence, nous pouvons donc conclure que la personne qui effectue la préparation et l'injection des nanoérythrocytes a peu d'influence sur la cinétique et la biodistribution des nanoérythrocytes. Il sera donc possible de comparer les résultats que nous avons obtenus avec les vésicules de Kobayashi avec les résultats obtenus avec nos préparations de nanoérythrocytes et avec les résultats obtenus par Jean Désilets.

3.4. Comparaison de la cinétique et de la biodistribution des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.

La comparaison des cinétiques et de la biodistribution des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes a pour but de déterminer si les vésicules de Kobayashi demeurent plus longtemps en circulation, si elles sont moins rapidement détruites que les nanoérythrocytes, et par quels organes elles sont captées. Pour comparer les vésicules de Kobayashi aux nanoérythrocytes, il

faut injecter la même quantité de vésicules de Kobayashi et de nanoérythrocytes. Comme ce sont des vésicules différentes, qui ont des tailles différentes, et comme il n'est pas possible de les compter facilement, nous avons injecté la même quantité de protéines. Les conditions expérimentales sont identiques pour les deux types de préparations.

Dans une première étape, nous avons comparé la vitesse à laquelle les vésicules de Kobayashi et les nanoérythrocytes sont éliminés de la circulation sanguine. Dans une deuxième étape, nous avons établi la cinétique de dégradation des vésicules. La troisième étape est la distribution tissulaire des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.

3.4.1. Comparaison de la cinétique d'élimination des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes de la circulation sanguine.

La figure 35 compare les cinétiques des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes dans le sang. Ces courbes qui représentent la concentration des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes dans le sang montrent que leur concentration diminue rapidement et est à peu près nulle au bout de 48 heures. Cependant, les vésicules de Kobayashi sont éliminées moins rapidement que les nanoérythrocytes. Comme ces deux courbes sont assez

semblables, et que l'écart-type de chaque point est assez grand, nous avons fait une analyse de variance à deux facteurs afin d'établir si les deux courbes sont distinctes. L'analyse de variance montre que les deux courbes sont distinctes ($p < 0.05$).

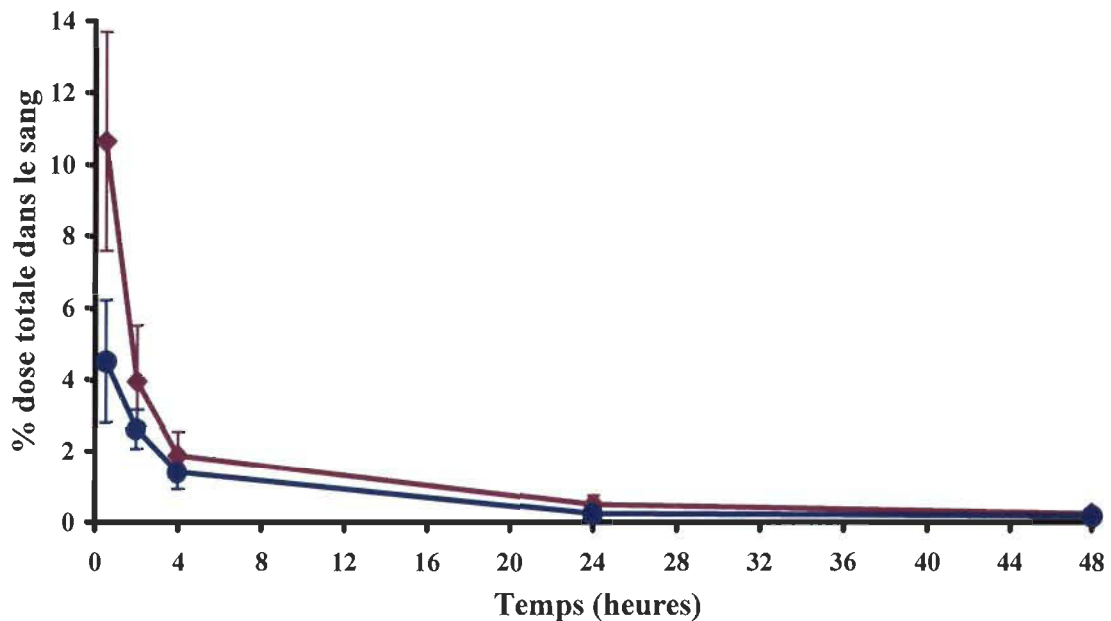


Figure 35. Comparaison des cinétiques d'élimination sanguine.

- ◆ Vésicules de Kobayashi
- Nanoérythrocytes

La valeur de chaque point correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

Trente minutes après injection, il reste près de 2 fois plus de vésicules de Kobayashi que de nanoérythrocytes en circulation et il reste toujours plus de vésicules de Kobayashi que de nanoérythrocytes dans le sang durant les 24 premières heures.

3.4.2. Comparaison des cinétiques de dégradation.

Le deuxième aspect que nous avons étudié est la vitesse à laquelle les deux types de vésicules, vésicules de Kobayashi et nanoérythroosomes, sont dégradés et éliminés de l'organisme de la souris.

La figure 36 compare le pourcentage des vésicules de Kobayashi ou de nanoérythroosomes qui reste dans l'organisme en fonction du temps, c'est-à-dire la radioactivité dans tout l'organisme, à l'exception de la thyroïde qui est due à l'iode-125 libre capté par la glande.

La figure 36 montre que de façon générale, il y a une diminution de la radioactivité retrouvée dans la souris en fonction du temps, donc que les vésicules de Kobayashi et les nanoérythroosomes sont dégradés et éliminés. Cependant, nous pouvons remarquer que la dégradation et l'élimination des vésicules de Kobayashi et des nanoérythroosomes ne se fait pas de la même façon, ni à la même vitesse. Premièrement, 30 minutes après injection, il reste environ 70% des vésicules de Kobayashi injectées dans la souris tandis qu'il ne reste qu'environ 45% des nanoérythroosomes injectés. Cette différence, vérifiée par un test-t ($p < 0.05$), est significative.

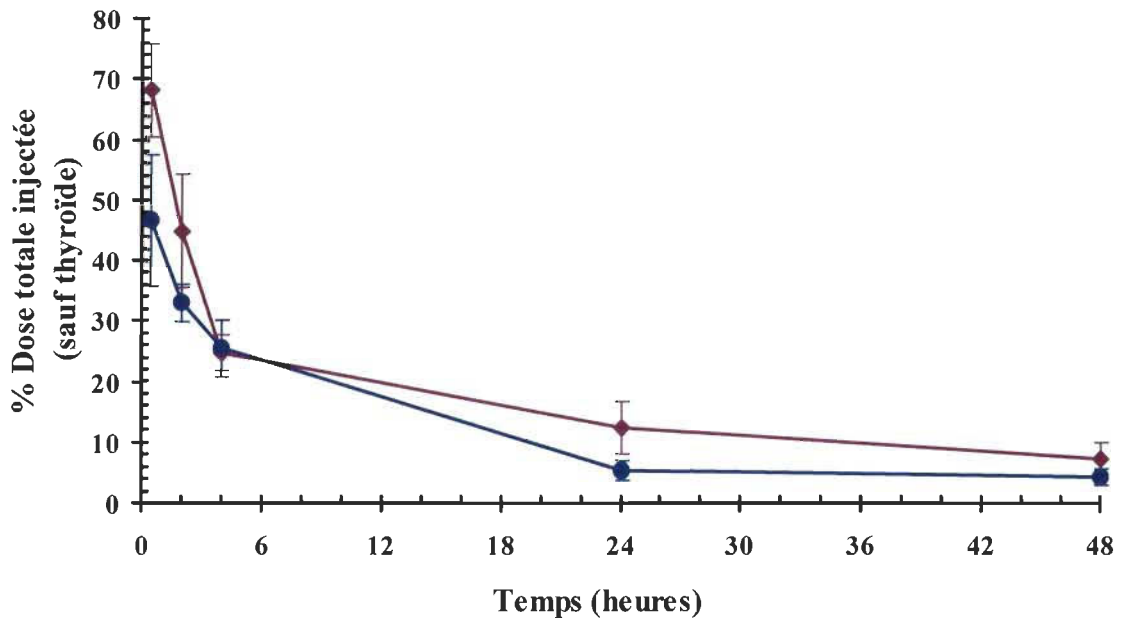


Figure 36. Comparaison des cinétiques de dégradation des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.

- ◆ Vésicules de Kobayashi
- Nanoérythrocytes

La valeur de chaque point correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

Deuxièmement, il reste le même pourcentage des deux types de vésicules injectées quatre heures après injection. Les vésicules de Kobayashi sont donc dégradées plus rapidement que les nanoérythrocytes durant les 4 premières heures après injection.

Troisièmement, à 24 et 48 heures, il semble qu'il reste plus de vésicules de Kobayashi que de nanoérythrocytes. Nous avons donc effectué un test-t

pour voir si ces différences sont significatives. Les résultats montrent qu'il y a près de deux fois plus de vésicules de Kobayashi que de nanoérythrocytes dans la souris 24 et 48 heures après l'injection ($p=0.01$ et $p=0.024$).

Nos résultats suggèrent donc que la cinétique de dégradation des vésicules de Kobayashi soit biphasique, mais vu le nombre limité de points sur la courbe, on ne peut pas affirmer que ce soit réellement le cas.

3.4.3. Comparaison de la biodistribution des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.

Dans une troisième étape, nous avons comparé la biodistribution des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes après injection intraveineuse.

Comme nous l'avons montré à la figure 35, les vésicules de Kobayashi et les nanoérythrocytes sont rapidement captés par les tissus. Nous avons alors comparé la biodistribution des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes afin de voir si un organe en particulier a plus d'affinité pour un des deux types de vésicules.

La figure 37 montre le pourcentage de la dose injectée qui est retrouvé dans chacun des organes et tissus 30 minutes après injection pour les vésicules de Kobayashi et les nanoérythrocytes.

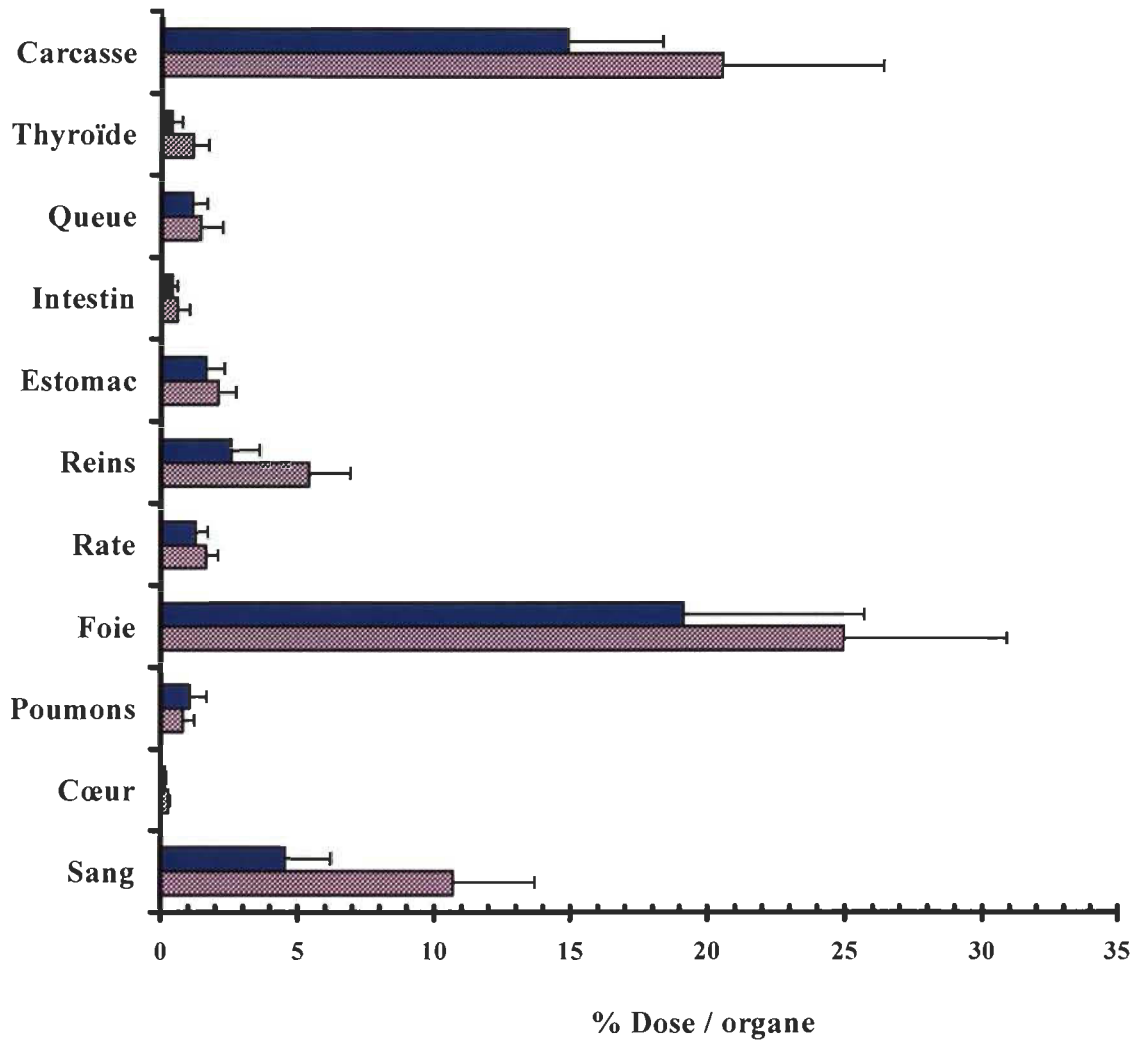


Figure 37. Distribution tissulaire des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes, 30 minutes après injection.

■ Nanoérythrocytes
 ■ Vésicules de Kobayashi

La valeur de chaque barre correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

Trente minutes après injection, un pourcentage plus important de vésicules de Kobayashi que de nanoérythrocytes est retrouvé dans le sang, le cœur, le foie, la rate, les reins et la carcasse. Ces différences sont significatives selon les résultats du test-t ($p < 0.05$). Ces résultats expliquent, entre autre, la plus grande quantité de vésicules de Kobayashi présente dans toute la souris après 30 minutes après l'injection comme montré à la figure 36. Par contre, il n'y a pas de différence significative dans les poumons, l'estomac, les intestins et la queue.

La figure 38 montre la radioactivité retrouvée dans chaque organe par gramme de tissu au bout de 30 minutes. Cette représentation nous donne l'affinité de chaque organe pour les vésicules de Kobayashi et pour les nanoérythrocytes.

Cette figure montre que la carcasse, même si elle capte beaucoup de vésicules, a peu d'affinité aussi bien pour les vésicules de Kobayashi que pour les nanoérythrocytes. On remarque aussi que la rate, le foie, l'estomac et les poumons ont la même affinité (vérifiée par test-t, $p < 0.05$) pour les vésicules de Kobayashi et les nanoérythrocytes.

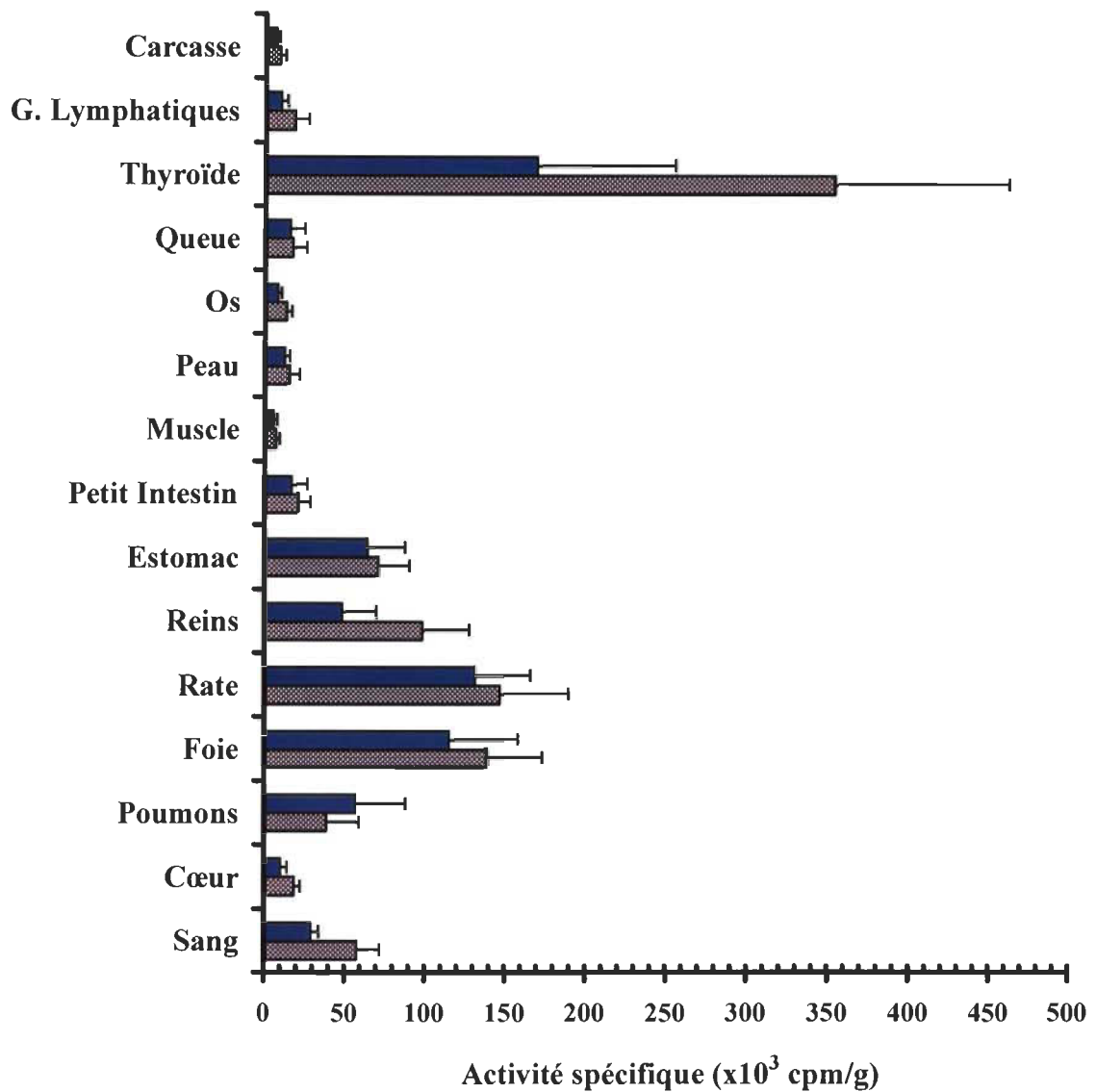


Figure 38. Activité spécifique dans les organes pour les vésicules de Kobayashi et les nanoérythroosomes, 30 minutes après injection.

■ Nanoérythroosomes
 ■ Vésicules de Kobayashi

La valeur de chaque barre correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

En ce qui concerne les poumons, nous n'avons cependant pas déterminé si les vésicules de Kobayashi et les nanoérythroosomes demeurent emprisonnés dans les petits capillaires ou si ils sont captés par les cellules des poumons.

L'activité spécifique des reins est plus grande pour les vésicules de Kobayashi que pour les nanoérythroosomes. Dans les reins, une partie de l'activité est probablement due à l'iode-125 libre qui est éliminé dans l'urine. Cependant, les cellules des reins captent aussi des vésicules de Kobayashi et des nanoérythroosomes car les proportions entre les activités spécifiques retrouvées dans les reins, l'estomac et la thyroïde ne sont pas semblables à celles obtenues avec l'iode-125 libre. Si l'activité mesurée dans les reins était due seulement à l'iode-125 libre, il devrait y avoir moins d'activité dans les reins que dans l'estomac, ce qui n'est pas le cas à la figure 38.

Nous devons être prudent en ce qui concerne la captation des vésicules par l'estomac. En effet, l'estomac capte l'iode-125 libre (figure 29) et ce que l'on mesure, c'est la radioactivité de l'iode-125 sans pouvoir distinguer l'iode-125 lié aux vésicules de l'iode-125 libre. Il est donc probable qu'une grande partie de l'activité mesurée dans l'estomac soit due à l'iode-125.

Les autres organes et tissus, c'est-à-dire, le cœur, le petit intestin, les muscles, la peau, les os, les ganglions lymphatiques, la queue et la carcasse n'ont qu'une faible affinité pour les deux types de vésicules.

Les figures 37 et 38 représentent la biodistribution des vésicules de Kobayashi et des nanoérythroosomes, 30 minutes après l'injection. Ce patron de distribution reste le même pour les vésicules de Kobayashi et les nanoérythroosomes en fonction du temps, mais l'activité dans tous les organes diminue de manière égale à l'exception de la thyroïde.

La figure 39 représente l'activité spécifique en fonction du temps retrouvée dans les principaux organes qui captent les vésicules de Kobayashi et les nanoérythroosomes, soit le foie, la rate et les reins, ainsi que l'activité spécifique dans le sang qui nous renseigne sur la quantité de vésicules encore dans le sang, c'est-à-dire qui n'a pas été captée par les organes. L'activité spécifique de la thyroïde n'indique pas l'affinité de la thyroïde pour les vésicules de Kobayashi et les nanoérythroosomes, mais la captation de l'iode-125 qui a été libéré lors de la dégradation des vésicules par les autres organes.

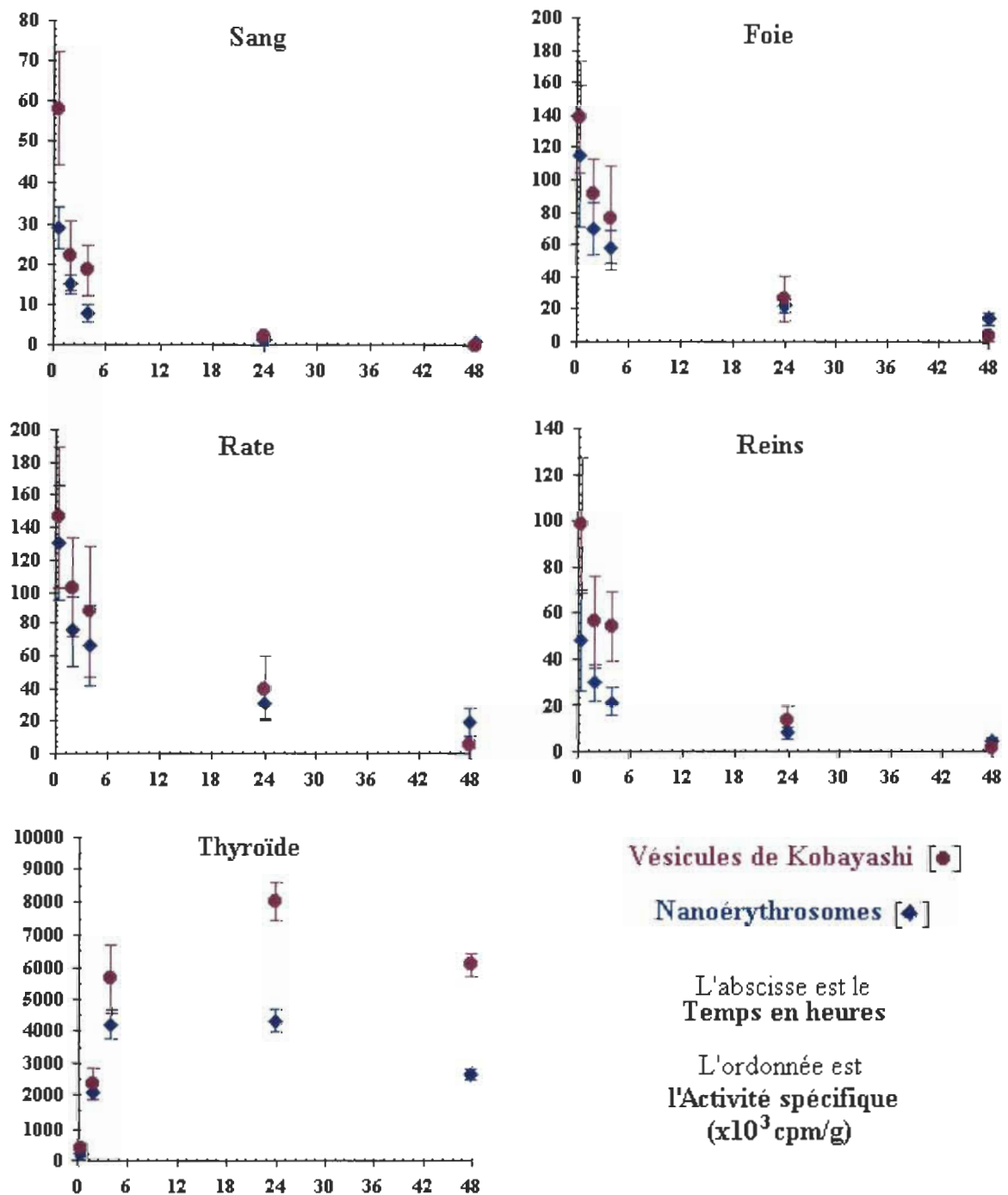


Figure 39. Comparaison de l'activité spécifique en fonction du temps, dans les différents organes, des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.

La valeur de chaque point correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

En général, nous observons une diminution de l'activité spécifique, donc de la quantité de vésicules marquées, dans le sang, le foie, la rate et les reins et ceci aussi bien pour les vésicules de Kobayashi et pour les nanoérythrocytes. Par contre, on remarque une augmentation de la radioactivité dans la thyroïde durant 24 heures.

La cinétique d'une substance dans un organe, c'est-à-dire sa concentration en fonction du temps est la somme de deux phénomènes : d'une part la vitesse de captation par l'organe du produit en provenance du sang et d'autre part la vitesse de dégradation et d'élimination de la substance par cet organe. Dans les premières minutes qui suivent l'injection intraveineuse d'une substance, la vitesse de captation par l'organe est grande, et la vitesse de dégradation est faible. La concentration dans le sang diminue en fonction du temps, donc la captation par l'organe va ralentir.

Par contre, comme la concentration dans l'organe augmente, la vitesse de dégradation par cet organe augmente aussi. Il y a un temps où la vitesse de dégradation devient supérieure à la vitesse de captation et la concentration de la substance dans l'organe diminue.

D'après les courbes obtenues à la figure 39, on peut voir que la captation des vésicules par les tissus est très rapide (en moins de 30 minutes) car les concentrations mesurées diminuent constamment. Nous n'avons donc pas obtenu la partie ascendante de la courbe de la concentration dans les organes en fonction du temps. Cependant, la concentration en vésicules mesurée au bout de 30 minutes résulte plus de la captation par l'organe que de leur dégradation et par conséquent la valeur de ce point sera une bonne approximation de la vitesse de captation.

Premièrement, dans le foie, les vésicules de Kobayashi et les nanoérythrocytes sont captés à la même vitesse car 30 minutes après injection, l'activité spécifique des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes est la même. En ce qui concerne les cinétiques de dégradation par le foie, à première vue, les deux courbes sont assez semblables. Cependant, un test d'analyse de variance à deux facteurs révèle que les deux courbes sont significativement différentes ($p=0.022$) et il y a plus de vésicules de Kobayashi que de nanoérythrocytes dans le foie. Nous avons fait un test-t pour comparer les valeurs pour les deux types de vésicules dans le foie à 2, 4, 24 et 48 heures. Le test-t montre que 4 heures après l'injection,

il y a plus de vésicules de Kobayashi que de nanoérythrocytes dans le foie et que cette différence est significative ($p=0.028$). Par la suite, il n'y a plus de différence significative entre l'activité spécifique des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes dans le foie. Nous pouvons donc dire qu'il y a un délai entre la captation et la dégradation des vésicules de Kobayashi par rapport aux nanoérythrocytes dans le foie.

Deuxièmement, le test d'analyse de variance montre qu'il n'existe pas de différence significative entre la cinétique des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes dans la rate ($p=0.063$). Les vésicules de Kobayashi et les nanoérythrocytes sont captés et dégradés à la même vitesse par cet organe.

Troisièmement, il y a toujours une plus grande quantité de radioactivité par gramme de tissu retrouvée dans les reins après l'injection des vésicules de Kobayashi que des nanoérythrocytes. Ces différences sont statistiquement significatives, et confirmées par un test-t à 30 minutes ($p<0.05$) et une analyse de variance entre 2 et 48 heures ($p<0.05$). Il n'est pas possible de déterminer si la radioactivité comptée dans les reins est due à l'iode-125 attaché aux vésicules ou à l'iode-125 libre qui provient de la dégradation de ces vésicules

par l'organisme. Donc, soit il y a une plus grande quantité de vésicules de Kobayashi que de nanoérythroosomes qui est captée par les reins, soit qu'il y a une plus grande élimination d'iode-125 dans l'urine provenant de la dégradation des vésicules de Kobayashi par l'organisme.

En conclusion, les vésicules de Kobayashi et les nanoérythroosomes suivent à peu près le même patron de distribution chez la souris. Les vésicules de Kobayashi et les nanoérythroosomes sont captés par les mêmes tissus, c'est-à-dire surtout par le foie, la rate et les reins. Cependant, la captation et la cinétique de dégradation des vésicules de Kobayashi et des nanoérythroosomes est différente dans le foie et peut être dans les reins.

L'objectif de notre travail était de préparer des vésicules qui soient dégradées ou captées moins rapidement que les nanoérythroosomes. Les vésicules de Kobayashi sont effectivement dégradées moins rapidement que les nanoérythroosomes. En effet, il reste encore deux fois plus de vésicules de Kobayashi que de nanoérythroosomes dans toute la souris et ce, pendant 48 heures. Cette différence est statistiquement significative. Cependant, cette différence n'est pas énorme puisque 48 heures après injection, il n'y a

pratiquement plus de vésicules de Kobayashi dans l'organisme. De plus, nous avons montré que les vésicules de Kobayashi demeurent plus longtemps dans le sang que les nanoérythrocytes. La vitesse de dégradation des vésicules de Kobayashi est plus lente que celle des nanoérythrocytes dans le foie et les reins. Ce sont donc les organes qui dégradent ces vésicules de Kobayashi moins vite que les nanoérythrocytes qui font qu'il y a toujours plus de vésicules de Kobayashi que de nanoérythrocytes dans toute la souris. Nous n'avons cependant pas réussi à préparer des vésicules qui ne soient pas captées par le foie, qui est l'organe qui capte la majorité des vésicules. Nous discuterons de cet aspect dans le chapitre suivant.

3.5. Étude pharmacocinétique des vésicules de Kobayashi préparées avec différents lipides.

La méthode de préparation des vésicules de Kobayashi consiste à mettre en contact un lipide, le DLPC, avec des érythrocytes. Selon Kobayashi et coll., lors de l'incubation, des molécules de lipides seraient incorporées à la membrane externe des érythrocytes, ce qui induit leur bourgeonnement. Les vésicules formées seraient donc enrichies du lipide utilisé pour induire le bourgeonnement.

La deuxième partie de ce projet consiste à modifier la technique de préparation des vésicules de Kobayashi en changeant les lipides utilisés pour induire la formation des vésicules. Il se forme alors des vésicules qui contiennent des lipides différents et qui, par conséquent, peuvent avoir des propriétés pharmacocinétiques différentes.

Kobayashi a utilisé seulement le DLPC comme lipide pour produire la vésiculation. Nous avons modifié la méthode en incubant des érythrocytes avec les mélanges de lipides suivant : DLPC + DLPS, DLPC + DLPG et DLPC + LA dans le rapport molaire 14 :1. Il doit donc s'être formé des vésicules qui contiennent dans leur membrane externe du DLPS ou du DLPG qui sont des lipides chargés négativement, ou du LA qui est un lipide chargé positivement. Les vésicules de Kobayashi ainsi formées ont donc des charges différentes, et peuvent donc avoir une affinité différente pour les tissus.

Nous avons injecté les différentes vésicules de Kobayashi obtenues avec ces différents lipides et comparé leur cinétique et leur biodistribution.

Nous appellerons ces vésicules ainsi :

Les vésicules de Kobayashi formées par incubation des érythrocytes avec du DLPC, les *vésicules-DLPC*. Les vésicules de Kobayashi formées par incubation des érythrocytes avec un mélange de DLPC : LA (14 :1), les *vésicules-LA*. Les vésicules de Kobayashi formées par incubation des érythrocytes avec un mélange de DLPC : DLPS (14 : 1), les *vésicules-DLPS*. Les vésicules de Kobayashi formées par incubation des érythrocytes avec un mélange de DLPC : DLPG (14 : 1), les *vésicules-DLPG*.

3.5.1. Optimisation de la méthode de préparation des vésicules-DLPG, vésicules-DLPS et vésicules-LA.

Nous avons tout d'abord déterminé quel rapport molaire de lipides donne le meilleur rendement de formation de vésicules. Nous avons essayé les rapports molaires suivant : 9 moles de DLPC pour une mole de LA (9 :1), 14 :1 et 19 :1. La concentration finale en lipides est la même que celle utilisée pour les vésicules-DLPC, soit 112.5 μ M. L'incubation est aussi de 30 minutes à 22°C. Les résultats de dosages en protéines et en acétylcholinestérase des préparations ainsi que l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase et l'enrichissement par rapport aux érythrocytes sont montrés au tableau 8.

Tableau 8. Influence du rapport molaire (DLPC :LA) sur le rendement en vésicules de Kobayashi.

Rapport molaire (DLPC :LA)	9 : 1	14 : 1	19 : 1
Dosage en protéines (mg/mL)	0.83 ± 0.03	0.85 ± 0.02	0.79 ± 0.03
Dosage de l'acétylcholinestérase (DO/min•mL)	1.60 ± 0.05	1.85 ± 0.04	1.41 ± 0.08
Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (DO/min•mg)	1.93 ± 0.09	2.18 ± 0.07	1.78 ± 0.12
Enrichissement par rapport aux érythrocytes	33.9 ± 2.4	38.2 ± 2.3	31.4 ± 2.7

Ces valeurs sont des moyennes ± l'écart-type de 10 échantillons.

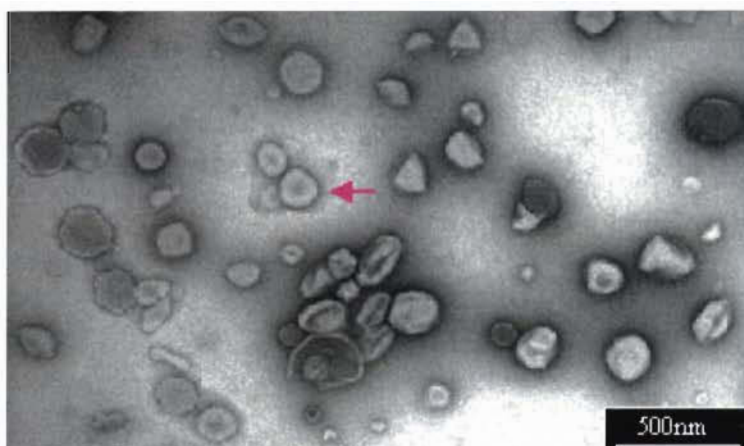
Nous pouvons voir au tableau 8 que le meilleur rendement est obtenu lorsque l'on utilise un rapport de 14 moles de DLPC pour 1 mole de LA. C'est le mélange qui donne la plus grande activité de l'acétylcholinestérase, la plus grande activité spécifique ainsi que le plus grand enrichissement par rapport aux érythrocytes. Les différences sont significatives, ce qui a été vérifié par un test-t ($p < 0.05$). Aucune différence significative n'est obtenue pour le dosage des protéines ($p > 0.05$).

Nous avons préparé les vésicules-DLPG et vésicules-DLPS en utilisant aussi un rapport molaire de 14 moles de DLPC pour 1 mole de DLPG ou de

DLPS afin de pouvoir comparer les résultats obtenus entre les différentes vésicules, mais nous n'avons pas vérifié si les conditions de préparation avec les mélanges DLPC+DLPG et DLPC+DLPS étaient optimales.

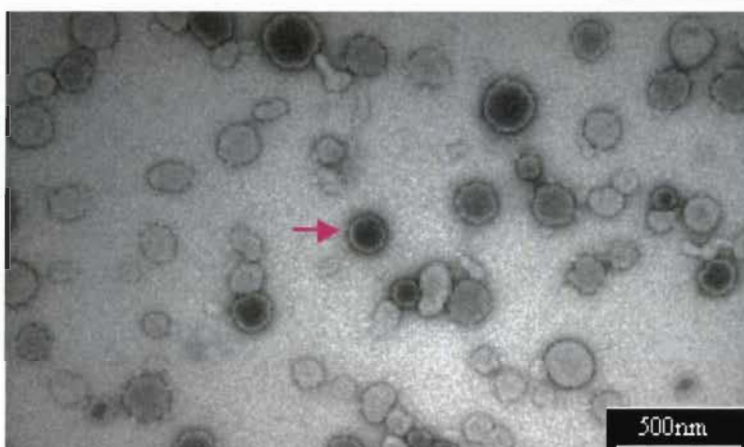
3.5.2. Observation par microscopie électronique des différentes vésicules de Kobayashi.

Nous avons observé par microscopie électronique la morphologie des vésicules formées (vésicules-DLPG, vésicules-DLPS et vésicules-LA). Trois caractéristiques de ces vésicules ont été examinées; les vésicules sont-elles ouvertes ou fermées? Quel est leur diamètre et leur forme? La figure 40 montre les vésicules-DLPG, vésicules-DLPS et vésicules-LA colorées négativement à l'acétate d'uranyl 1%. Nous pouvons voir sur la figure 40 que les vésicules des 3 types de préparations sont fermées et sphériques. Quelques-unes sont allongées, ce qui est sans doute un artefact de préparation. Ces vésicules ont la même morphologie que les vésicules-DLPC que l'on peut voir à la figure 25. De plus, nous remarquons dans les préparations la présence de vésicules beaucoup plus petites. Il s'agit probablement de liposomes qui n'ont pas été éliminés lors de la purification des vésicules.



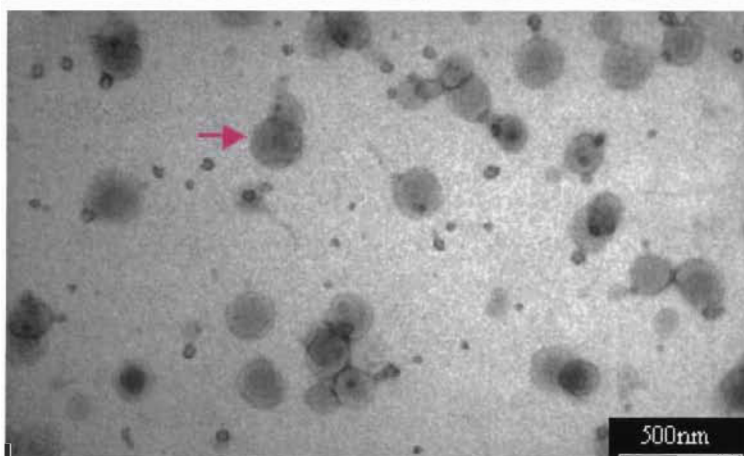
Vésicules-DLPG

La flèche **rose**
indique
une vésicule



Vésicules-DLPS

La flèche **rose**
indique
une vésicule



Vésicules-LA

La flèche **rose**
indique
une vésicule

Figure 40. Photographies des vésicules-DLPG, des vésicules-DLPS et des vésicules-LA prises par microscopie électronique à transmission.
(Grossissement = 36000x)

La figure 41 montre l'histogramme de distribution de taille des quatre types de vésicules. Le nombre de classes est calculé selon la règle de Yule et de Sturge et l'intervalle de classe est obtenu en divisant l'étendue de la variation par le nombre de classes.

La taille moyenne, mesurée par microscopie électronique, des vésicules-DLPC (a), des vésicules-DLPG (b), des vésicules-DLPS (c) et des vésicules-LA (d) est respectivement de $129\pm 31\text{nm}$, $148\pm 39\text{nm}$, $147\pm 32\text{nm}$ et $167\pm 29\text{nm}$.

Pour le calcul des diamètres, nous n'avons pas tenu compte des vésicules qui avaient un diamètre inférieur à 60nm car il s'agit probablement des liposomes qui n'ont pas été éliminés et non des vésicules de Kobayashi.

Les vésicules-LA sont significativement plus grandes que les autres vésicules et les vésicules-DLPC sont significativement plus petites.

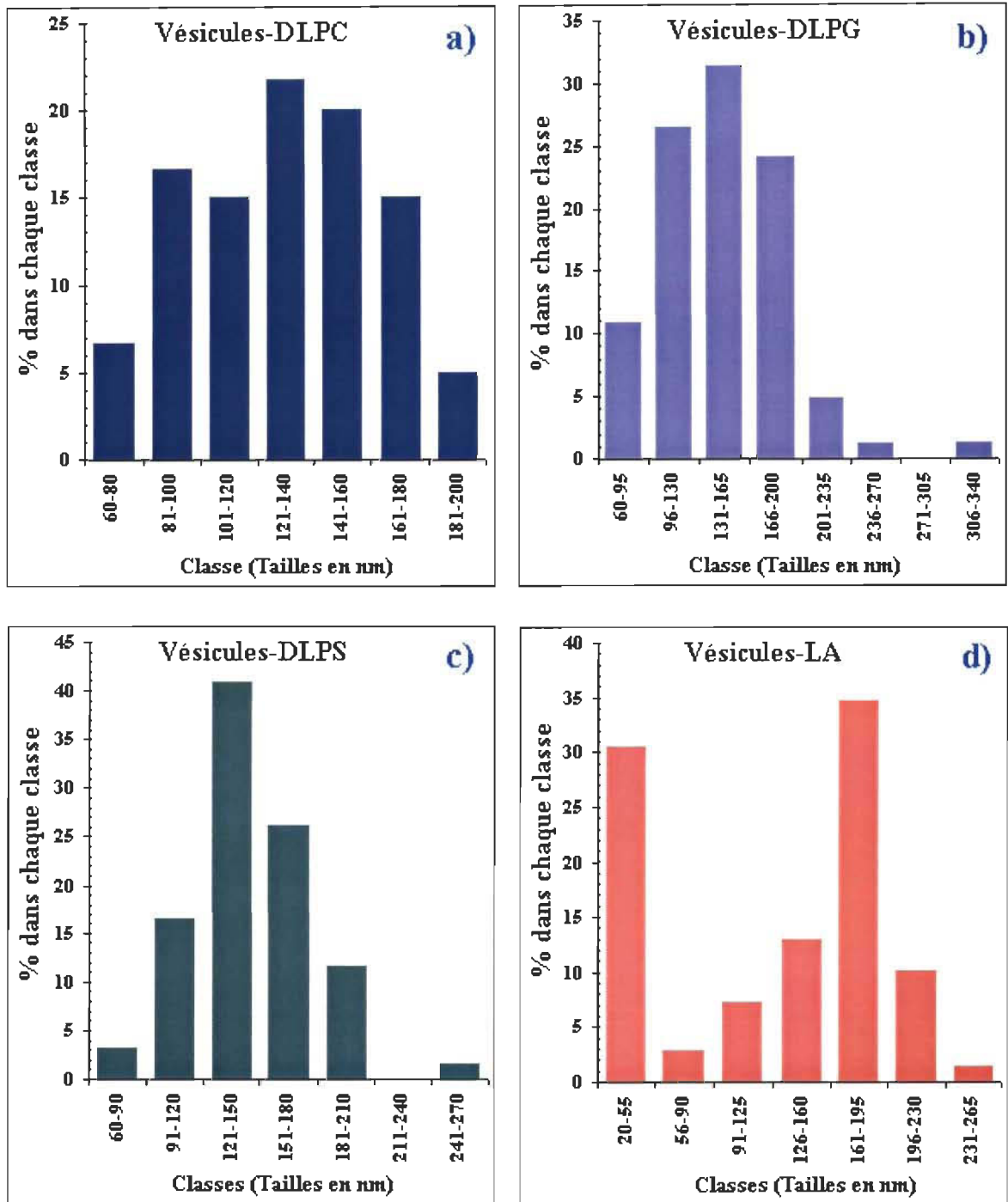


Figure 41. Histogramme de la taille, déterminée par microscopie électronique, des vésicules-DLPC, des vésicules-DLPG, des vésicules-DLPS et des vésicules-LA.

3.5.3. Comparaison de la cinétique d'élimination de la circulation sanguine des différents types de vésicules de Kobayashi.

Le premier aspect que nous avons étudié est la vitesse à laquelle les différents types de vésicules sont retirées de la circulation sanguine. La figure 42 montre que les cinétiques d'élimination sanguine des 4 types de vésicules sont assez semblables. Afin de déterminer s'il y a des différences significatives entre les 4 cinétiques d'élimination sanguine, nous avons fait une analyse de variance. Nous avons aussi fait un test-t pour comparer la quantité de vésicules dans le sang 30 minutes après l'injection.

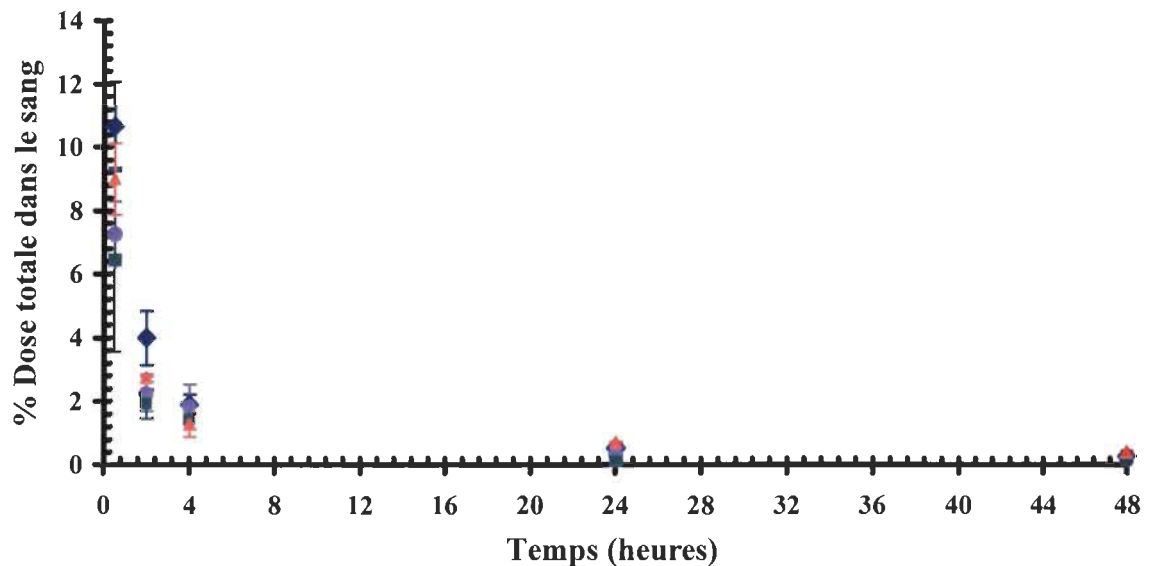


Figure 42. Comparaison des cinétiques d'élimination sanguine des différents types de vésicules de Kobayashi.

- ◆ Vésicules-DLPC.
- Vésicules-DLPG.
- Vésicules-DLPS.
- ▲ Vésicules-LA.

La valeur de chaque point correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

À première vue, la quantité de vésicules-DLPC dans le sang semble plus grande que celle des autres vésicules au bout de trente minutes. Cependant, le résultat du test-t qui compare les vésicules 30 minutes après l'injection montre que le pourcentage de vésicules-DLPC en circulation est le même que celui des vésicules-LA, mais qu'il est significativement plus grand de celui des vésicules-DLPG et des vésicules-DLPS. Par contre, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le pourcentage de vésicules-LA et de vésicules-DLPS après 30 minutes. Cela peut paraître contradictoire de dire qu'il y a le même pourcentage de vésicules-DLPC que de vésicules-LA en circulation 30 minutes après injection et de dire en même temps qu'il y a plus de vésicules-DLPC que de vésicules-DLPS alors que le test-t montre que le pourcentage de vésicules-LA est le même que celui des vésicules-DLPS. Cependant, cela s'explique par la valeur de l'écart-type des vésicules-DLPS qui est assez important.

Selon le test de l'analyse de variance, les vésicules-DLPC et les vésicules-LA sont éliminées à la même vitesse de la circulation sanguine, donc elles sont toutes les deux captées par les différents organes à la même

vitesse. Par contre, Les vésicules-DLPG et les vésicules-DLPS sont éliminées plus rapidement.

3.5.4. Comparaison de la cinétique de dégradation des différents types de vésicules de Kobayashi.

La figure 43 illustre le pourcentage de la dose injectée retrouvé dans l'organisme en fonction du temps (en excluant la thyroïde puisqu'elle capte uniquement de l'iode-125 libre).

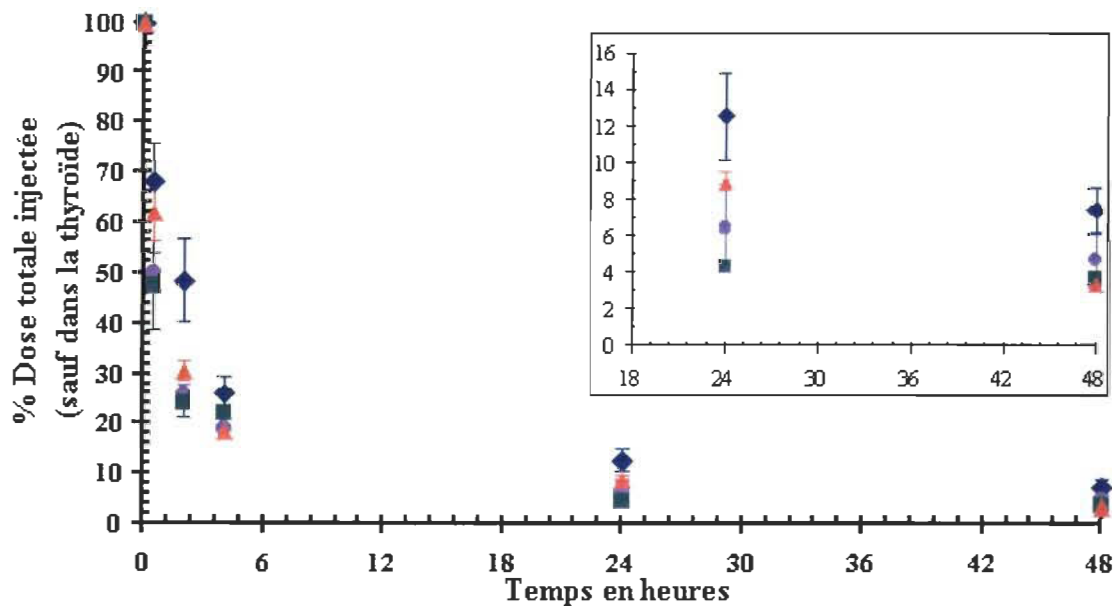


Figure 43. Comparaison de la cinétique de dégradation des 4 types de vésicules de Kobayashi.

- ◆ Vésicules-DLPC.
- Vésicules-DLPG.
- Vésicules-DLPS.
- ▲ Vésicules-LA.

L'encadré montre un agrandissement des résultats obtenus 24 et 48 heures post-injection.

La valeur de chaque point correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

Cette figure représente donc le pourcentage des vésicules restantes qui sont encore dans tout l'organisme en fonction du temps. Nous pouvons d'abord constater sur ce graphique que toutes les vésicules sont dégradées et éliminées rapidement durant les 4 premières heures. Par la suite, la dégradation et l'élimination sont moins rapides.

Nous avons déterminé par le test-t sur les valeurs 30 minutes après injection qu'il y avait dans toute la souris le même pourcentage de vésicules-DLPC et de vésicules-LA, soit environ 65% de la quantité injectée ($p=0.331$). Les vésicules-DLPC et les vésicules-LA sont donc dégradées à la même vitesse durant les 30 premières minutes. Par contre, durant les 30 premières minutes, les vésicules-DLPS et les vésicules-DLPG sont dégradées plus rapidement et il en reste seulement 50%, 30 minutes après l'injection.

L'encadré de la figure 43 montre que 24 et 48 heures après injection, il y a près de deux fois plus de vésicules-DLPC que des autres vésicules dans tout l'organisme. Sur une longue période, les vésicules-DLPC sont donc dégradées et éliminées moins vite que les vésicules-DLPG, les vésicules-DLPS et les vésicules-LA. L'analyse de variance montre que ces différences

sont significatives ($p < 0.05$). La durée de vie des vésicules dans l'organisme dépend donc de leur composition. L'ajout de certains lipides à leur membrane modifie leur vitesse de captation et de dégradation par les cellules.

3.5.5. Comparaison de la biodistribution des différents types de vésicules de Kobayashi.

Les figures 44 et 45 montrent les patrons de distribution des différents types de vésicules. Les résultats de la figure 44 représentent le pourcentage de la dose totale dans chaque organe, 30 minutes après injection intraveineuse, alors que la figure 45 représente l'activité spécifique calculée pour chaque organe, 30 minutes après injection (c'est-à-dire l'affinité de chaque organe pour les différentes vésicules de Kobayashi).

Sur la figure 44, on constate que la biodistribution des 4 types de vésicules est à peu près la même. En général, 30 minutes après injection, l'organe principal qui retient le plus de vésicules est le foie. Dans cet organe, il y a plus de vésicules-DLPC que des autres vésicules. La carcasse retient aussi un fort pourcentage de vésicules. Le cœur, les poumons, le petit intestin et la queue en captent une très faible quantité.

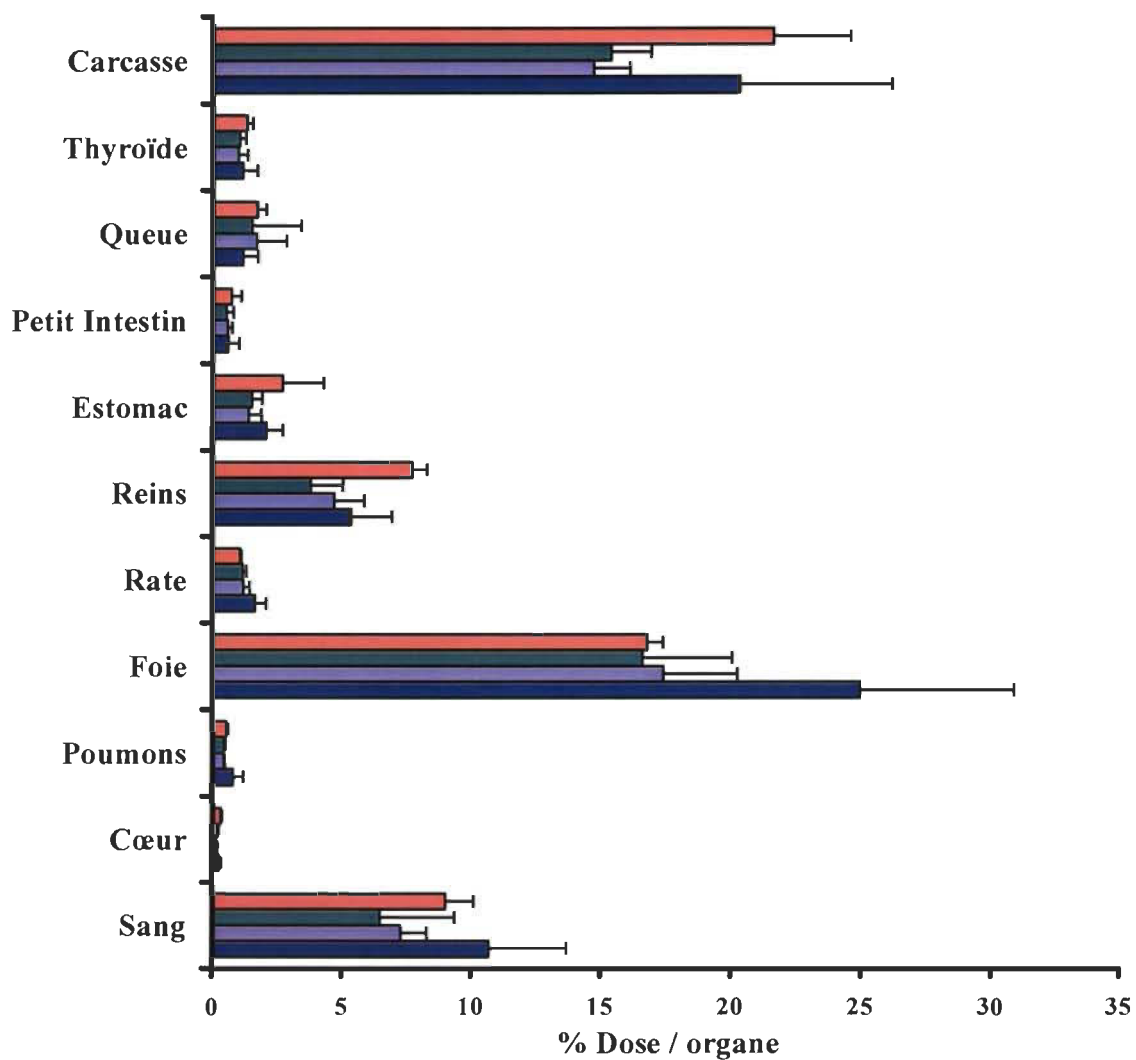


Figure 44. Distribution tissulaire, 30 minutes après injection, des différentes vésicules de Kobayashi.

- Vésicules-DLPC.
- Vésicules-DLPG.
- Vésicules-DLPS.
- Vésicules-LA.

La valeur de chaque barre correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

En effectuant un test-t pour comparer les moyennes des 4 types de vésicules dans chaque organe, on peut mettre en évidence des différences significatives. Le test-t permet d'établir que le patron de distribution des vésicules-DLPG et des vésicules-DLPS est le même ($p>0.05$). Par contre, il y a une plus faible quantité de vésicules-DLPG et de vésicules-DLPS que de vésicules-DLPC et de vésicules-LA dans les organes, ce qui est logique d'après les résultats obtenus à la partie 3.5.3. qui compare la cinétique d'élimination du sang des différents types de vésicules. Deuxièmement, les vésicules-DLPC et les vésicules-LA ont une biodistribution différente. Il y a une plus grande quantité de vésicules-DLPC que de vésicules-LA dans le foie, la rate et les poumons ($p<0.05$), mais une plus faible quantité de vésicules-DLPC que de vésicules-LA dans les reins ($p<0.05$).

La figure 45 représente l'activité spécifique d'un organe après 30 minutes, c'est-à-dire l'affinité d'un organe pour les vésicules. À la figure 44, nous avons remarqué qu'il y avait une grande quantité de vésicules dans la carcasse. Cependant, l'affinité de la carcasse pour les vésicules est faible puisque l'activité spécifique est faible.

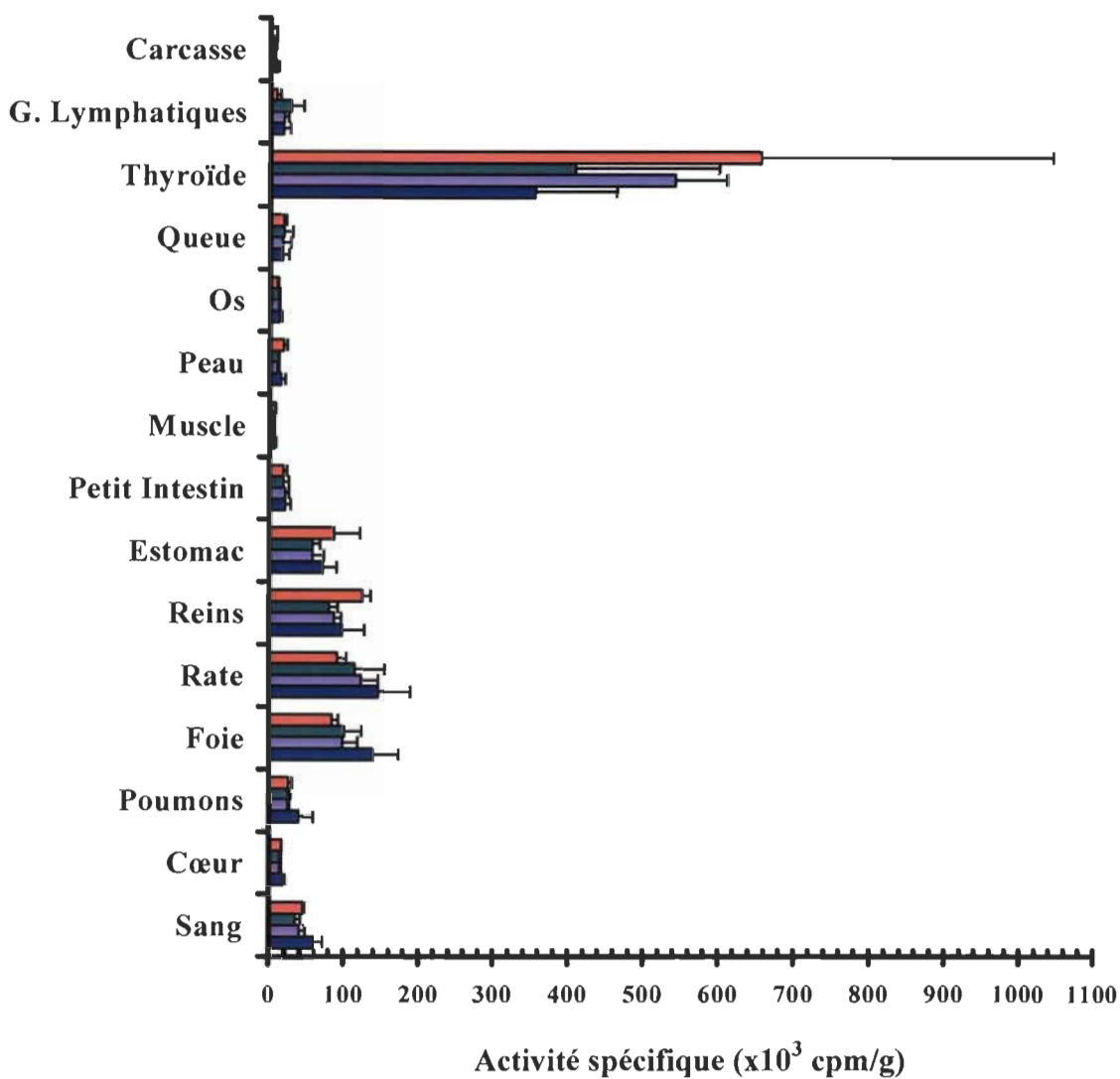


Figure 45. Activité spécifique des vésicules dans chaque organe, 30 minutes après injection.

- Vésicules-DLPC.
- Vésicules-DLPG.
- Vésicules-DLPS.
- Vésicules-LA.

La valeur de chaque barre correspond à la **moyenne** \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par **expérience**.

Le foie, la rate et les reins semblent avoir à peu près la même affinité pour les 4 types de vésicules. Un test-t fait cependant ressortir certaines différences. Le rein a une plus forte affinité pour les vésicules-LA que pour les autres vésicules, alors que la rate a une plus faible affinité pour les vésicules-LA que les autres vésicules. Le foie a une affinité plus grande pour les vésicules-DLPC que les autres vésicules.

L'estomac a aussi beaucoup d'affinité pour les vésicules. Cependant, l'estomac capte l'iode-125 libre (voir figures 29 et 30) et ce que l'on mesure, c'est la radioactivité de l'iode-125 qui est attaché aux vésicules ainsi que celle de l'iode libre.

De même, l'activité spécifique des reins peut être le résultat de deux choses; les vésicules marquées et l'iode-125 libre provenant de la dégradation des vésicules, car l'iode libre qui n'est pas capté par la thyroïde, est éliminé par les reins, dans l'urine. Cependant, l'activité mesurée dans les reins ainsi que l'estomac ne peut pas être due uniquement à l'iode-125 libre car l'activité spécifique dans ces organes est trop grande comparativement à celle de la thyroïde.

Les poumons captent aussi les vésicules. L'affinité des poumons est significativement plus grande pour les vésicules-DLPC que pour les autres vésicules. L'affinité des poumons pour les vésicules ne peut pas être due seulement au fait que les vésicules restent emprisonnées dans les capillaires pulmonaires à cause de leur taille car les vésicules-DLPC ont un diamètre plus petit que les autres vésicules et ce sont elles qui sont le plus captées par les poumons.

Le cœur, le petit intestin, la peau, les os, les ganglions lymphatiques, la queue et la carcasse ont une faible affinité pour les 4 types de vésicules.

La figure 46 représente l'activité spécifique en fonction du temps retrouvée dans les principaux organes qui captent les vésicules de Kobayashi et les nanoérythrocytes, soit le foie, la rate et les reins. Les courbes qui représentent l'activité spécifique dans le foie, la rate et les reins en fonction du temps montrent que la captation des vésicules est très rapide, en moins de 30 minutes, et que par la suite, les vésicules sont dégradées et éliminées en 48 heures.

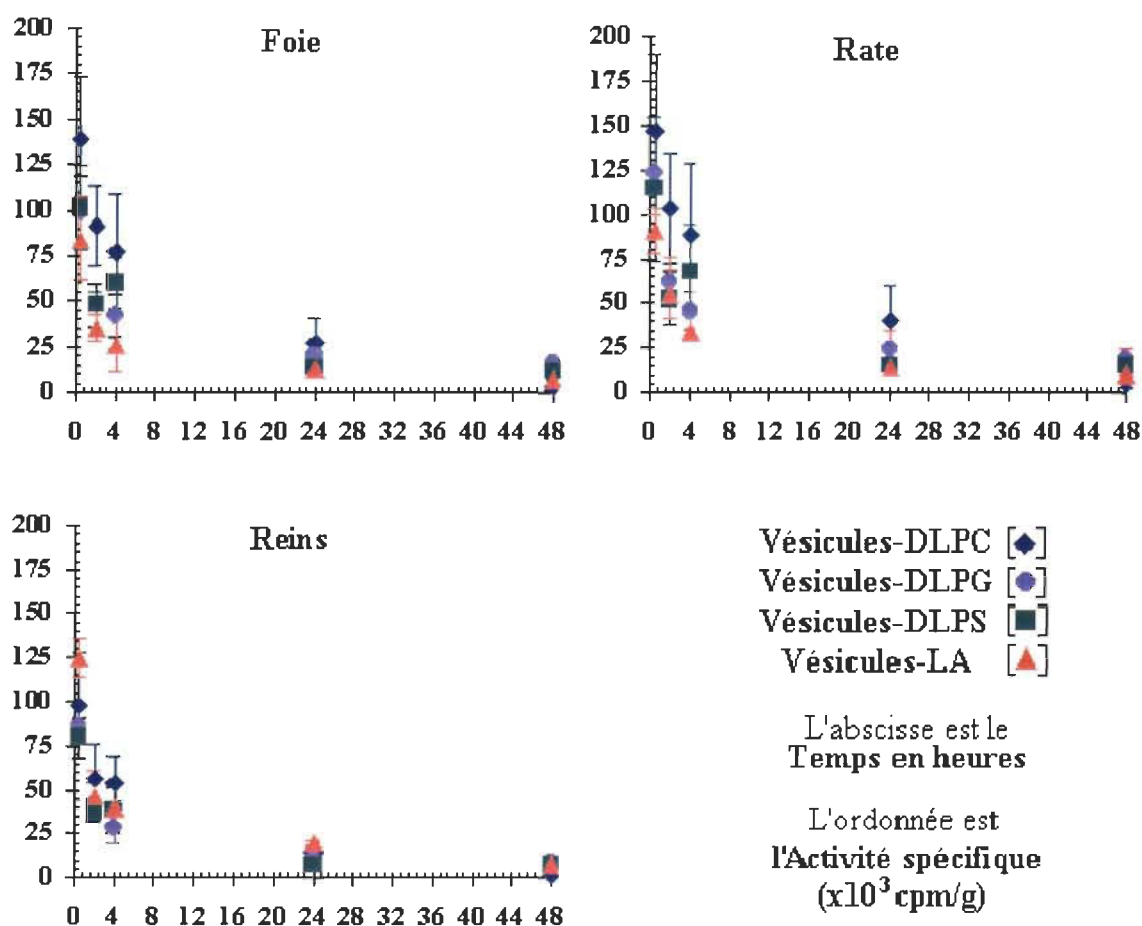


Figure 46. Activité spécifique en fonction du temps des principaux organes, pour les différentes vésicules de Kobayashi.

La valeur de chaque barre correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

Sur les figures, nous remarquons :

- Premièrement, en fonction du temps, l'activité spécifique des vésicules-DLPC dans le foie est toujours deux fois plus élevée que les vésicules-LA. Cependant, comme le pourcentage de vésicules restant dans tout l'organisme

en fonction du temps n'est pas le même pour les 4 types de vésicules, est-ce que le foie a vraiment une affinité plus grande pour les vésicules-DLPC par rapport aux autres vésicules ou est-ce le fait qu'il en reste plus dans tout l'organisme?

La figure 47 montre le pourcentage relatif de chaque type de vésicules dans le foie, la rate et les reins, c'est-à-dire le pourcentage de vésicules retrouvé dans chaque organe comparativement au pourcentage total dans tout l'organisme, au lieu du pourcentage retrouvé dans chaque organe par rapport au total injecté. Cette représentation nous amène à des conclusions différentes.

Nous retrouvons dans le foie, 30 minutes après injection, un pourcentage relatif de vésicules qui est le même pour les vésicules-DLPC, les vésicules-DLPG et les vésicules-DLPS, mais qui est plus faible pour les vésicules-LA. Cette observation est statistiquement significative d'après un test-t. Donc, d'après ces deux figures, l'affinité du foie pour les vésicules-DLPC, les vésicules-DLPG et les vésicules-DLPS est la même et est plus grande que pour les vésicules-LA.

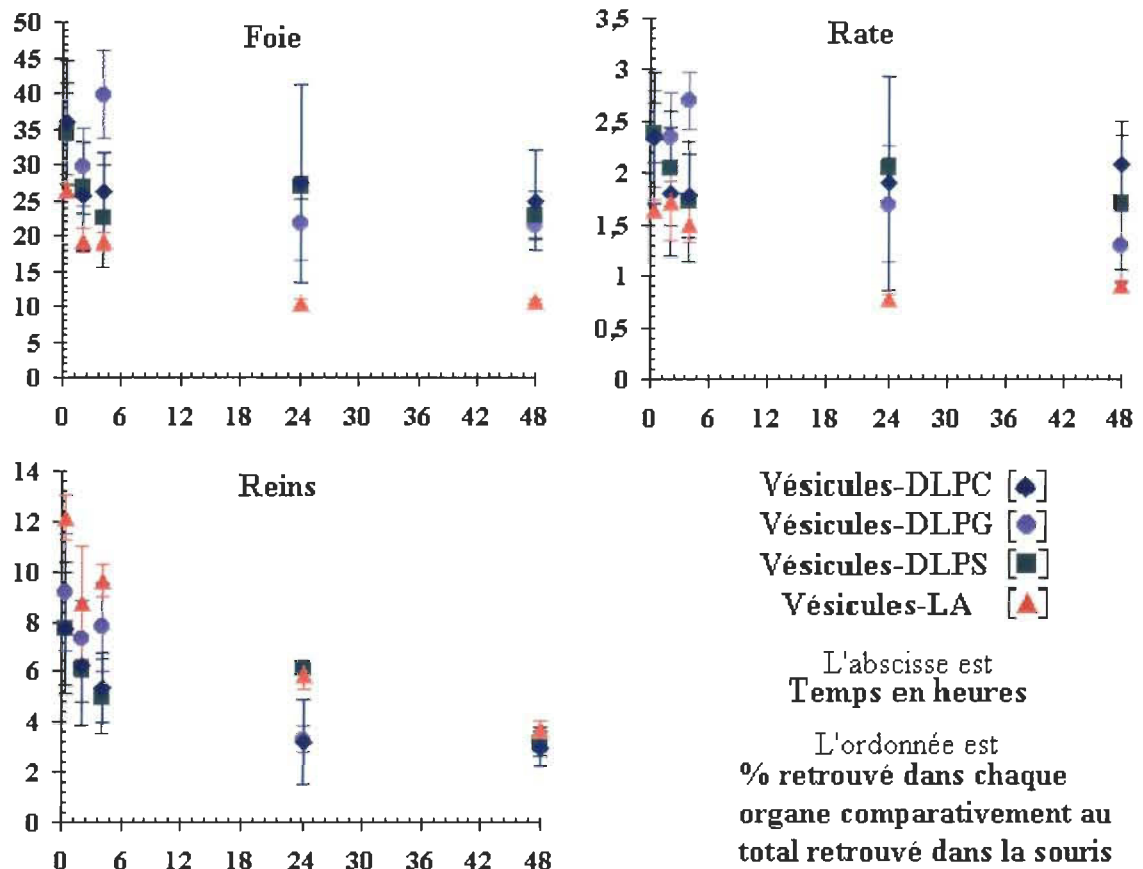


Figure 47. Pourcentage relatif de vésicules retrouvé, en fonction du temps, dans les principaux organes, pour les différentes vésicules de Kobayashi.

La valeur de chaque barre correspond à la moyenne \pm l'écart-type d'un minimum de 3 expériences faites avec un lot de 3 à 4 souris par expérience.

- Deuxièmement, d'après la figure 46, l'affinité de la rate est la même pour les vésicules-DLPC, les vésicules-DLPG et les vésicules-DLPS, mais est plus faible pour les vésicules-LA. Cependant, les vésicules-DLPC qui sont retrouvées dans la rate 30 minutes après injection sont dégradées par cet

organe moins rapidement que les 3 autres types de vésicules, ce qui fait que 48 heures après injection, la quantité de vésicules-DLPC qui reste par gramme de tissu est presque deux fois plus grande que celle des autres vésicules. En calculant le pourcentage relatif des 4 types de vésicules, montré à la figure 47, nous obtenons la même conclusion.

- Troisièmement, la figure 46 montre qu'apparemment, les reins ont une affinité plus grande pour les vésicules-LA que les vésicules-DLPC, les vésicules-DLPS et vésicules-DLPG. Ce qui est le contraire pour les autres organes. Cette différence est significative comme le montre le test-t. Par conséquent, soit les reins ont une affinité plus grande pour les vésicules-LA, soit il y a une plus grande quantité d'iode-125 libre provenant de la dégradation des vésicules-LA qui est éliminé dans l'urine.

En conclusion, d'après les figures 46 et 47, le foie et la rate ont une plus grande affinité pour les vésicules-DLPC, les vésicules-DLPG et les vésicules-DLPS que pour les vésicules-LA. Au contraire, les reins montrent apparemment une affinité plus grande pour les vésicules-LA, mais ceci résulte

plus probablement d'une plus grande quantité de produits de dégradation des vésicules-LA par les autres organes, produits qui sont éliminés par l'urine.

Les vésicules-DLPC ont incorporé dans leur membrane du DLPC, qui est un lipide neutre, les vésicules-DLPG et les vésicules-DLPS ont incorporé du DLPG et du DLPS, qui sont des lipides chargés négativement, et les vésicules-LA contiennent un lipide chargé positivement.

Nos résultats montrent que plus il y a de charges négatives sur les vésicules, plus vite elles sont captées par le foie et la rate. La charge des vésicules a donc une influence sur leur vitesse de captation et sur leur biodistribution. Il est donc possible de modifier la cinétique et la biodistribution des vésicules en changeant la composition de leur membrane.

Voici une synthèse des résultats obtenus avec les différentes préparations de vésicules de Kobayashi et les nanoérythrocytes :

Tableau 9. Synthèse des études de cinétique et de biodistribution de 5 types de vésicules.

Type de vésicules	Taille (nm)	Organes cibles	Clairance sanguine	Vitesse de Dégradation
Nanoérythroosomes	94 ±40	Foie & Rate (+) Reins & Poumons (±)	Rapide < 5%	Rapide < 50%
Vésicules-DLPC	129±31	Foie & Rate (+) Reins & Poumons (±)	Rapide < 11%	Moyenne < 70%
Vésicules-DLPG	148±49	Rate (+) Foie & Reins (±)	Rapide < 8%	Rapide 50%
Vésicules-DLPS	147±32	Foie & Rate (+) Reins (±)	Rapide < 7%	Rapide < 50%
Vésicules-LA	167±29	Reins (+) Rate & Foie (±)	Rapide 9%	Moyenne < 65%

(+) Activité spécifique élevée calculée dans l'organe (entre 100 et 200 CPM /g)

(±) Activité spécifique moyenne calculée dans l'organe (entre 25 et 100 CPM /g)

Les pourcentages représentant la clairance sanguine sont les pourcentages de la quantité totale de vésicules injectées restant dans le sang 30 minutes après injection.

Les pourcentages représentant la vitesse de dégradation sont les pourcentages de la quantité totale de vésicules injectées encore présentes dans la souris après 30 minutes.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Nous allons discuter des idées essentielles qui nous permettront d'envisager les applications potentielles des vésicules de Kobayashi comme agent de transport de médicaments.

4.1. Remarques sur la captation de l'iode-125 libre par la glande thyroïde et l'estomac.

Nous avons montré que l'iode-125 libre injecté par voie intraveineuse, était surtout capté par la glande thyroïde et l'estomac. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Hinkle & coll., 1998). L'iode-125 qui est capté par la glande thyroïde est utilisé pour la fabrication des hormones thyroïdiennes. L'iode en excès est éliminé par les reins. Nous avons montré que, 30 minutes après injection de l'iode, il ne restait que 20% de l'iode-125 injecté dans l'organisme, le reste est donc éliminé dans l'urine, ce que nous avons vérifié en mesurant la radioactivité de l'urine des souris. Ce résultat montre que l'iode-125 qui n'est pas capté par la thyroïde ou l'estomac est éliminé très rapidement. Ce résultat est en accord avec les résultats de Jean Désilets qui a

fait la même cinétique et la même biodistribution de l'iode-125 libre injecté par voie intraveineuse à des souris (Désilets, 2000).

La captation de l'iode-125 libre n'est pas une propriété exclusive de la glande thyroïde. L'iode peut aussi être capté par les cellules de l'estomac, les glandes salivaires et mammaires (Hinkle & coll., 1998). L'iode-125 qui se retrouve dans les glandes mammaires et salivaires contribue à augmenter la radioactivité de la carcasse. Ces glandes ne sont pas séparées de la carcasse lors de la dissection de l'animal, et par conséquent cela surévalue le pourcentage de la radioactivité retrouvé dans la carcasse. Cependant, ces glandes sont très petites. Il est donc peu probable qu'elles captent un pourcentage élevé d'iode-125. De plus, la vessie n'est pas séparée du reste de la carcasse, mais comme nous la vidons de son contenu, il y a peu d'iode-125 libre de l'urine qui se retrouve dans la carcasse. Par conséquent, la radioactivité comptée dans la carcasse n'est pas majoritairement due à l'iode-125 capté par les glandes mammaires et salivaires, ou qui reste dans la vessie, mais bien à la captation des vésicules par un ensemble de tissus qui forment la carcasse, c'est-à-dire la peau, les os, les muscles et le tissu adipeux.

Ces résultats sont importants puisqu'ils servent de contrôle lors de l'analyse de la biodistribution des vésicules de Kobayashi dans l'organisme. Si l'iode-125 se détache de la membrane des vésicules, ou si il y a destruction des vésicules et libération d'iode-125, cet iode libéré sera capté par la thyroïde et l'estomac et le reste éliminé dans l'urine. L'activité de la thyroïde permet donc d'évaluer la quantité d'iode-125 qui se détache. La radioactivité mesurée dans les organes est due aux vésicules captées par ces organes. Les nanoérythroosomes ou les vésicules de Kobayashi captés par les organes seront dégradés et métabolisés, et l'iode-125 libéré va se retrouver finalement dans la thyroïde et dans l'urine.

Cependant, il se peut que les vésicules ou les nanoérythroosomes soient aussi dégradés par les tissus en peptides iodés, qui eux ne vont pas dans la thyroïde comme le fait l'iode libre. Ces peptides vont rester dans les organes, ou seront relargués dans le sang et seront véhiculés vers d'autres organes. Nous ne pouvons pas, d'après les expériences que nous avons effectuées, distinguer entre la radioactivité qui est liée à des vésicules intactes de la radioactivité liée à des peptides qui proviennent de la dégradation de ces vésicules.

Afin de différencier les vésicules intactes radioactives des peptides radioactifs produits par dégradation des vésicules, nous aurions pu injecter un composé marqué, tel que la tyraminyl-inuline, encapsulée dans des vésicules de Kobayashi. L'encapsulation de cette molécule dans les vésicules permet de suivre le contenu et non le contenant. La tyraminyl-inuline est une molécule qui a une demi-vie très courte dans le compartiment sanguin, avec une durée de vie de l'ordre de 20 minutes. Par cette méthode, seules les vésicules de Kobayashi intactes qui enferment toujours de la tyraminyl-inuline marquée sont détectées. Les vésicules dégradées libèrent la tyraminyl-inuline qui est rapidement éliminée dans l'urine et elles ne sont par conséquent plus détectées.

Une étude de distribution tissulaire de nanoérythrocytes marqués à l'iode-125 ainsi que de tyraminyl-inuline marquée à l'iode-125 encapsulée dans des nanoérythrocytes a été faite avec succès par Jean Désilets. Jean Désilets a montré qu'il n'y avait pas de différence dans le patron de distribution des nanoérythrocytes dont la membrane est marquée à l'iode-125 et le patron de distribution des nanoérythrocytes dans lesquels a été encapsulée la tyraminyl-inuline marquée à l'iode-125. Par conséquent, les

produits de dégradation de la membrane des vésicules sont rapidement éliminés. Il est probable qu'il en est de même pour les vésicules de Kobayashi. Nous avons donc admis que toute la radioactivité mesurée dans l'organisme, à l'exception de celle de la thyroïde, est due à l'iode lié aux vésicules. Dans certains calculs, nous n'avons pas tenu compte de la radioactivité de la thyroïde car elle est due surtout à l'iode-125 libre.

Il aurait été intéressant d'encapsuler la tyraminyl-inuline radioactive dans les vésicules de Kobayashi, mais nous ne l'avons pas fait car c'est une technique qui n'est pas encore au point pour ces vésicules.

4.2. Critique de la technique de marquage à l'iode-125 par l'IDOGEN®.

Nous avons choisi de marquer les vésicules de Kobayashi avec de l'iode-125 car ce radioélément est facilement détectable par un compteur Gamma sans que les tissus aient à subir de traitement comme c'est le cas, en outre, pour le marquage au tritium qui requiert une solubilisation des tissus. La procédure de marquage utilise un substrat nommé IDOGEN®. Cette méthode a été choisie car elle est simple, qu'elle ne demande pas de longues

préparations, le marquage des protéines est rapide et surtout le substrat utilisé n'est pas un agent oxydant puissant qui cause une dénaturation des protéines.

Cependant, le marquage s'effectue en substituant un hydrogène par un atome d'iode-125 sur le cycle aromatique des tyrosines. Les tyrosines sont modifiées ce qui pourrait altérer les protéines qui contiennent des tyrosines. Cette altération des protéines serait-elle de nature à accélérer la dégradation des vésicules et modifier sa captation par les tissus?

Une étude d'immunoréactivité a été effectuée, par Hinkle et coll. en 1998, avec des anticorps monoclonaux utilisés pour des chirurgies « immunoguidées ». Ces auteurs ont montré que les anticorps monoclonaux marqués à l'iode-125 subissaient des changements physico-chimiques en fonction du temps, mais que ces changements étaient faibles d'un point de vue clinique. De plus, l'étude effectuée par Jean Désilets avec la tyraminyl-inuline expliquée au point de discussion précédent, montre que, même si les protéines subissent des changements, cela n'affecte pas la biodistribution des nanoérythrocytes.

Nous pouvons donc conclure qu'il est peu probable que l'iodation des vésicules par cette technique modifie la reconnaissance et la destruction des vésicules de Kobayashi.

4.3. Remarques sur le calcul du rendement.

Comme les vésicules de Kobayashi ne sont pas visibles au microscope optique, il n'est pas possible de les compter facilement. Nous avons donc dû utiliser une autre méthode afin de les quantifier. Nous avons dosé la quantité de protéines dans les vésicules de Kobayashi ainsi que l'activité de l'acétylcholinestérase. De plus, nous avons calculé l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase et l'enrichissement par rapport aux érythrocytes. Kobayashi et coll. ont mentionné qu'il y avait un enrichissement important de l'acétylcholinestérase dans les vésicules de Kobayashi comparativement aux érythrocytes, et ont utilisé ce critère pour comparer leurs préparations de vésicules. Nous avons admis que, plus l'activité de l'acétylcholinestérase d'une préparation est élevée, plus elle contenait de vésicules de Kobayashi.

Or, une préparation peut avoir une activité spécifique en acétylcholinestérase élevée, mais contenir très peu de vésicules. De même, il

peut y avoir plus ou moins de protéines pour une même quantité de vésicules d'une préparation à l'autre. Il n'y a cependant pas de moyen simple pour le vérifier. Nous avons utilisé pour la quantification des vésicules le dosage des protéines et de l'acétylcholinestérase car ce sont deux méthodes simples et rapides et parce que Kobayashi et coll., en 1983, les avaient utilisées. En calculant l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase et l'enrichissement par rapport aux érythrocytes, cela nous permet de déterminer facilement le meilleur rendement de formation des vésicules en comparant les préparations entre elles.

4.4. Remarques sur la quantité de vésicules de Kobayashi et de nanoérythrocytes injectée.

Il faut souligner que lorsque l'on compare les vésicules de Kobayashi aux nanoérythrocytes, nous ne sommes pas sûr que la quantité de vésicules de Kobayashi injectée soit la même que celle des nanoérythrocytes. En effet, nous ne pouvons déterminer ni la quantité de vésicules de Kobayashi, ni celle de nanoérythrocytes. Nous avons injecté 50 μ g de protéines de chaque préparation. Cependant, il se peut que 50 μ g de protéines corresponde à une quantité de vésicules de Kobayashi qui est différente de celle des

nanoérythrocytes. Nos résultats montrent qu'il y a toujours plus de vésicules de Kobayashi que de nanoérythrocytes dans les souris, et c'est peut être parce que nous en avons injecté davantage, même si la quantité de protéines était la même. À mon avis, cela est peu probable car les vésicules de Kobayashi contiennent de l'hémoglobine, qui augmente la quantité de protéines dans les préparations, ce qui n'est pas le cas dans les nanoérythrocytes.

4.5. Remarques sur la cinétique de dégradation des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.

Nous avons montré que les cinétiques de dégradation dans l'organisme des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes sont différentes. Trente minutes après injection, il reste 70% des vésicules de Kobayashi injectées et 45% des nanoérythrocytes (figure 36). Où sont passés les vésicules de Kobayashi et les nanoérythrocytes manquants durant les 30 premières minutes? Il y a donc beaucoup de vésicules de Kobayashi et de nanoérythrocytes qui sont éliminés en peu de temps. Une explication pourrait être que l'iode-125 n'est pas suffisamment bien attaché aux vésicules, qu'il se détache et est évacué rapidement dans l'urine. Cependant, nous avons effectué une expérience contrôle afin de vérifier la stabilité du marquage de

l'iode-125 (figure 28) et nous avons montré que même si les vésicules sont incubées à 37°C dans du sérum de souris, le marquage est stable en fonction du temps. Il y a encore 90% de l'iode-125 qui est toujours attaché aux vésicules 24 heures après le début de l'incubation.

Il ne peut pas s'agir uniquement d'une erreur de la quantité injectée, même si une injection dans la queue entraîne parfois des pertes. En effet, nous avons effectué un grand nombre d'injections et nous avons toujours obtenu une élimination rapide de la radioactivité dans les premières minutes de l'expérience. Cependant, une certaine quantité reste dans la seringue. Cette quantité résiduelle provoque une perte de la quantité de radioactivité, environ 3%, mais cela ne peut pas expliquer les 30 ou 55% manquant.

Afin de déterminer si la radioactivité manquante se retrouve dans l'urine, nous avons recueilli l'urine de 12 souris durant les 30 premières minutes après injection. Les résultats de ces 12 souris proviennent de 3 expériences séparées, c'est-à-dire que nous avons injecté des vésicules-DLPC à 4 d'entre elles, des vésicules-DLPG à 4 autres et finalement des vésicules-DLPS aux 4 dernières. Nous avons retrouvé seulement $4.6 \pm 1.6\%$ de la radioactivité totale

injectée dans la souris dans l'urine durant les 30 minutes suivant l'injection. Cela n'explique donc pas pourquoi il ne reste jamais plus de 70% de la radioactivité injectée après 30 minutes. À la figure 32, nous avons montré que 75% de l'iode-125 libre est éliminé dans l'urine en 30 minutes. Donc, si les vésicules sont rapidement dégradées et que l'iode est libéré, il se retrouvera dans l'urine en très peu de temps, sinon il sera détecté dans la souris. Cependant, la technique pour recueillir l'urine peut entraîner des erreurs. Comme elle est recueillie avec des papiers buvards, il se peut que nous ne l'ayons pas toute recueillie et qu'une quantité n'ait pas été comptée. Nous avons aussi recueilli les fèces des 12 souris et nous y avons retrouvé qu'un faible pourcentage de radioactivité, soit moins de 1%.

Le compteur Gamma peut aussi être une source d'erreurs. Nous avons remarqué que les lectures peuvent varier de quelques pour cent, jusqu'à 3%, pour un même échantillon compté plusieurs fois.

La différence importante entre la quantité de radioactivité injectée et celle comptée après 30 minutes est probablement due à cet ensemble de causes d'erreurs.

4.6. Utilisation des vésicules de Kobayashi comme système de transport de médicaments à relargage lent dans la circulation sanguine.

Un des objectifs de ce travail était de mettre au point un système de transport de médicament qui permette un relargage lent de la substance encapsulée. Pour ce faire, le système doit demeurer longtemps en circulation et doit être bien toléré par l'organisme, c'est-à-dire qu'il ne doit pas être dégradé trop rapidement par les systèmes de défense, ni par les organes. Nous avons tout d'abord comparé la cinétique et la biodistribution des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes.

Premièrement, nous avons montré que les cinétiques de dégradation par l'organisme des vésicules de Kobayashi et des nanoérythrocytes sont différentes. Nous avons observé que les vésicules de Kobayashi sont dégradées plus rapidement que les nanoérythrocytes durant les 4 premières heures après injection, mais par la suite, elles sont dégradées moins rapidement (figure 36). Cependant, durant toute la période de temps étudiée, nous pouvons dire que les vésicules de Kobayashi sont généralement mieux tolérées par l'organisme que les nanoérythrocytes car le pourcentage de vésicules qui reste, donc qui n'a pas été dégradé par l'organisme, est toujours le double de celui des nanoérythrocytes.

Deuxièmement, nous avons montré par les études de cinétique et de biodistribution que les vésicules de Kobayashi sont retirées rapidement de la circulation sanguine et captées par les organes. Seulement 10% de la dose totale est encore dans le compartiment sanguin 30 minutes après injection. Les vésicules de Kobayashi restent plus longtemps dans la circulation que les nanoérythrocytes, mais malgré tout, leur durée de vie dans la circulation sanguine est trop courte pour que l'on puisse les utiliser, dans l'état actuel des choses, pour relarguer lentement une drogue dans la circulation sanguine.

Comment se fait-il que des vésicules, qui sont constituées de la membrane d'érythrocytes soient retirées si rapidement de la circulation sanguine? Quelles sont les causes possibles qui expliquent la destruction rapide des vésicules de Kobayashi alors qu'elles sont des fragments d'érythrocytes et par conséquent devraient rester longtemps dans la circulation?

Le marqueur principal de la destruction des érythrocytes endommagés et/ou sénescents est une protéine membranaire, la bande 3 (Kay, 1983 et Lutz & Shingaro-Wipf, 1983). Cependant, comme la bande 3 est présente aussi

bien chez les érythrocytes jeunes que âgés, le changement membranaire que doit subir cette protéine pour provoquer la destruction de l'érythrocyte n'est pas clair. Trois hypothèses sont proposées par Kay en 1975 pour expliquer cette reconnaissance; 1) la bande 3 âgée est coupée ou modifiée, 2) un site antigénique est exposé suite au vieillissement et 3) la distribution membranaire de la bande 3 est altérée.

D'autre part, il a été démontré par Eungyeong et Huestis en 1994 que lorsque des liposomes composés de lipides ayant de longues chaînes saturées (mono ou disaturées) de phosphatidylcholine sont mis en présence d'érythrocytes, il y a oxydation de l'hémoglobine des érythrocytes. Il a aussi été établi par Low et coll. en 1985 que lorsque l'hémoglobine se dénature, elle se lie avec la bande 3 et l'agrégat formé constitue un déterminant antigénique reconnu par les anticorps. L'agrégation de la bande 3 est l'hypothèse la plus probable qui peut expliquer le fait que, même si les vésicules de Kobayashi sont constituées de la membrane des érythrocytes, elles sont quand même retirées de la circulation sanguine et dégradées.

Cependant, nous ne pouvons pas dire que la bande 3 est l'unique facteur qui fait que les vésicules de Kobayashi sont rapidement retirées de la circulation sanguine. En effet, les liposomes sont aussi retirés rapidement de la circulation sanguine, mais ne contiennent pourtant pas de bande 3.

En conclusion, nous devons admettre que les vésicules de Kobayashi telles que préparées actuellement, pourraient être utilisées pour prolonger la durée de vie d'un médicament qui serait très rapidement détruit lorsqu'il est injecté sous forme libre dans le sang, mais pourraient difficilement servir à relarguer de façon progressive sur une longue période de temps des médicaments dans la circulation.

Nous suggérons pour augmenter la demi-vie des vésicules de Kobayashi, de camoufler les dommages faits à la membrane. Il a été démontré que le polyéthylène glycol (PEG) ou ses dérivés pouvaient déjouer les macrophages du système réticulo-endothélial. Le PEG a été utilisé pour prolonger la demi-vie des liposomes qui sont eux aussi rapidement retirés de la circulation sanguine (Harashima & Kiwada, 1996).

Notre travail est basé sur l'hypothèse que les vésicules de Kobayashi ne seraient pas reconnues par les systèmes de défense de l'organisme car elles sont composées de la membrane des érythrocytes. Si nous devons traiter les vésicules de Kobayashi avec des substances telles que le PEG, y a-t-il un avantage à utiliser les vésicules de Kobayashi plutôt que les liposomes? Il est difficile de répondre à une question de ce genre dans l'état actuel des connaissances sur les vésicules de Kobayashi. Avant de rejeter l'idée d'utiliser les vésicules de Kobayashi comme transporteurs de médicaments, il faudrait pousser la recherche un peu plus et en particulier comprendre pourquoi elles sont éliminées rapidement.

Premièrement, il faudrait préciser le mécanisme de formation des vésicules de Kobayashi, à savoir si il y a vraiment incorporation de lipides dans la membrane de l'érythrocyte. Cela pourrait se faire en utilisant des lipides radioactifs et en déterminant si ils se retrouvent vraiment dans la membrane des vésicules de Kobayashi.

Deuxièmement, il serait intéressant de voir ce que donnerait le traitement des vésicules de Kobayashi au PEG. Si les vésicules traitées au PEG ne sont

pas aussi rapidement reconnues que les vésicules non traitées, c'est que leur membrane est endommagée. Les recherches devraient alors s'orienter vers la mise au point de techniques qui diminuent les dommages faits à la membrane.

Troisièmement, nous suggérons de déterminer si l'hémoglobine dans les vésicules de Kobayashi est oxydée. Comme nous l'avons expliqué précédemment, la présence d'hémoglobine dénaturée ou oxydée serait une des causes de l'agrégation de la bande 3 qui forme un déterminant antigénique reconnu par les anticorps. L'agrégation de la bande 3 est la cause la plus probable qui peut expliquer le fait que, même si les vésicules de Kobayashi sont préparées par une méthode plus douce que les nanoérythrocytes, il y a quand même reconnaissance par les macrophages et destruction des vésicules de Kobayashi. Il est possible de quantifier l'oxydation de l'hémoglobine par lyse avec du Triton X-100 et dosage de l'oxyhémoglobine, métahémoglobine et l'hémochrome par mesure des coefficients d'extinction des espèces tétramériques et des absorbances à 560, 577 et 630nm (pH=7,4) (Eungyeong & Huestis, 1994).

Quatrièmement, on pourrait aussi déterminer si les anticorps autologues contre les érythrocytes se fixent aux vésicules de Kobayashi et de déterminer où exactement il se fixent en séparant les protéines par chromatographie sur gel de sépharose. Cette expérience permettrait peut être de déterminer quelles protéines sont endommagées lors de la préparation des vésicules de Kobayashi. La connaissance des protéines endommagées permettrait d'orienter les recherches vers une technique de préparation améliorée.

4.7. Utilisation potentielle des vésicules de Kobayashi (vésicules-DLPC) comme système permettant le ciblage des médicaments.

Nos résultats de biodistribution indiquent que les vésicules de Kobayashi (vésicules-DLPC) sont captées principalement par les organes qui font partie du système réticulo-endothélial, le foie et la rate. Une fois dans la circulation sanguine, les vésicules ne peuvent pas traverser la paroi des vaisseaux sanguins et par conséquent, elles peuvent difficilement être utilisées pour cibler des sites pathologiques hors du système sanguin. La biodistribution des vésicules de Kobayashi est très semblable à celle des nanoérythrocytes. Les applications possibles sont donc les mêmes que celles des nanoérythrocytes et des liposomes. Ceci constitue une limitation importante pour les

applications thérapeutiques possibles des vésicules de Kobayashi. Par contre, la biodistribution des vésicules a montré qu'un fort pourcentage de la dose totale injectée se retrouve dans le foie. Il serait donc en principe possible d'utiliser les vésicules de Kobayashi pour cibler un agent thérapeutique vers cet organe, mais les liposomes font la même chose et leur technique de préparation est plus simple.

4.8. Modification de la pharmacocinétique des vésicules de Kobayashi en utilisant d'autres lipides pour induire leur formation.

D'après le mécanisme proposé par Kobayashi et coll. en 1983, pour la formation des vésicules, il y aurait insertion de lipides, utilisés pour induire la vésiculisation, dans la membrane de l'érythrocyte. Ces lipides, situés dans le feuillet externe des vésicules, modifient les propriétés des vésicules et leur interaction avec les cellules.

Nous voulions, en changeant la composition des lipides utilisés pour induire la formation des vésicules de Kobayashi, déterminer s'il était possible d'obtenir des vésicules dont la cinétique et la biodistribution soient différentes.

Les vésicules-DLPC sont les vésicules qui ressemblent le plus aux érythrocytes natifs et par conséquent sont moins rapidement reconnues, que les autres types de vésicules, par les macrophages. Les vésicules-DLPS et les vésicules-DLPG ont dans leur feuillet lipidique externe des lipides qui sont plutôt situés dans le feuillet lipidique interne des cellules ce qui fait qu'elles sont reconnues plus rapidement par les macrophages. Les vésicules-LA contiennent plus de charges positives que les membranes naturelles, qui sont chargées négativement.

Nous avons en effet montré que les vésicules ont une cinétique et une biodistribution qui dépend des lipides utilisés pour induire leur formation. De façon générale, les vésicules-DLPG et les vésicules-DLPS sont captées par les organes, dégradées et éliminées de l'organisme plus rapidement que les vésicules-LA et les vésicules-DLPC. De plus, les vésicules-DLPG et vésicules-DLPS sont captées par les macrophages en circulation qui les dégradent rapidement puisque 30 minutes après injection, il ne reste que 50% des vésicules injectées dans l'ensemble de l'organisme. En 1982, Fidler et Mehla et coll. ont montré que les liposomes composés de PC+PS se lient et sont phagocytés par les macrophages à une vitesse plus élevée que les

liposomes de PC. Donc, si on veut cibler les macrophages, les vésicules-DLPG et les vésicules-DLPS sont indiquées. Cependant, il ne faut pas oublier que ces vésicules sont aussi captées par les organes tels que le foie, la rate et les reins. Il faudrait être capable de suivre les vésicules-DLPG et les vésicules-DLPS et déterminer précisément quelles cellules des organes les dégradent, ce qui peut être fait après coloration des vésicules avec une sonde fluorescente et examen de coupes histologiques.

Une expérience semblable pourrait aussi être faite avec les autres types de vésicules afin de vérifier si les résultats que nous avons obtenus représentent la biodistribution des vésicules, et non pas celle de peptides iodés qui proviennent de leur dégradation par les tissus ou de l'iode-125 libre encore présent dans l'organe.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS

L'objectif général de notre travail était de faire une étude pharmacologique de base sur les vésicules de Kobayashi afin d'évaluer leur potentiel comme transporteurs de médicaments. L'objectif spécifique principal de notre travail devait servir à répondre à la question suivante :

Est-ce que la méthode de préparation des vésicules de Kobayashi est plus douce que celle des nanoérythrocytes et permet d'augmenter leur durée de vie dans la circulation sanguine?

L'hypothèse était que ce nouveau véhicule, les vésicules de Kobayashi, pouvait déjouer les systèmes de défense de l'organisme qui élimine les substances étrangères ou sénescentes. Cependant, nous avons montré, que même si les vésicules de Kobayashi proviennent des érythrocytes, elles sont rapidement retirées de la circulation sanguine, mais elles y demeurent quand même deux fois plus longtemps que les nanoérythrocytes. Nous concluons

par conséquent, que la méthode de préparation des vésicules de Kobayashi est plus « douce » que celle des nanoérythroosomes.

Notre étude permet d'envisager l'utilisation des vésicules de Kobayashi dans un but thérapeutique. Cependant, des améliorations doivent être encore apportées à ces préparations afin que leur demi-vie dans la circulation sanguine soit augmentée. De plus, il serait intéressant de trouver un bon mélange de lipides qui induit la formation de vésicules de Kobayashi qui cibleraient un organe en particulier, autre que le foie, la rate ou les reins.

BIBLIOGRAPHIE

ALLEN, T.M., WILLIAMSON, P. & SCHLEGEL, R.A. (1988) *Phosphatidylserine as a determinant for reticuloendothelial recognition of model erythrocyte membranes*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, **85**, 8067-8071.

BAILEY, A.L. & CULLIS, P.R. (1997) *Membrane fusion with cationic liposomes : Effects of target membrane lipid composition*. Biochemistry, **36**, 1628-1634.

BENGA, G. (Ed.) (1985) *Structure and properties of cell membranes, Volume I*. Boca Raton, Florida, CRC Press, 2-217.

BENOIT, J.P. (1985) *Microcapsules and microspheres for chemoembolization*. In : Drug Targetting (Proceedings of the symposium on drug targetting, held in Nyon, Switzerland, on 3-5 october, 1984). BURI, P. & GUMMA, A. (Eds), Amsterdam-New York-Oxford, Elsevier Science Publishers, 95-117.

BEPPU, M., HAYASHI, T., HASEGAWA, T. & KIKUGAWA, K. (1995) *Recognition of sialosaccharide chains of glycophorin on damaged erythrocytes by macrophage scavenger receptors*. Biochimica et Biophysica Acta, **1268**, 9-19.

BONTE, F., HSU, M.J., PAPP, S., WU, K., REGEN, S.L. & JULIANO, R.L. (1987) *Interactions of polymerizable phosphatidylcholine vesicles with blood components: Relevance to biocompatibility*. Biochimica et Biophysica Acta, **900**, 1-9.

BOURNE, D.W.A. (Copyright 1995-1999) *Pharmaceutics III – Pharmacokinetics and biopharmaceutics (Pharm 4634)* University of Oklahoma, College of Pharmacy, chapter 3, 7, 10 and 18.

BÜTIKOFER, P. & OTT, P. (1985) *The influence of cellular ATP levels on dimyristoylphosphatidylcholine-induced release of vesicles from human erythrocytes*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **821**, 91-96.

BÜTIKOFER, P., BROEDBECK, U. & OTT, P. (1987) *Modulation of erythrocyte vesiculation by amphiphilic drugs*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **901**, 291-295.

CALVEZ, J.-Y., ZACHOWSKI, A., HERRMANN, A., MORROT, G. & DEVAUX, P.F. (1988) *Asymmetric distribution of phospholipids in spectrin-poor erythrocyte vesicles*. *Biochemistry*, **27**, 5666-5670.

CHERNOMORDIK, L.V., KOZLOV, M.M., MELIKYAN, G.B., ABIDOR, I.G., MARKIN, V.S. & CHIZMADZHEV, YU.A. (1985) *The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **812**, 643-655.

CHIARANTINI, L., JOHNSON, J. & DeLOACH, J.R. (1991) *Optimized recirculation survival of mouse carrier erythrocytes*. *Blood cells*, **17**, 607-617.

DALEKE, D.L. & HUESTIS, W.H. (1985) *Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes*. *Biochemistry*, **24**, 5406-5416.

DARNELL, J., LODISH, H. & BALTIMORE, D. (1993) *Biologie moléculaire de la cellule* (2^e édition, traduite de l'anglais). Bruxelles: De Boek Université, 491-580.

- De FLORA, A., BENATTI, U., GUIDA, L. & ZOCCHI, E. (1986) *Encapsulation of Adriamycin in human erythrocytes*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, **83**, 7029-7033.
- DeLOACH, J.R. (1986) *Carrier erythrocytes*. Medical Research Reviews, **6**, 487-504.
- DeLOACH, J.R. & BARTON, V. (1982) *Circulating carrier erythrocytes : Slow release vehicle for an antileukemic drug, cytosine arabinoside*. American Journal of Veterinary research, **43**, 2210-2212.
- DÉSILETS, J. (2000) Thèse de doctorat en biophysique non encore publiée. *Étude de la biodistribution chez la souris CDI d'un nouveau transporteur de médicaments: Les nanoérythroosomes*. Université du Québec à Trois-Rivières.
- DEVAUX, P.F. (1991) *Static and dynamic lipid asymetry in cell membranes*. Biochemistry, **30**, 1163-1172.
- EASTMAN, S.J., SIEGEL, C., TOUSIGNANT, J., SMITH, A.E., CHENG, S.H. & SCHEULE, R.K. (1997) *Biophysical characterization of cationic lipid :DNA complexes*. Biochimica et Biophysica Acta, **1325**, 41-67.
- EDMAN, P., EKMAN, B. & SJOHOLM, I. (1980) *Immobilization of proteins in microspheres of biodegradable polyacryldextran*. Journal of Pharmacological Sciences, **69**, 838-842.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES Jr, V. & FEATHERSTONE R.M. (1961) *A new colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical Pharmacology, **7**, 88-95.
- EUNGYEONG, Y. & HUESTIS, W.H. (1994) *Oxydative interactions between the erythrocyte membrane and phosphatidylcholine vesicles*. The Journal of Biological Chemistry, **269**, 14518-14529.

FIDLER, I.J. & KLEINERMAN, E.S. (1994) *Clinical application of phospholipid liposomes containing macrophage activators for therapy of cancer metastasis*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **13**, 325-340.

FRENKEL, E.J., KUYPERS, F.A., OP den KAMP, J.A.F., ROELOFSEN, B. & OTT, P. (1986) *Effect of membrane cholesterol on dimyristoylphosphatidylcholine-induced vesiculation of human red blood cells*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **855**, 293-301.

GARDNER, K. & VANN BENNETT, G. (1989) *Recently identified erythrocyte membrane-skeletal proteins and interactions: Implications for structure and function*. In *Red Blood cell membranes (structure-function-clinical applications)* Hematology Volume 11. BRINKHOUS, K.M & STASS, S.A. (Series editors) AGRE, P. & PARKER, J.C. (Eds.), New York and Basel: Marcel Dekker Inc, 1-29.

GAUDREAULT, R.C., BELLEMARE, B. & LACROIX, J. (1989) *Erythrocyte membrane-bound Daunorubicin as a delivery system in anticancer treatment*. *Anticancer Research*, **9**, 1201-1206.

GREGORIADIS, G. (1976) *The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts)*. *The New England Journal of Medicine*, **295**, 704-710.

GREGORIADIS, G. (1977) *Targeting of drugs*. *Nature*, **265**, 407-410.

GREGORIADIS, G. (1981) *Targeting of drugs : Implications in medicine*. *The Lancet*, **2**, 241-246.

GREGORIADIS, G., KIRBY, C. & SENIOR, J. (1983) *Optimization of liposome behaviour in vivo*. *Biology of the Cell*, **47**, 11-18.

GREGORIADIS, G. (1985) *Liposomes for drugs and vaccines*. *Trends in Biotechnology*, **3**, 235-241.

GREGORIADIS, G. (1988) *Liposomes as drug carriers*. In : Recent trend and progress. John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore, 150-432.

HAGELBERG, C. & ALLAN, D. (1990) *Restricted diffusion of integral membrane proteins and polyphosphoinositides leads to their depletion in microvesicles released from human erythrocytes*. *Biochemical Journal*, **271**, 831-834.

HÄGERSTRAND, H. & ISOMAA, B. (1989) *Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **982**, 176-186.

HÄGERSTRAND, H. & ISOMAA, B. (1992) *Morphological characterization of exovesicles and endovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1109**, 117-126.

HÄGERSTRAND, H. & ISOMAA, B. (1994) *Lipid and protein composition of exovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1190**, 409-415.

HINKLE, G.H., LOESCH, J.A., NINES, R., DePALATIS, L. & HOUCHEMS, D.P. (1998) *Radioiodination, quality assessment, in vitro and in vivo stability of iodine-125 nofetumomab*. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **XLI**, 423-434.

HOUIN, G. (sous la direction de) (1990) *Pharmacocinétique*. Association des Enseignants de Pharmacologie des U.F.R. de Pharmacie, Paris: Édition Marketing, 7-30, 39-55 & 108-144.

IGLIC, A., SVETINA, S. & ZEKS, B. (1995) *Depletion of membrane skeleton in red blood cell vesicles*. *Biophysical Journal*, **69**, 274-279.

IHLER, G.M., GLEW, R.H. & SCHNURE, F.W. (1973) *Enzyme loading of erythrocytes*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, **70**, 2663-2666.

ITABE, H., KOBAYASHI, T. & INOUE, K. (1988) *Generation of toxic phospholipid(s) during oxyhemoglobin-induced peroxidation of phosphatidylcholines*. Biochimica et Biophysica Acta, **961**, 13-21.

JONES, J.W., WHITTAKER, M. & BRAVEN J. (1991) *Immunological assay of erythrocyte acetylcholinesterase*. Clinica et Chimica Acta, **200**, 175-182.

JULIANO, R.L. & STAMP, D. (1975) *The effect of particle size and charge on the clearance rate of liposomes and liposome-encapsulated drugs*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **63**, 651-658.

KAY, M. (1975) *Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, **72**, 3521-3525.

KAY, M., GOODMAN, S.R., SORENSEN, K., WHITFIELD, C.F., WONG, P., ZAKI, L. & RUDLOFF, V. (1983) *Senescent cell antigen is immunologically related to band 3*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, **80**, 1631-1635.

KIM, S. (1994) *Liposomes as carriers of cancer chemotherapy: Current status and future prospects*. Drugs, **46**, 591-598.

KITAO, T., HATTORI, K. & TAKESHITA, M. (1978) *Agglutination of Leukemic cells and daunomycin entrapped erythrocytes with lectin in vitro and in vivo*. Experientia, **34**, 94-95.

KNOWLES, D., TILLEY, L., MOHANDAS, N. & CHASIS, J.A. (1997) *Erythrocyte membrane vesiculation: Model for the molecular mechanism of protein sorting*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, **94**, 12969-12974.

KOBAYASHI, T., TAKAHASHI, K., YAMADA, A., NOJIMA, S. & INOUE, K. (1983) *Lysis of erythrocytes by phosphatidylcholine containing polyunsaturated fatty acid*. Journal of Biochemistry, **93**, 675-680.

KUBY, J. (1994) *Immunology* (2nd edition), New York: W.H. Freeman and Company, 85-130.

LEE, J. & LENTZ, B.R. (1997) *Evolution of lipidic structures during model membrane fusion and relation of this process to cell membrane fusion*. Biochemistry, **36**, 6251-6259.

LEJEUNE, A., MOORJANI, M., GICQUAUD, C., LACROIX, J., POYET, P. & GAUDREAU, R.C. (1994) *Nanoerythrocyte, a new derivative of erythrocyte ghost : Preparation and antineoplastic potential as drug carrier for Daunorubicin*. Anticancer Research, **14**, 915-920.

LEJEUNE, A., POYET, P., GAUDREAU, R.C. & GICQUAUD, C. (1997) *Nanoerythrocytes, a new derivative of erythrocyte ghost : III. Is phagocytosis involved in the mechanism of action?* Anticancer Research, **17**, 3599-3604.

LEYLAND-JONES, B. (1993) *Targeted drug delivery*. Seminar in oncology, **20**, 12-17.

LEW, V.L., HOCKADAY, A., FREEMAN, C.J. & BOOKCHIN, R.M. (1988) *Mechanism of spontaneous inside-out vesiculation of red cell membranes*. The Journal of Cell Biology, **106**, 1893-1901.

LIM, F. (Ed.). (1984) Biomedical applications of microencapsulation. Boca Raton, Florida, CRC Press. pp 2-154.

LOW, P.S., WAUGH, S.M., ZINKE, K. & DRENCKHAHN, D. (1985) *The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging*. Science, **227**, 531-533.

LOW, P.S. (1989) *Interaction of native and denatured hemoglobins with band 3: Consequences for erythrocyte structure and function*. In Red Blood cell membranes (structure-function-Clinical applications) Hematology Volume 11. BRINKHOUS, K.M. & STASS, S.A. (Series eds), AGRE, P. & PARKER, J.C. (Eds.), Marcel Dekker Inc, New York and Basel, pp 237-260.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) *Protein measurement with Folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, **193**, 265-275.

LUTZ, H.U. & STRINGARO-WIPF, G. (1983) *Senescent red cell-bound IgG is attached to band 3 protein*. Biomedica Biochimica Acta, **42**, 117-121.

MACHY, P. & LESERMAN, L. (1987) Recherche en – *Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie*. Éditions INSERM, Paris, 1-177.

MAULDING, H.V. (1987), *Prolonged delivery of peptides by microparticules*. In Advances in drug delivery systems, 3 (Proceedings of the third international symposium on recent advances in drug delivery systems. ANDERSON, J.M. & KIM, S.W. (Edts.), February 24-27, 1987, Salt Lake city, UT, USA, pp 167-176.

MIZUGUCHI, H., TETSUHIKO, N., MORIOKA, Y., IMAZU, S., NAKANISHI, M., KONDO, T., HAYAKAWA, T. & MAYUMI, T. (1997) *Cytoplasmic gene expression system enhances the efficiency of cationic liposome-mediated in vivo gene transfer into mouse brain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **234**, 15-18.

MORIMOTO, Y., SUGIBAYASHI, K. & KATO, Y. (1981) *Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. Antitumor effect of microsphere-entrapped Adriamycin on liver metastasis of AH 7974 cells in rats.* Chem. Pharm. Bull., **29**, 1433-1438.

OMRI, A. & RAVAOARINORO, M. (1998) *Les liposomes : Intérêts et limites en pharmacologie dans la thérapeutique des infections bactériennes.* Canadian Journal of Clinical Pharmacology, **5**, 231-241.

OTT, P., HOPE, M., VERKLEIJ, A.J., ROELOFSEN, B., BRODBECK, U. & VAN DEENEN, L.L.M. (1981) *Effect of dimyristoylphosphatidylcholine on intact erythrocytes : Release of spectrin-free vesicles without ATP depletion.* Biochimica et Biophysica Acta, **641**, 79-87.

OUSSOREN, C., ZUIDEMA, J., CROMMELIN, D.J.A. & STORM, G. (1997) *Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose.* Biochimica et Biophysica Acta, **1328**, 261-272.

PAUKKU, T., LAURAEUS, S., HUHTANIEMI, I. & KINNUNEN, P.K.J. (1997) *Novel cationic liposomes for DNA-transfection with high efficiency and low toxicity.* Chemistry and Physics of Lipids, **87**, 23-29.

PRESCOTT, L.F., STEEL, R.F., & FERRIER, W.R. (1970) *The effects of particle size on the absorption of phenacetin in man. A correlation between plasma concentration of phenacetin and effects on the central nervous system.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, **11**, 496-504.

PUISIEUX, F. & DELATTRE, J. (1985) *Les liposomes : Applications thérapeutiques.* Technique et documentation Lavoisier, Paris, 1-379.

RITSCHER, W.-A. (1976) *Handbook of basic pharmacokinetics.* Drug Intelligence Publications, 1-9, 25-47, 62-75, 201-234 & 281-304.

ROERDINK, F., DIJKSTRA, J., HARTMAN, G., BOLSCHER, B. & SCHERPHOF, G. (1981) *The involvement of parenchymal Kupffer and endothelial liver cells in hepatic uptake of intravenously injected liposomes.* *Biochimica et Biophysica Acta*, **677**, 79-89.

ROERDINK, F.H.D. & KROOM, A.M. (Ed.) (1989) *Drug carrier systems. Horizons in biochemistry and biophysics volume 9* (QUAGLIARIELLO, E. & PALMIERI, F. series editors). John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore, 1-330 .

SCHERPHOF, G. (1991) *In vivo behaviour of liposomes: Interactions with the mononuclear phagocyte system and implications for drug targeting.* In JULIANO, RL. (Ed.) *Targeted drug delivery.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp 285-327.

SCHERRER, B. (1984) *Biostatistique.* Gaëtan Morin éditeur ltée, Boucherville, 1-841.

SCHNEIDER, M., (1984) *Liposomes as drug carriers : 10 years of research.* In *Drug Targetting* (Proceedings of the symposium on drug targetting, held in Nyon, Switzerland, on 3-5 october, 1984) BURI, P. & GUMMA, A. (Edts), Amsterdam- New York-Oxford, Elsevier Science Publishers, pp 119-134.

SHARGEL, L. & YU, A.B.C (1985) *Applied pharmacokinetics: Concepts and applications* (2nd edition), Norwalk: Appleton-Century-Croft, p 52.

SHUKLA, S.D., BERRIMAN, J., COLEMAN, R., FINEAN, J.B. & MICHELL, R.H. (1978) *Membrane protein segregation during release of microvesicles from human erythrocytes.* *FEBS Letters*, **90**, 289-293.

SNYDER, L.M., FAIRBANKS, G. & TRAINOR, J. (1985) *Properties and characterization of vesicles released by young and old human red cells.* *British Journal of Haematology*, **59**, 513-522.

SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R. & CHALMERS, P.A. (1980) *In vivo life span of resealed rabbit erythrocyte ghosts*. Research in Experimental Medicine (Berlin), **177**, 13-17.

SPRANDEL, U. & ZÖLLNER, N. (1985) *Osmotic fragility of drug carrier erythrocytes*. Research in Experimental Medicine, **185**, 77-85.

STAMATATOS, L., LEVENTIS, R., ZUCKERMANN, M.J. & SYLVIUS, J.R. (1988) *Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes*. Biochemistry, **27**, 3917-3925.

SZEBENI, J., WINTERBOURN, C.C. & CARRELL, R.W. (1984) *Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid: A liposome model*. Biochemical Journal, **220**, 685-692.

TAKAHASHI, K., KOBAYASHI, T., YAMADA, A., TANAKA, Y., INOUE, K. & NOJIMA, S. (1983) *Release of vesicles containing acetylcholinesterase from erythrocyte membranes by treatment with dilauroylglycerophosphocholine*. Journal of Biochemistry, **93**, 1691-1699.

TALLARIDA, R.J., RAFFA, R.B. & MCGONIGLE, P. (1988) *Principles on general pharmacology*. New York, Springer-Verlag, 1-17 & 31-59.

TANAKA, Y. & SCHROIT, A.J. (1983) *Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells. Recognition by autologous macrophages*. The Journal of Biological Chemistry, **258**, 11335-11343.

TANAKA, Y., INOUE, K. & NOJIMA, S. (1980) *Interaction of dilauroylglycerophosphocholine with erythrocytes*. Biochimica et Biophysica Acta, **600**, 126-139.

THORPE, S.R., FIDDLER, M.B. & DESNICK, R.J. (1975) *Enzyme therapy. V. In vivo fate of erythrocyte-entrapped β -glucuronidase in β -glucuronidase-deficient mice.* *Pediatric Research*, **9**, 918-923.

TORTORA, G.J. & GRABOWSKI, S.R. *Principes d'anatomie et de physiologie*, nouvelle édition. (traduit de l'anglais 1994), De Boeck-Wesmael, Bruxelles, 59-69 & 596-621.

VERDUN, C., COUVREUR, P., VRANCKX, H. & LENAERTS, V. (1986) *Development of nanoparticle controlled-release formulation for human use.* *Journal of Controlled Release*, **3**, 205-210.

WAGNER, G.M., CHIU, D.T.-Y., YEE, M.C. & LUBIN, B.H. (1986) *Red cell vesiculation – a common membrane physiologic event.* *The Journal of Laboratory Clinical Medicine*, **108**, 315-324.

WASAN, K.M. & LOPEZ-BERESTEIN, G. (1995) *The past, present and future uses of liposomes in treating infectious diseases.* *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **17**, 1-15.

WILLIAMSON, P., ALGARIN, L., BATEMAN, J., CHOE, H.-R. & SCHLEGEL, R. (1985) *Phospholipid asymetry in human erythrocyte ghosts.* *Journal of Cellular Physiology*, **123**, 209-214.

ZACHOWSKI, A., FAVRE, E., CRIBIER, S., HERVÉ, P. & DEVAUX, P.F. (1986) *Outside-inside translocation of aminophospholipids in the human erythrocyte membrane is mediated by a specific enzyme.* *Biochemistry*, **25**, 2585-2590.

ZAR, J.H. (1999) *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River N.J., Prentice Hall, 163-181.

ZOCCHI, E., TONETTI, M., POLVANI, C., GUIDA, L., BENATTI, U. & De FLORA, A. (1989) *Encapsulation of Doxorubicin in liver-targeted erythrocytes increases the therapeutic index of the drug in a murine metastatic model*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 2040-2044.