

Institut National de la Recherche Scientifique  
Institut Armand-Frappier

Évaluation du potentiel des exopolysaccharides à agir comme transporteurs actifs de  
médicaments anticancéreux

Par  
Nicolas Beaudet

Mémoire présenté  
pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury

Patrick Labonté

INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Patrice Hildgen, Faculté de pharmacie

Université de Montréal

Examineur interne

Patrick Labonté

INRS-Institut Armand-Frappier

Directeur de recherche

Claude Dupont

INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

Pierre Lemieux

INRS-Institut Armand-Frappier

## RÉSUMÉ

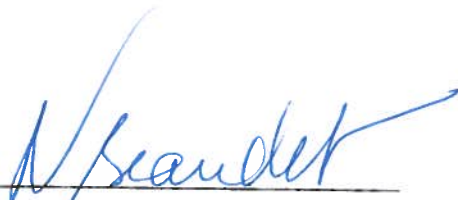
Les exopolysaccharides (EPS) produits par les bactéries lactiques sont reconnus pour agir comme agents épaississants et gélifiants dans les nourritures fermentées. Plus récemment, des effets anti-tumoraux ont été relevés lors de l'utilisation d'EPS ainsi que l'effet de ces derniers à induire la sécrétion de cytokines *in vitro*. Les propriétés rhéologiques et immunologiques des EPS sont dictées par leur composition monomérique et leur assemblage, conférant à ces molécules une structure tridimensionnelle pouvant interagir activement avec son environnement. Ces observations nous ont conduit à vérifier les hypothèses que les EPS pourraient avoir le potentiel à former un réseau micellaire favorisant le chargement de molécules hydrophobes et d'agir en synergie avec des formulations médicamenteuses anticancéreuses.

Les techniques de récupération des EPS ont été améliorées afin d'obtenir un meilleur rendement de production. Un système de filtration et de dialyse a aussi été mis de l'avant afin d'améliorer les étapes de purification. Des analyses par HPLC et par RMN ont permis de déterminer la structure de notre EPS. Des analyses par microscopie électronique ont mené à l'observation de structures semi-sphériques s'apparentant à celles des liposomes monocouches. L'utilisation du pyrène, une sonde fluorescente insoluble dans l'eau, nous a permis d'observer une modification de son profil de fluorescence en présence d'EPS. La concentration micellaire critique (estimée à 0,02% (p/v)) et la présence d'un signal d'excimère significatif nous ont conduit à croire que les EPS devraient être considérés comme un transporteur potentiel de médicaments à haute capacité de chargement, du fait de l'état d'excimère attribuable à un empilement du pyrène dans un micro-domaine hydrophobe.

Leur capacité à modifier les paramètres pharmacocinétiques de principes actifs a été étudiée afin de déterminer leur potentiel comme transporteur. Des formulations de concentrations d'EPS allant de 0,1% (p/v) à 5% (p/v) ont été testées, dégageant une tendance à modifier l'allure des courbes de pharmacocinétique.

Partant de ces observations et du fait que la littérature leur attribue des effets anti-tumoraux, nous avons évalué la synergie que pouvaient induire les EPS

sur des modèles cellulaires et animaux dans une optique de thérapie du cancer. Des lignées cellulaires tumorales ont été exposées à une dose de EPS (0,1% (p/v)) et de médicament anti-cancéreux (5-fluorouracile et paclitaxel) pour déterminer l'amélioration de l'index thérapeutique. Certains traitements ont été reproduits chez la souris dans un modèle de cancer agressif. Les résultats démontrent une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro* et une augmentation de la survie *in vivo*.



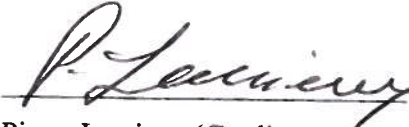
---

Nicolas Beudet



---

Claude Dupont (Directeur)



---

Pierre Lemieux (Co-directeur)

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	II
TABLE DES MATIÈRES .....	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	VI
LISTE DES TABLEAUX .....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	IX
INTRODUCTION .....	XI
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	1
1. LA THÉRAPIE MÉDICAMENTEUSE ET SES LIMITES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER .....	1
1.1 INTRAVEINEUX (I.V.) .....	1
1.2 ORAL (P.O.) .....	2
2 LE TRACTUS GASTRO INTESTINAL (TGI) .....	4
2.1 GÉNÉRALITÉS .....	4
2.1.2 Gros intestin .....	5
2.2 LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE : STRATÉGIES DE TRANSIT. ....	6
2.2.1 Circulation lymphatique .....	7
2.2.2 Tissus lymphoïdes .....	8
2.2.3 Pompe à reflux et enzymes de détoxification .....	9
3. LE CANCER DU CÔLON .....	10
3.1 STATISTIQUES .....	10
3.2 FACTEURS D'APPARTION .....	10
3.3 STADES .....	11
4. LES TRANSPORTEURS DE MÉDICAMENTS .....	14
4.1 TRANSPORTEURS NATURELS .....	16
4.2 TRANSPORTEURS ARTIFICIELS .....	19
5 LES EXOPOLYSACCHARIDES (EPS) .....	22
5.1 COMPOSITION .....	22
5.2 FONCTIONS .....	23
5.3 KÉFIR .....	24
5.3.1 Provenance .....	25
5.3.2 Composition .....	25
5.3.3 Kéfiran .....	26
5.4 PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DES EPS .....	26
6. OBJECTIF DE TRAVAIL .....	29
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	31
1. EXOPOLYSACCHARIDES .....	31
1.1 SOURCE .....	31
1.1.1 Extraction .....	31
1.1.2 Purification et conservation .....	31
1.2 CARACTÉRISATION CHIMIQUE .....	32

1.2.1	HPLC.....	32
1.2.2	H-RMN.....	33
1.2.3	Analyse élémentaire.....	33
1.3	CARACTÉRISATION PHYSIQUE.....	34
1.3.1	Microscopie électronique.....	34
1.3.2	Spectrofluorométrie.....	34
2.	CELLULES CANCÉREUSES .....	35
2.1	ORIGINE .....	35
	ORIGINE.....	35
2.2	CONDITIONS DE CULTURE.....	35
2.3	TESTS DE VIABILITÉ .....	36
3.	PHARMACOCINÉTIQUES.....	36
3.1	MODÈLE DE RONGEURS.....	36
3.2	ANALYSE PAR SPECTROFLUOROMÉTRIE .....	37
4.	MODÈLE MURIN DE CANCER.....	37
4.1	PRÉPARATION.....	37
4.2	ANALYSE.....	38
5.	MODÈLE DE RÉCUPÉRATION IN VIVO .....	38
5.1	PRÉPARATION.....	38
5.2	ANALYSE.....	38
	CHAPITRE 3 : RÉSULTATS .....	39
3.1	CARACTÉRISATION .....	39
3.1.1	Rendements .....	39
3.1.2	Composition et structure .....	39
3.1.3	Analyse élémentaire.....	41
3.1.4	Microscopie électronique .....	42
3.2	DÉTERMINATION DE LA FORMATION DE MICELLES ET DU POTENTIEL D'ENCAPSULATION .....	43
3.3	PHARMACOCINÉTIQUE .....	50
3.3.1	Transport de fluorescéine .....	50
3.3.2	Transport de rhodamine 123.....	53
3.4	DÉTERMINATION DU POTENTIEL ANTICANCÉREUX SUR DES LIGNÉES CELLULAIRES .....	54
3.4.1	Cellules prolifératives .....	54
3.4.2	Cellules différenciées.....	55
3.5	DÉTERMINATION DE L'EFFET EX VIVO DES EPS.....	57
3.6	DÉTERMINATION DU POTENTIEL ANTICANCÉREUXI IN VIVO .....	58
	CHAPITRE 4 : DISCUSSION .....	61
	REMERCIEMENTS .....	78
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	79

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

5-ASA :	5-aminosalicylate
5FU :	5-fluorouracile
ABC :	Transporteur de type ABC (ATP-binding cassette)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ATP :	Adénosine tri-phosphate
AUC :	Aire sous la courbe
B16F10 :	Mélanome de peau de souris ( <i>Mus musculus</i> )
Balb/c :	Souris « Bagg Albino » de type consanguine
C57BL/6 :	Souris noire de type consanguine
Caco-2 :	Adénome de cancer colorectal humain ( <i>Homo sapiens</i> )
CCHPN :	Syndrome non polyposique héréditaire
CMC :	Concentration micellaire critique
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DTH :	Réaction d'hypersensibilité retardée
EPS :	Exopolysaccharide
FA :	Acide folique
FdUMP :	Fluorodéoxyuridine monophosphate
FL :	Fluorescéine
<i>i.p.</i> :	Intrapéritonéal
<i>i.v.</i> :	Intraveineux
IFN :	Interféron
IL :	Interleukine
KDa :	Kilo Daltons
KGf-C :	Portion soluble de polysaccharides provenant de grains de kéfir
LAB :	Bactérie à acide lactique
MDR :	Protéine de résistance aux médicaments (Multi drug resistant protein)
PBMC :	Cellules mononucléaires périphériques du sang
PEO :	Oxide de polyéthylène
P-gp :	P-glycoprotéine
PK :	Pharmacocinétique

<i>p.o.</i> :	<i>per os</i>
Prot.K :	Protéase K
R123 :	Rhodamine 123
RES :	Système réticuloendothélial
SCFA :	Acides gras à chaîne courte
SPG :	Schizophyllan
TGI :	Tractus gastro-intestinal
TNF:	Tumor necrosis factor
TS :	Thymidylate synthase
U :	Unité internationale
XTT :	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 :	CLASSIFICATION DES CANCERS COLORECTAUX SELON L'AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER [34]. .....	12
TABLEAU 2 :	POLYMÈRES NATURELS ET ARTIFICIELS TESTÉS POUR LE TRANSPORT ORAL DE MÉDICAMENTS [39]. .....	15
TABLEAU 3 :	PROGRAMME D'INJECTION DES SOLVANTS EN VUE DE L'IDENTIFICATION DES UNITÉS MONOSACCHARIDIQUES COMPOSANT LES EPS. ....	34
TABLEAU 4 :	RENDEMENTS DE PRODUCTION DES DIFFÉRENTS LOTS D'EPS... ..	39
TABLEAU 5 :	POURCENTAGE D'ÉLÉMENTS TELS QUE LE CARBONE (C), L'HYDROGÈNE (H), L'AZOTE (N) ET LE SOUFRE (S) CONTENUS DANS NOS EPS EN COMPARAISON AVEC LES POURCENTAGES DÉTERMINÉS DANS LA LITTÉRATURE POUR LE KÉFIRAN [2]. .....	42



## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 :	BARRIÈRES MAJEURES AU DÉVELOPPEMENT D'UNE FORMULATION ORALE DE PROTÉINES OU DE PEPTIDES. ....	7
FIGURE 2 :	CLICHÉS DE LA STRUCTURE MOLÉCULAIRE DYNAMIQUE DU EPS DE LACTOBACILLUS HELVETICUS LH59 DANS L'EAU. ....	24
FIGURE 3 :	PROFIL HPLC TYPE APRÈS HYDROLYSE ACIDE DES EPS (LOT NBE4).....	40
FIGURE 4 :	STRUCTURE DU EPS NBE2 DÉTERMINÉE PAR ANALYSE DE BRANCHEMENT EFFECTUÉE PAR L'ÉQUIPE DU DR. MICHEL GILBERT PH.D. (CNRC, OTTAWA). ....	41
FIGURE 5 :	MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION D'UNE SOLUTION D'EPS NBE4 1% (P/V) EN COLORATION NÉGATIVE À L'ACÉTATE D'URANYLE.....	43
FIGURE 6 :	PROFIL TYPE DE FLUORESCENCE DU PYRÈNE DANS L'EAU OU EN SOLUTION D'EPS (NBE2 0,1% (P/V)).....	44
FIGURE 7 :	COURBE SIGMOÏDALE TYPE DU RATIO $I_3/I_1$ POUR LA DÉTERMINATION DE LA CMC DES EPS (LOT NBE3). ....	45
FIGURE 8 :	PROFIL DE FLUORESCENCE DU PYRÈNE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DES EPS (LOT NBE2). ....	46
FIGURE 9 :	PROFIL DE FLUORESCENCE DU PYRÈNE EN FONCTION DU LOT D'EPS UTILISÉ. ....	47
FIGURE 10 :	PROFIL TYPE DE FLUORESCENCE DU PYRÈNE DANS L'EAU ET EN PRÉSENCE D'EPS (LOT NBE4). ....	48
FIGURE 11 :	COURBE SIGMOÏDALE TYPE DU RATIO $I_{336}/I_{333}$ POUR LA DÉTERMINATION DE LA CMC DES EPS (LOT NBE4). ....	49
FIGURE 12 :	PROFILS DES SPECTRES OBTENUS AVEC DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS D'EPS (LOT NBE4). ....	50
FIGURE 13 :	COMPILATION DE COURBES DE CONCENTRATION PLASMATIQUE DE FLUORESCÉINE EN FONCTION DU TEMPS.....	52
FIGURE 14 :	COMPILATION DE COURBES DE CONCENTRATION PLASMATIQUE DE RHODAMINE 123 EN FONCTION DU TEMPS. ....	53
FIGURE 15 :	SURVIE DE CELLULES B16F10 EN PRÉSENCE DE 5FU FORMULÉ OU NON AVEC LES EPS NBE3. ....	55

- FIGURE 16 : SURVIE DE CELLULES CACO-2 DIFFÉRENCIÉES EN PRÉSENCE DE 5FU FORMULÉ OU NON AVEC LES EPS NBE3.. ..... 56
- FIGURE 17 : SURVIE DE CELLULES CACO-2 EN PROLIFÉRATION EN PRÉSENCE DE 5FU FORMULÉ OU NON AVEC LES EPS NBE3.. ..... 57
- FIGURE 18 : POURCENTAGE DE SOURIS AFFICHANT DES TUMEURS 14 JOURS APRÈS L'INJECTION INTRAMUSCULAIRE DE CELLULES B16F10 TRAITÉES AU PACLITAXEL +/- EPS NBE3 0,1% (P/V).. ..... 58
- FIGURE 19 : PROBABILITÉ DE SURVIE DE SOURIS BALB/C EN FONCTION DU TEMPS. (5FU ET/OU EPS NBE2 0,1% (P/V)).. ..... 59
- FIGURE 20 : PROBABILITÉ DE SURVIE DE SOURIS BALB/C EN FONCTION DU TEMPS. (5FU ET/OU EPS NBE3 0,1% (P/V)).. ..... 60

## INTRODUCTION

Le développement de technologies pour les thérapies anticancéreuses est d'actualité. Selon les statistiques de Santé Canada, le cancer se situe au deuxième rang en rapport aux taux de mortalité et en coûts rattachés aux soins, tout juste derrière les maladies cardiovasculaires. Les prévisions indiquent que le cancer pourrait atteindre le premier rang des maladies létales au Canada d'ici peu.

Dans le cas d'un cancer de stade I, la première procédure consiste habituellement à exciser la tumeur par méthode chirurgicale. Au-delà de cette procédure, la chimiothérapie peut être employée afin d'éliminer ou de diminuer le nombre de cellules tumorales omises par la chirurgie. Dans un stade II ou supérieur, la chirurgie est trop invasive pour un cancer en phase de propagation. La radiothérapie et la chimiothérapie deviennent alors les seules alternatives. Une panoplie de médicaments antinéoplasiques est disponible sur le marché, cependant leur efficacité est variable et les effets secondaires encourus sont multiples. La 5-Fluorouracile (5FU) est un agent chimiothérapeutique utilisé dans le traitement de plusieurs cancers. Il est généralement administré par voie intraveineuse ou, dans le cas d'un cancer de la peau, il est utilisé en application topique. Le principal attrait de l'administration intraveineuse est d'augmenter la biodisponibilité de l'agent thérapeutique en évitant les barrières physiques de l'organisme et le cycle entéro-hépatique. Cependant, les effets secondaires systémiques sont sévères et la clairance du médicament est rapide d'où la nécessité de procéder à plusieurs traitements.

Les thérapies par la voie orale sont plus simples à administrer et plus agréables pour les patients et nécessitent moins de personnel soignant qualifié pour le suivi. Par contre, pour l'industrie pharmaceutique, la biodisponibilité suite à une administration orale est un facteur limitant dans le développement d'agents thérapeutiques. Des facteurs tels que la dysphagie, la liposolubilité du médicament, la motilité intestinale, l'activation des transporteurs membranaires, la toxicité pouvant être causée au niveau des muqueuses intestinales, la dégradation soit physico-chimique soit enzymatique, les interactions plasmatiques sont des raisons qui peuvent affecter la

biodisponibilité d'un médicament administré oralement. Différentes stratégies sont alors envisageables afin d'augmenter la biodisponibilité orale d'un médicament; par exemple en procédant par des modifications physico-chimiques afin d'en améliorer la biodisponibilité. Une autre approche peut consister à modifier l'environnement immédiat du médicament afin de le protéger et d'en améliorer son absorption. Le présent projet vise cette dernière stratégie par l'introduction des exopolysaccharides comme transporteurs de médicaments. De tels transporteurs pourraient jouer un rôle biologique et donc améliorer la réponse thérapeutique de médicaments de façon synergique.

La caractérisation de ce nouveau véhicule de transport pourrait permettre l'intégration et le développement de concepts afin de développer de nouvelles stratégies pour l'augmentation de la biodisponibilité et de l'efficacité d'agents thérapeutiques à la suite d'une administration orale.

Lors du processus de fermentation du lactosérum par un consortium bactérien, les exopolysaccharides (EPS) de cette étude, un polymère de masse moléculaire élevée, sont sécrétés dans le milieu. On leur reconnaît des propriétés rhéologiques (gélifiant et émulsifiant) permettant d'obtenir des matrices d'une consistance d'intérêt pour l'industrie alimentaire. Les EPS sont divisés en deux familles, soit les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Les EPS utilisés dans cette étude sont des hétéropolysaccharides, ces derniers sont en général composés de quatre à sept unités monosaccharidiques hétérogènes branchées, unités répétées jusqu'à atteindre des tailles de 500 kiloDaltons ou plus. Ces biopolymères amphiphiles acquièrent une structure tridimensionnelle hélicoïdale et s'assemblent en hydrocolloïdes lorsqu'ils sont en solution. Des formulations à base de polysaccharides auraient dernièrement démontré un potentiel à transporter plusieurs types de médicaments [1]. Par ailleurs, on attribuerait aux EPS des propriétés bénéfiques sur la santé comme la modulation du système immunitaire et la protection contre certains cancers [2-6]. Plus récemment, il a été avancé qu'une fraction purifiée d'EPS de *Lactobacillus rhamnosus* aurait un effet immunomodulateur sur les lymphocytes humains. La dite fraction stimulerait entre autres la production de cytokines comme le

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 et l'IFN- $\gamma$  [7]. La stimulation du système immunitaire par les EPS pourrait expliquer en partie les études démontrant les propriétés anticancéreuses des EPS. Finalement, après l'administration orale, il a été rapporté que les EPS passeraient en circulation sanguine pour s'accumuler dans le foie, le colon et la vessie [8]. Les EPS pourraient donc avoir le potentiel de modifier le transport oral de médicaments et le potentiel de modifier la réponse biologique.

Dans l'exemple du cancer colorectal, une thérapie administrée par voie orale serait nettement avantageuse mettant en contact direct le médicament et les cellules affectées tout en réduisant les effets secondaires non désirés. Les cellules en prolifération rapide (e.g. cellules tumorales) en bordure de la lumière intestinale seraient plus sujettes à la médication que les cellules saines qui incorporent le médicament à un rythme nettement inférieur.

La présente étude a pour but de mettre en perspective le développement d'une technologie applicable à certains types de cancers ainsi qu'à différents agents thérapeutiques étant donné la potentielle polyvalence des EPS à formuler différentes molécules. L'utilisation d'un modèle à contact direct devrait permettre d'évaluer l'efficacité possible des EPS à réduire les effets secondaires du médicament tout en augmentant sa réponse par un effet synergique qui pourrait être envisageable étant donné les effets biologiques qui seraient attribués aux EPS.

À ce jour, nous avons travaillé à améliorer la technique de purification des EPS pour l'obtention de meilleurs rendements dans un délai de temps plus appréciable. Nous sommes aussi à mettre au point une technique pour améliorer la purification des EPS et contourner la nécessité d'utiliser de l'éthanol lors de ces étapes. Nous avons aussi réalisé plusieurs expériences afin de mettre en évidence le potentiel des EPS à agir comme adjuvants dans une problématique de transport de médicaments reliés au domaine de la thérapie anticancéreuse orale.

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. La thérapie médicamenteuse et ses limites dans le traitement du cancer

#### 1.1 Intraveineux (*i.v.*)

L'administration intraveineuse est la plus rapide des voies d'administration utilisées. L'injection par bol, soit une quantité fixe en une seule injection, induit une concentration systémique très élevée du médicament. La concentration maximale qui atteindra le tissu désiré varie donc en fonction de la rapidité d'injection. Une deuxième méthode d'injection par voie intraveineuse consiste à procéder par infusion. Cette technique permet d'éviter des concentrations systémiques transitoires trop élevées et de diminuer l'absorption du médicament dans des sites non visés.

Bien que la plus rapide et la plus utilisée en chimiothérapie anticancéreuse, la voie *i.v.* comporte des désavantages. En absence de métastases, l'usage d'une médication intraveineuse est à éviter. La formulation thérapeutique induit des effets secondaires pouvant être sévères dans des endroits non spécifiques au traitement. Bien que la distribution soit d'autant plus rapide, l'élimination du médicament est aussi accélérée puisque la molécule se retrouve directement dans la circulation. La fenêtre thérapeutique se rétrécit, obligeant le développement de stratégies afin d'améliorer le temps de résidence du médicament dans l'organisme. Cet aspect peut devenir problématique lors de l'utilisation de médicaments dont la demi-vie est courte. À l'ensemble de ces désavantages se greffe évidemment la nécessité de se déplacer en clinique externe pour recevoir les traitements par du personnel qualifié. Certains traitements doivent être donnés sur plusieurs heures, à plusieurs reprises, diminuant donc la qualité de vie du patient [9].

Par exemple, le paclitaxel a pris une place d'importance dans le traitement de diverses tumeurs. Cependant, dans les approches cliniques, ce médicament est administré par la voie intraveineuse dû, entre autres, en raison de sa solubilité très réduite en milieu aqueux. Le paclitaxel doit alors être formulé à des excipients (e.g. Cremophor EL) qui peuvent atteindre jusqu'à 1% du volume plasmatique ce qui engendre des réactions d'hypersensibilité sévères en plus

d'effets secondaires reliés au médicament [10]. De plus, ce genre d'excipient affecte la distribution régulière du paclitaxel [10].

### 1.2 Oral (*p.o.*)

En plus de diminuer les effets secondaires reliés aux excipients utilisés, les avantages sont nombreux en administration *p.o.* Premièrement, l'observance du patient ne peut être qu'améliorée par la diminution du nombre de visites nécessaires en clinique externe. La posologie est plus simple à suivre, diminuant la nécessité de personnel qualifié. Les effets secondaires peuvent être diminués considérablement et le médicament peut être distribué sur une plus longue période de temps suivant le temps de transit et d'absorption du médicament dans l'intestin. La portion de médicament rejeté lors du passage entéro-hépatique dans les sels biliaires peut aussi être réabsorbée par le tractus intestinal, permettant une recirculation du produit thérapeutique, créant ainsi un réservoir qui prolonge l'action du médicament [9].

Les traitements oraux représentent aussi un avantage dans le traitement des anomalies du côlon (colite ulcéreuse, maladie de Crohn, carcinomes, infections) par l'augmentation locale de la concentration du médicament, dans les tissus intestinaux, tout en minimisant les effets secondaires dus au relargage précoce dans la partie supérieure de l'intestin ou en raison d'une absorption systémique inutile. Le côlon est riche en tissus lymphoïdes, le rendant ainsi un lieu favorable pour la présentation de molécules dans une optique de vaccination mucoale. Les mastocytes de la muqueuse du côlon permettent l'induction rapide de la sécrétion d'anticorps [11]. Le côlon est aussi reconnu comme ayant des propriétés physicochimiques différentes que le reste du tractus gastro-intestinal (TGI) et le temps de rétention dans cette portion du tractus est plus long rendant l'absorption de médicaments normalement faiblement absorbés plus efficace [12].

La voie orale a longtemps été considérée impraticable étant donné la biodisponibilité réduite affichée par plusieurs médicaments [13]. Différentes raisons font en sorte que le médicament n'est pas absorbé, notamment dues aux pompes à reflux de médicaments, ainsi que le cycle entéro-hépatique et l'action du cytochrome P450. Ces deux systèmes sont très limitants pour un

médicament dans la tentative d'atteindre la circulation systémique [14]. Cependant, certaines stratégies sont développées pour contourner chacune de ces problématiques et pour permettre à la voie orale de demeurer une option thérapeutique.

Chaque pays a ses réglementations au niveau de l'administration orale de médicaments. Le Japon utilise déjà la 5FU en traitement oral journalier pour la rémission post opératoire lors de la résection de tumeurs malignes. Aux États-Unis en 2001, la réglementation autorisait seulement l'administration intraveineuse de 5FU sur une base de 5 jours/semaine. Des essais sont effectués afin d'administrer les traitements oraux de 5FU sur une base identique afin d'obtenir des résultats similaires. Les résultats préliminaires démontrent déjà un regain de poids du patient pendant les deux jours sans médication, un effet antitumoral accru et une meilleure efficacité thérapeutique comparativement au groupe traité quotidiennement sans interruption. Les essais cliniques mis en place incluent déjà ce nouveau traitement [15]. Les nouveaux pro-médicaments instaurés lors des deux dernières années ouvrent une voie intéressante afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique du traitement. Idéalement, les pro-médicaments sont des conjugués stables et inactifs dans le sang et qui sont scindés, par exemple, lors du passage dans le foie ou lors de l'internalisation de ce conjugué dans la cellule cancéreuse, libérant alors la molécule thérapeutique active. Ainsi, le Tegafur, scindé en 5FU dans le foie, permet d'obtenir des niveaux plasmatiques de molécules actives supérieurs. Un autre pro-médicament, la doxorubicine, une anthracycline utilisée comme agent anticancéreux conjugué à des anticorps monoclonaux, a prouvé être efficace contre des cellules cancéreuses implantées *in vivo*. Le complexe doxorubicine-anticorps monoclonaux serait plus efficace que la doxorubicine seule à atteindre et agir sur les cellules tumorales visées tout en diminuant les effets systémiques toxiques. Guillemard et collaborateurs (2004) avancent dans leur étude que le conjugué thérapeutique de doxorubicine pourrait contourner le mécanisme des protéines de résistance aux médicaments (MDR) expliquant ainsi la toxicité accrue du conjugué envers les cellules tumorales [16].



## 2 Le tractus gastro-intestinal (TGI)

### 2.1 Généralités

Le petit intestin constitue le site majeur d'absorption de nutriments dans tout le tractus gastro-intestinal (TGI). Environ 90% de l'absorption s'y produit étant donné la surface particulière de la membrane. La présence de microvillosités multiplie l'aire de contact et les fluides physiologiques qu'on y retrouve favorisent la présentation et l'absorption des nutriments. L'estomac pour sa part, constitue principalement un réservoir et un organe mélangeur pour l'ensemble du bolus ingéré. Son épithélium est de nature non absorbant et sa surface d'absorption est réduite en comparaison au reste de l'intestin. Le TGI est composé principalement de quatre couches cellulaires de base soit : la muqueuse ; composée de cellules épithéliales cylindriques, la sous-muqueuse ; constituée de tissu de soutien, la musculuse ; de muscles lisses et la séreuse ; de cellules épithéliales squameuses et de tissu de soutien. Les cellules muqueuses du système gastrique sont responsables de la sécrétion de plusieurs enzymes et substances telles que la pepsine, la lipase, l'acide chlorhydrique, les facteurs intrinsèques et sont aussi imperméables aux constituants du sang à l'exception de l'eau, de l'alcool, des ions et de certains médicaments.

#### 2.1.1 Petit intestin

Le petit intestin, composé du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, constitue le site privilégié d'absorption avec ses replis circulaires et ses microvillosités responsables de la très grande surface d'absorption. La muqueuse est tapissée de villosités abritant les conduits responsables de la distribution des nutriments absorbés (veinules, capillaires, artérioles, vaisseaux chylifères).

La circulation lymphatique représente un intérêt dans le transport de molécules étant donné que les molécules y transitant, trop grosses pour passer par les capillaires, peuvent ainsi éviter le métabolisme de premier passage hépatique [9]. Ce métabolisme intervient lorsque les molécules pénétrant dans le sang par les capillaires de l'intestin prennent la voie de la veine porte pour se rendre au foie et subir le processus de tri et de détoxification par l'organisme. Le

passage entéro-hépatique est responsable de l'élimination de plusieurs médicaments par leur transformation chimique afin d'augmenter leur clairance entérique, dans les sels biliaires, ou rénale avec ou sans modification par l'enzyme hépatique P450. D'autres systèmes présents dans le petit intestin constituent les cellules de Paneth, situées en petit nombre dans les glandes intestinales, elles sont responsables pour leur part d'une partie importante de la phagocytose dans le petit intestin [9]. C'est aussi un site intéressant pour le transport de médicaments. Enfin, les Plaques de Peyer constituent une autre voie de plus en plus primée dans la recherche d'une entrée pour un produit thérapeutique par l'utilisation de transporteurs [17, 18].

### 2.1.2 Gros intestin

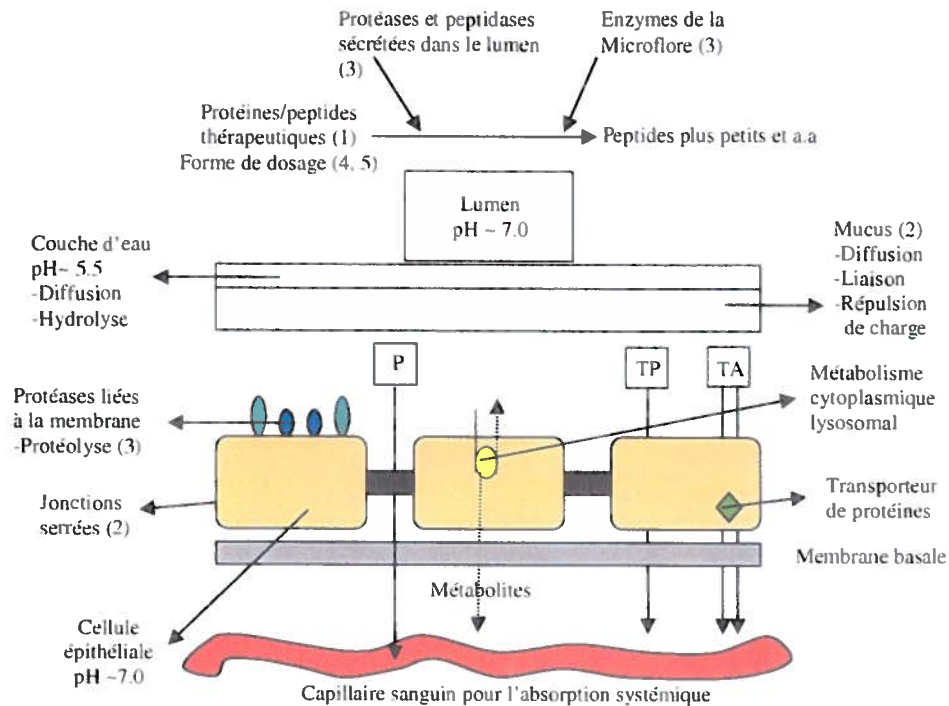
Le gros intestin pour sa part est considéré comme un site de réabsorption de l'eau et d'emmagasinage fécal. L'épithélium du côlon repose sur des cellules cylindriques spécialisées dans l'absorption de l'eau et dans la production de mucus. Aucune enzyme n'est sécrétée dans le gros intestin, cependant la dernière étape de digestion est effectuée par la communauté bactérienne. Celle-ci y sécrète une quantité d'enzymes et de vitamines. C'est d'ailleurs la flore bactérienne intestinale qui est responsable d'un apport important en vitamines (B et K particulièrement) et le côlon possède des mécanismes et des récepteurs spécifiques pour permettre l'absorption de ces vitamines. Cet élément n'est pas à négliger dans la recherche contre le cancer étant donné qu'on trouve des liens de plus en plus évident que l'absorption de certaines vitamines, comme la vitamine D, a un rôle protecteur contre le développement de cancers colorectaux [19]. Les stratégies de thérapies médicamenteuses visant le côlon comme site d'absorption ont donc plus de chances d'éviter les conditions sévères amenant à la dégradation rencontrée dans le reste du TGI.

## 2.2 La barrière épithéliale : stratégies de transit.

Il existe deux mécanismes d'absorption au niveau de la barrière intestinale. D'une façon transcellulaire ou d'une façon paracellulaire. Ces deux voies sont importantes pour évaluer et concevoir un transporteur de médicaments (Figure 1).

Dans le premier des cas, la conjugaison d'un lipide à une molécule de style peptidique pourra améliorer son transport transcellulaire [9]. Il sera aussi important de réduire le nombre de liaisons hydrogènes (H) du composé. Conradi et collaborateurs (1991) ont démontré que la diffusion des peptides transitant par cette voie était corrélée à la présence de liens H [20]. Ainsi, les systèmes de transport de médicaments peptidiques produisant beaucoup de liens H avec l'eau sont défavorisés dans la diffusion transcellulaire en raison de l'énergie nécessaire à briser ces liens lors de leur entrée dans la membrane cellulaire [20]. La formulation du médicament avec un véhicule lipidique est donc l'approche à suivre dans le cas particulier où le médicament sera liposoluble ainsi il sera associé dans la circulation sanguine à des chylomicrons.

La voie paracellulaire ne repose pas sur les mêmes mesures puisqu'il s'agit de transiter au niveau des jonctions cellulaires, au travers de pores aqueux de 50 Å de rayon [21]. L'influence du passage se fera donc selon la grosseur des particules, de leur solubilité et enfin si ces deux caractéristiques sont semblables, les molécules chargées positivement auront une meilleure perméabilité que les molécules de charge nette négative. Des études ont été menées démontrant que les jonctions serrées de l'intestin seraient dynamiques [22], ouvrant la voie à des possibilités intéressantes, soit d'ouvrir de façon temporaire et réversible les interstices cellulaires afin d'améliorer le transport de médicaments. Cependant, il faut rester vigilant avec cette approche afin de bien contrôler le temps d'ouverture de ces jonctions qui deviennent alors la porte d'entrée pour différentes molécules non désirées, lors d'utilisations prolongées de ces substances.



**Figure 1. Barrières majeures au développement d'une formulation orale de protéines ou de peptides. Ces barrières sont 1) une pauvre perméabilité intrinsèque à travers les membranes biologiques, 2) dégradation enzymatique dans tractus le gastro-intestinal ainsi que la fermentation bactérienne dans le côlon, 3) élimination post-absorption rapide et 4) instabilité chimique et/ou absorption non-spécifique à une variété de surfaces physiques et biologiques [23].**

### 2.2.1 Circulation lymphatique

Environ 10% du glucose absorbé transite par la circulation lymphatique [24]. Cet exemple indique bien l'intérêt que représente la voie lymphatique afin de contourner le premier passage hépatique dans une optique de transport de médicaments. Si un certain pourcentage de glucose peut passer par cette voie, il est donc possible de modifier le transport d'un médicament pour favoriser ce mode d'entrée afin d'améliorer la biodisponibilité d'un médicament ou de favoriser la présentation d'un transporteur synergique aux cellules du système immunitaire pour accroître la réponse du médicament (ganglions lymphatiques). Ainsi donc, l'ajout d'un potentialisateur d'absorption afin d'ouvrir les jonctions serrées et d'augmenter la perméabilité pour les macromolécules hydrophiles ou conjuguées permet d'accroître le flux de

molécules qui pénétreront la circulation lymphatique étant donné la plus grande porosité de ces vaisseaux comparativement aux veinules.

### 2.2.2 Tissus lymphoïdes

Les tissus lymphoïdes de l'intestin, nommés précédemment sous le nom de Plaques de Peyer, couvrent environ 25% de la surface de la muqueuse dans l'intestin et seraient responsables de l'échantillonnage des antigènes présentés par la voie orale [25]. La proportion et la taille des Plaques de Peyer est cependant variable selon l'âge ou l'espèce étudiée et varie aussi selon la section de l'intestin. Les cellules B et les cellules T seraient responsables du mécanisme de reconnaissance des antigènes des Plaques de Peyer. Les cellules B par exemple, y génèrent une forte proportion de clones ne produisant que des IgAs. Les cellules T, pour leur part, y amplifient la maturation des cellules B productrices d'anticorps IgAs [26]. Les Plaques de Peyer peuvent donc être considérées comme un site d'initiation de l'immunité mucosale [9]. Les Plaques de Peyer sont recouvertes d'une couche de cellules identifiées comme étant les cellules M. Ces cellules sont responsables du transport des antigènes de la lumière intestinale jusqu'à l'espace interstitiel, endroit dans lequel les lymphocytes, lymphoblastes et macrophages sont en attente dans les replis du tissu lymphoïde [27]. On comprend bien pourquoi les Plaques de Peyer sont ciblées pour la vaccination orale. Celles-ci commencent aussi à être ciblées pour le transport de médicaments. C'est un site opportun pour faire entrer des molécules et stimuler le système immunitaire si le transporteur s'y prête. Les caractéristiques de surface et la grosseur des particules sont les facteurs limitant de transit par les Plaques de Peyer. Les molécules hydrophobes de tailles inférieures à 3  $\mu\text{m}$  y pénètrent plus facilement. Au-delà de cette taille, les particules y sont séquestrées et ne peuvent migrer vers les nodules lymphatiques [17]. Certains essais ont été effectués à l'aide de lectines ou de poloxamères pour cibler le transport vers les Plaques de Peyer. Dans le premier cas, l'approche a été un succès alors que dans le deuxième cas, le caractère hydrophile du transporteur a nuit à l'absorption des particules par les tissus lymphoïdes [28]. Ces caractéristiques laissent donc place aux technologies de micro et nanoencapsulation pour le

transport de médicaments et constituent une autre façon de contourner l'élimination hépatique de premier passage.

### 2.2.3 Pompe à reflux et enzymes de détoxification

Un autre aspect important susmentionné plus tôt, consiste en la présence de P-glycoprotéines (P-gp) et de cytochromes P450. Ces deux mécanismes peuvent être limitants dans le domaine de la médication orale. La P-gp est un transporteur de type ABC lié à une protéine de résistance aux médicaments (multidrug resistance, MDR). La P-gp est retrouvée dans les cellules tumorales, les reins, le cerveau, le foie et dans l'intestin. La P-gp protège l'organisme contre les xénobiotiques en les excréant dans la bile, l'urine et la lumière intestinale afin de protéger le cerveau et le placenta dans le cas de grossesses. Plusieurs médicaments, par exemple les médicaments anticancéreux, sont des substrats de la P-gp [29]. Dans l'intestin, la P-gp est principalement retrouvée au niveau apical retardant ou diminuant le passage des médicaments vers les capillaires puisque son efficacité à refluer les molécules dans la lumière intestinale est impressionnante. Elle favorise ainsi le passage des molécules lipophiles vers la voie transcellulaire. La P-gp rend aussi son contrôle difficile étant donné qu'il y a beaucoup de variabilité intra-individuelle dans son expression [30]. Bien qu'en majeure partie la détoxification ait lieu dans le foie, on retrouve une co-localisation de la P-gp et du cytochrome P450 dans l'intestin [31]. L'action combinée de ces deux mécanismes qui travaillent en synergie réduit considérablement la biodisponibilité de certains médicaments. La P-gp, en refoulant l'entrée massive de médicament, permet d'éviter la saturation de la P450, ce qui donne le temps à cette dernière de métaboliser les molécules les rendant plus aptes à l'élimination [32].

### 3. Le cancer du côlon

#### 3.1 Statistiques

Comme précédemment mentionné, le TGI présente de multiples limitations quant à la thérapie par voie orale. Cependant, la recherche se doit d'être poursuivie dans ce domaine. Le cancer du côlon représente donc une direction intéressante pour le projet discuté dans cette étude. Les thérapies présentement utilisées dans le cas de cancers du côlon le sont principalement par voie intraveineuse alors que l'affectation se situe au niveau de la muqueuse intestinale. Les EPS ont démontré avoir des effets immunomodulateurs et antitumoraux [2-6] et pourraient donc afficher un effet biologique additif ou synergique aux effets du médicament transporté. De plus les perspectives d'avenir des EPS de cette étude sont orientées vers le transport oral. Leurs effets au niveau de la muqueuse intestinale présentent un intérêt pour le traitement de pathologies de l'intestin. L'utilisation de modèles de cancer chez les animaux permettra d'avancer des hypothèses dans l'optique de transport oral.

En 2003 au Canada, on estime à 18 000 (54% d'hommes, 46% de femmes) le nombre de personnes qui recevront un diagnostic de cancer colorectal et à 8300 le nombre de personnes qui en mourront. En moyenne, chaque semaine, 346 Canadiens apprendront qu'ils sont atteints d'un cancer colorectal, et de ce nombre 160 mourront d'un cancer colorectal (Source : Santé Canada).

#### 3.2 Facteurs d'apparition

La néoplasie du côlon et du rectum dépend à la fois de facteurs transmis et de facteurs exogènes. L'alimentation est le facteur exogène le plus étudié. Une corrélation a été établie dans plusieurs études entre le risque de ce type de cancers et l'absorption de graisses, particulièrement saturées et d'origine animale. Ceci se reflète aussi par le fait que les habitants des pays asiatiques, dont les statistiques affichent une faible incidence de cancer colorectal, ont

une alimentation se limitant au maximum à 20% de lipides, alors que la population des pays occidentaux pourrait être soumise à une plus haute incidence de cancer étant donné leur régime dont le pourcentage de lipides est du double. Ceci pourrait être lié à une augmentation de la sécrétion de stérols biliaires, d'où une prolifération épithéliale colique accentuée, la modification des membranes cellulaires, la stimulation de la synthèse des prostaglandines conduisant à la prolifération cellulaire.

Les fibres ainsi que les fruits et légumes semblent avoir un effet au niveau de la réduction de l'apparition de ce type de cancer en raison de leur capacité à fixer les substances cancérigènes et permettre leur élimination dans la vidange gastrique. Ces substances permettent aussi de modifier la flore microbienne et d'acidifier la lumière intestinale par des acides gras à chaîne courte (SCFA) réduisant aussi les risques de cancer [33]. L'obésité, la surcharge de calories, le manque de vitamine D et de calcium sont aussi des facteurs négatifs à l'étude dans l'apparition de la pathologie. L'âge est aussi un facteur important. Le suivi se fait dès l'âge de 50 ans étant donné que c'est à cette période que les cas de cancer colorectaux commencent à augmenter.

L'hérédité a aussi sa part dans l'apparition de la pathologie. Les syndromes polyposiques représentent environ 1% des cas alors que les syndromes non polyposiques héréditaires (CCHPN) comptent pour 6%. Le gène de prédisposition à la polypose adénomateuse familiale se retrouve sur le bras long du chromosome 5 dont la mutation du locus génique entraîne la formation d'une protéine tronquée responsable de l'apparition de la maladie. Le CCHPN provient de la mutation de l'un des gènes concernés dans ce locus lors de la réparation de l'ADN. Ces affectations se présentent à un âge beaucoup plus jeune chez l'individu amenant la présence de centaines de polypes dans l'intestin grêle entre 20 et 40 ans [34].

### 3.3 Stades

Le tableau suivant illustre de façon générale le stade du cancer lié au développement de la maladie.



**Tableau 1 : Classification des cancers colorectaux selon l'American Joint Committee on Cancer [34].**

Stade	Diagnostique
0	Cancer <i>In situ</i> : le cancer ne s'étend pas au-delà du muscle lisse qui sépare la muqueuse de la sous-muqueuse.
I	Cancer limité à la muqueuse, à la sous-muqueuse ou au muscle extérieur; le cancer ne traverse pas la paroi intestinale
II	Cancer traversant toute la paroi de l'intestin, avec ou sans envahissement des tissus voisins.
III	Cancer envahissant les ganglions régionaux ou les tissus ou organes voisins sans extensions aux ganglions régionaux
IV	Cancer métastaté à distance, en général au foie ou aux poumons

### 3.4 Traitement

La stratégie de traitement est multidisciplinaire et doit viser un but à long terme. Ceci va jusqu'à inclure un traitement adjuvant post-opératoire, un suivi dans le cas de récurrences locales ou de métastases.

L'un des premiers objectifs thérapeutiques consiste en l'ablation de la tumeur. La résection du segment concerné peut se faire par un pré-traitement à l'irradiation/chimiothérapie pour de meilleurs résultats.

La radiothérapie est ensuite la deuxième approche. Elle joue un rôle post-opératoire important en association avec la chimiothérapie. Les radiations permettent de réduire les récurrences locales et les métastases à distance ou de traiter les tumeurs inextirpables. Elle peut aussi être utilisée à titre pré-opératoire afin de diminuer la taille de la tumeur et le risque de récurrence post-opératoire.

Les traitements de chimiothérapie permettent aux patients d'avoir une espérance de vie plus longue. L'association de 5FU/leucovorin pendant 6 à 12 mois permet aux patients d'améliorer leur survie de 9 à 14 mois [35].

La chimiothérapie permet chez les patients atteints de métastases coliques de prolonger leur temps de survie et de maintenir ou améliorer leur qualité de vie. La 5FU constitue l'agent thérapeutique le plus utilisé dans les 40 dernières années pour le traitement de cancer colorectal [36]. Le 5FU est converti en fluorodéoxyuridine monophosphate (FdUMP) au sein de la cellule. Ce métabolite actif, considéré comme agissant en phase S, est alors en mesure d'inhiber l'enzyme thymidylate synthase (TS), prévenant la production de pyrimidine et par le fait même la synthèse d'ADN. Le 5FU est aussi incorporé dans l'ARN, interférant avec la synthèse protéique [37]. Les effets secondaires limitants sont principalement la diarrhée, l'inflammation des muqueuses, l'érythème sévère plantaire et palmaire ainsi qu'une myélosuppression légère. Le protocole le plus utilisé dans les dernières années consistait à administrer une quantité fixe par voie intraveineuse 5 fois par semaine aux quatre semaines. Étant donné le temps de demi-vie court du 5FU et sa spécificité en phase S, il a été démontré qu'il était préférable d'administrer le tout par infusion intraveineuse prolongée pour accroître la proportion de cellules tumorales soumises à la cytotoxicité du médicament. Les effets secondaires, en l'occurrence, tendaient à diminuer.

Les nouvelles approches consistent à utiliser une multi thérapie. L'usage d'acide folique (FA) permet d'augmenter la réserve intracellulaire de folate réduit et ainsi de stabiliser le complexe FdUMP/TS. L'utilisation de cet agent permet de potentialiser l'effet du 5FU de 12% [38]. L'ajout de cette molécule à la thérapie a nécessité des réajustements, bien que bénéfiques, afin de permettre un meilleur effet cytotoxique.

Les années 1990 ont permis l'apparition d'une nouvelle gamme de médicaments de deuxième pallier. L'irinotécane, inhibiteur de la topoisomérase I, induisant l'arrêt de la réplication par des bris dans l'ADN simple brin. Les platines (e.g. oxaliplatine) induisant des pontages dans l'ADN menant à l'apoptose de la cellule. Ces médicaments sont utilisés à titre de thérapie alternative chez les patients répondant négativement à l'utilisation de 5FU. Cependant, ils sont encore à l'étude pour une utilisation de première ligne. L'approche actuelle et qui semble être prometteuse, consiste à administrer ces médicaments en combinaison.

La suite des événements consiste à mettre plus d'emphasis sur les traitements oraux. Il a été démontré que les fluoropyrimidines sont autant actives lors d'une administration par voie orale que par voie intraveineuse. Bien que le Japon soit en avance sur cette approche, l'Organisation Européenne de Recherche et Traitement du Cancer se questionne encore à savoir si les traitements oraux prévaudront sur le traitement 5FU/FA [37].

#### 4. Les transporteurs de médicaments

Les transporteurs revêtissent une importance capitale pour effectuer un tournant technologique dans les thérapies médicamenteuses. La voie orale étant primée de plus en plus, surtout dans les maladies chroniques qui nécessitent des traitements successifs ou des traitements à fortes doses, il importe de trouver des solutions. Les efforts dans ce domaine tentent de couvrir différentes problématiques liées aux chimiothérapies : entre autres, le ciblage au site d'action, la diminution des doses, la réduction des effets secondaires, l'augmentation du temps de résidence plasmatique.

Le tableau suivant (Tableau 2) fait un résumé des polymères naturels ou synthétisés ayant été testés pour le transport de médicaments. Il est aisé de constater la proportion de polymères naturels par rapport aux polymères artificiels. Par de multiples constructions, un éventail impressionnant de polymères synthétiques peut être obtenu, un peu à l'exemple de la chimie combinatoire dans la conception de molécules thérapeutiques. Cependant, de nombreux candidats seront éliminés lors de tests biochimiques ou lors d'essais toxicologiques *in vitro* ou pré-cliniques.

**Tableau 2 : Polymères naturels et artificiels testés pour le transport oral de médicaments [39].**

Classification	Polymère
<b>Polymère naturel</b>	
Polymère protéinique	Collagène, albumine, gélatine
Polysaccharides	Agarose, alginate, carragenine, acide hyaluronique, dextran, chitosan, cyclodextrine
<b>Polymères synthétiques</b>	
<i>Biodégradable</i>	
Polyesters	Acide polylactique, acide polyglycolique, polyhydroxybutyrate, poly $\epsilon$ -caprolactone, acide poly $\beta$ -malique, polydioxanones
Polyanhydrides	Acide polysébacique, acide polyadipique, acide polyterephthalique et divers copolymères
Polyamides	Polyimino carbonates, acide polyaminée
Polymères phosphorés	Polyphosphates, polyphosphonates, polyphosphazènes
Autres	Polycianoacrylates, polyuréthanes, polyortho esters, polydihydropyranes, polyacétales
<i>Non-biodégradables</i>	
Dérivés de cellulose	Carboxyméthyle cellulose, éthyl cellulose, acétate de cellulose, celluloseacétate propionate, hydroxypropyle méthyle cellulose
Silicones	Polydiméthylsiloxane, silice colloïdale
Polymères acryliques	Polyméthacrylates, poly(méthylemétacrylates), poly hydro(éthylemétacrylates)
Autres	Polyviniles, pyrrolidone, éthyle vinyle, acétate, poloxamères, poloxamines

#### 4.1 Transporteurs naturels

Il existe plusieurs stratégies pour améliorer le transport et par le fait même l'efficacité d'un transporteur. L'une de celles-ci consiste à greffer une molécule à un médicament par un lien covalent. Le transporteur est donc intimement lié au principe actif et diminue ou élimine la possibilité que ce dernier subisse une quelconque dégradation ou induise des effets secondaires. C'est ce qu'on appelle normalement un pro-médicament comme dans le cas du Tegafur, précurseur non actif du 5FU. Certains médicaments seront scindés lors de leur passage au foie dans le cycle entéro-hépatique alors que d'autres stratégies visent la libération du médicament au niveau du côlon. Ce dernier possède une flore bactérienne hétérogène relativement stable qui peut être d'un intérêt énorme pour la séparation du médicament de son transporteur. Ainsi, le médicament sous sa forme inactive transite jusqu'au côlon sans subir de contrecoups puis une fois métabolisé par les enzymes bactériennes de la flore indigène, celui-ci est absorbé par les entérocytes [12].

Au nombre de ces activités enzymatiques, on retrouve les enzymes responsables de la réduction des liaisons azo et nitro. Une stratégie efficace consiste donc à brancher une molécule « transporteuse » par un lien « azo » à un médicament, celui-ci étant irrémédiablement scindé dans le côlon. C'est le cas de l'acide 5-aminosalicylate (5-ASA) utilisé dans le traitement de la colite ulcéreuse. En lui greffant une molécule de transport par un lien azo (sulphasalazine), le 5-ASA est libéré de façon optimale au niveau du côlon, réduisant les effets secondaires et augmentant l'effet thérapeutique. La performance du médicament se voit améliorée par l'affinement de la stratégie de transport dans la recherche de l'augmentation du ratio de 5-ASA libéré [40]. Une stratégie similaire peut aussi être effectuée, il s'agit de faire des conjugués glycosylés. Ceux-ci sont faiblement absorbés dans le petit intestin en raison de leur hydrophilicité et de leur conformation, leur permettant d'atteindre le côlon et d'être scindés par des glycosidases bactériennes et de libérer le médicament au site prévu [41].

Les macromolécules de sucres ou les glycoconjugués représentent une avenue intéressante au niveau du ciblage, le but étant d'exploiter des ligands déjà existants sur les cellules visées[42]. Un des avantages des polysaccharides consiste en leur utilisation considérée sécuritaire. Par contre, dans le cas des cyclodextrines, considérées non-toxiques, la toxicité apparaît de manière indirecte. La cyclodextrine est un oligomère cyclique de glucose ayant la capacité de former des complexes avec des molécules organiques et de les rendre soluble. Ces molécules induisent souvent la formation d'un corps d'inclusion à l'intérieur lipophile et l'extérieur hydrophile [43]. Elles sont peu absorbées dans le petit intestin, mais fermentées dans le côlon en petits sucres susceptibles d'absorption. Elles ont une valeur importante pour le transport de médicaments dans la recherche pharmaceutique. La capacité de lier une molécule ou de s'y complexer est un effet recherché surtout dans le cas de molécules chimiothérapeutiques souvent insolubles. Cependant, les cyclodextrines peuvent réagir avec une grande variété de molécules dont nombres de carcinogènes lipophiles présents dans le tractus intestinal de l'humain. La  $\beta$ -cyclodextrine est reconnue pour former un complexe avec le pristane, molécule végétale carcinogène. Les cyclodextrines sont aussi capable de s'associer avec des molécules aromatiques toxiques et de les rendre solubles pour le passage entérique [44]. Ces constatations permettent de vérifier l'efficacité de transporteurs naturels mais aussi de nous mettre en garde devant la complexité que peuvent amener ces molécules.

Dans la poursuite de la recherche du transporteur oral naturel, des approches expérimentales ont été effectuées sur des systèmes à base de pectine. Déjà utilisé comme excipient, les recherches ont été poussées de l'avant pour en faire un transporteur sous forme de gel. La pectine est un sucre présent dans la paroi cellulaire des plantes, principalement composée d'acide poly(D-galacturonique) [45]. L'un de ces principaux attraits industriels consiste en la capacité de gélification de la pectine dont l'étude remonte aussi loin qu'il y a deux siècles[46]. Plus récemment, il a été démontré que les caractéristiques de degré, température et force de gélation sont proportionnelles au poids moléculaire et inversement proportionnelles au degré d'estérification de la

pectine [47]. Ceci a permis de choisir des pectines dont les caractéristiques physico-chimiques favorisaient le plus le transport de molécules par voie orale. Un degré d'amidation plus élevé dans les pectines a permis d'obtenir de meilleures propriétés gélifiantes permettant aussi, a pH faible, d'obtenir des gels acide-pectine entrelacés [48]. Ces observations ont permis la conception d'un véhicule protecteur pH-dépendant pour des molécules thérapeutiques. Cependant, la diversité élargie des pectines rend difficile l'obtention de matériel consistant et certaines modifications doivent être apportées pour éviter la dégradation enzymatique [45]. Ce type d'hydrogel est un exemple parmi plusieurs. Il existe autant d'essais de transport de médicaments par l'utilisation de systèmes portés sur les réseaux matriciels formés par l'amidon à haut contenu d'amylose [49] que sur les hydrogels à base de chitosan [50, 51].

Le chitosan, pouvant avoir une masse moléculaire aussi élevée que 750 000 Daltons, est aussi utilisé dans la formation de microparticules biodégradables. Les médicaments anticancéreux de type Paclitaxel peuvent être incorporés dans ces microparticules afin de traiter les tumeurs pouvant être accessibles par injection [52]. Bien que le transport oral ne soit pas visé par cette étude, le potentiel de ce polymère naturel prend de l'envergure.

Un autre polysaccharide utilisé dans la formulation de médicaments comme excipient [53] et dont les recherches sont poussées dans le but d'en faire un véhicule micellaire pour une administration orale consiste en l'hydroxypropylcellulose. Ce polysaccharide a la capacité de s'assembler en micelle à une concentration avoisinant les 4 mg/L et permet le chargement de molécules faiblement solubles dans l'eau tel que la cyclosporine A [54].

## 4.2 Transporteurs artificiels

Au-delà de la formulation traditionnelle, certains polymères artificiels sont utilisés pour la formation de micelles. Ces dernières sont formées lors de l'atteinte d'une concentration micellaire critique (CMC) d'un polymère. En deçà de cette concentration, le polymère est interprété comme étant un unimère, soit des chaînes de polymère distribuées individuellement dans un milieu aqueux. Les micelles ont l'avantage de pouvoir solubiliser, stabiliser et transporter des molécules thérapeutiques dont la solubilité aqueuse n'est pas nécessairement très bonne [55]. La plupart des propriétés fonctionnelles des micelles sont basées sur les copolymères amphiphiles de type Pluronic, poly(esters) ou poly(acides aminés) par exemple. Il s'agit, en général, de blocs de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) aux propriétés très hydrophiles, combinés à un bloc plus hydrophobe et possédant des propriétés pouvant aider à la solubilisation du médicament concerné. Le PEO est peu toxique et accepté comme produit pharmaceutique internationalement [56] tandis qu'il est approuvé par le Food and Drug Administration (FDA) en administration parentérale [57]. Ses propriétés hautement hydrophiles lui permettent d'être utilisé afin d'améliorer la biocompatibilité de molécules étrangères en limitant l'adsorption aux surfaces hydrophobes [58]. De plus, la formation de micelles, particulièrement avec le PEO, permet d'impartir une bonne stabilité stérique par l'assemblage du polymère en un pourtour en forme de brosse. Ceci permet de diminuer les interactions entre les différentes micelles et donc de former des corps d'inclusion avec d'autres micelles ou des composantes du sang [59]. Ceci diminue les chances du complexe d'être phagocyté par le système réticulo-endothélial (RES), un facteur limitant des transporteurs de médicaments colloïdaux.

L'encapsulation constitue donc une approche prometteuse afin de prolonger l'absorption et le temps de résidence d'un médicament. Les caractéristiques de départ des micelles se résument principalement à deux choses bien importantes lorsqu'on parle de transport au niveau du sang; la grosseur des micelles et la masse moléculaire du polymère qui la compose. Préférentiellement, les micelles doivent se situer aux alentours de 100 nm afin que le passage dans les capillaires ou veinules sanguins soit possible. Les micelles à base de



polymères de haut poids moléculaire, à partir de 70 000 g/mol, évitent aussi la clairance par la filtration glomérulaire [60, 61]. Ceci n'élimine pas les transporteurs qui ne satisfont pas à ces caractéristiques, mais ces observations permettent d'obtenir en général de meilleurs résultats. Communément, la vascularisation de tumeurs est souvent plus perméable et le drainage lymphatique peu efficace. On parle des pores endothéliales des vaisseaux pouvant laisser passer des complexes allant jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  [62, 63]. L'utilisation de micelles peut donc devenir avantageuse dans l'optique d'augmenter le taux de pénétration et d'accumulation à l'intérieur des tissus atteints, diminuant donc les effets toxiques du médicament dans le reste des tissus sains et amplifiant la réponse dans les tissus affectés.

La technique la plus utilisée dans la formation de micelles à l'aide de blocs de copolymères reste la dissolution directe ou la dialyse. L'encapsulation de l'agent actif peut se faire pendant ou après la formation des micelles, l'approche variant selon les polymères et les utilisateurs [55].

Les micelles formées avec l'association de blocs PEO et d'acides poly(aminés) permettent des modifications de post-polymérisation dans lesquelles le médicament encapsulé peut se conjuguer chimiquement au transporteur. Ce système mime un pro-médicament et permet ainsi le transport de molécules hautement cytotoxiques [64, 65]. Cette construction a aussi été utilisée pour effectuer de la libération continue de médicament encapsulé [66]. L'avantage des poly(AA), bien que théorique, réside dans le fait qu'ils ont une toxicité réduite et qu'ils peuvent être biodégradables par hydrolyse chimique ou enzymatique. Cependant, peu d'études de biocompatibilité et de toxicité ont été effectuées pour vérifier ces dires [55].

Le PEO peut aussi être formulé en bloc avec des poly(esters). Ces derniers ont un passé jugé sécuritaire chez l'humain et peuvent subir la dégradation dans un milieu aqueux [67]. L'association PEO/ $\epsilon$ -caprolactone permet de former des micelles semi-cristallines. Ce système a été utilisé pour transporter des immunosuppresseurs *in vitro* et a démontré une bonne biocompatibilité [68]. Les PEO/poly(esters) ont aussi été exploités dans la solubilisation de l'agent anticancéreux paclitaxel dont on connaît la solubilité très limitée dans l'eau.

La solubilisation par ce système a été augmentée de 5000 fois même sous les concentrations optimales de CMC [69].

Enfin, les Pluronic sont des triblocs de copolymère de poly(oxyde de propylène) (PPO). La structure est celle-ci : PEO-PPO-PEO et ce polymère, à faible concentration, est peu toxique. Différents poids moléculaires, tailles et constructions de balance hydrophile et hydrophobe variables sont disponibles commercialement ce qui en fait un produit réduisant les difficultés de synthèse. Ce tribloc a démontré la capacité d'inhiber l'action de la P-glycoprotéine (P-gp) [70, 71] permettant ainsi l'accumulation de produit thérapeutique dans les tissus affectés. La stratégie employée lors de l'utilisation de ces transporteurs est donc d'encapsuler un médicament substrat de la P-gp pour augmenter ses chances d'internaliser la cellule lors de l'inhibition du mécanisme de reflux [72]. Les Pluronic sont aussi utilisés pour augmenter la fluidité des membranes [73].

Les transporteurs micellaires artificiels possèdent un potentiel intéressant dans le transport et permettent la nanoencapsulation de principes actifs. On leur attribue une toxicité réduite mais qui reste à évaluer plus en profondeur. Si nous prenons en exemple les Pluronic, un faible nombre de ceux-ci, disponibles commercialement, sont approuvés pour des applications pharmaceutiques et médicales par le « Food and Drug Administration » (BASF corporation, CANADA). Ces copolymères démontrent souvent un bon effet de transport mais il ne faut pas mettre de côté le fait que ces molécules sont, selon leurs propriétés physico-chimiques et leur structures, dans plusieurs cas, des surfactants et peuvent donc déstabiliser les membranes cellulaires. Les mécanismes d'absorption dans ces systèmes ne sont pas encore définis et il pourrait s'agir d'un dérangement de la barrière épithéliale qui produit des améliorations dans l'absorption du médicament mais aussi de molécules non désirées. Cependant, ces transporteurs pourraient représenter une voie d'avenir pour les médicaments synthétisés ou naturels complexes qui ont une très faible solubilité. Il s'agit d'accroître la caractérisation de ces systèmes pour sécuriser l'utilisation de ces véhicules.

## 5. Les exopolysaccharides (EPS)

### 5.1 Composition

Les bactéries synthétisent différentes classes de polysaccharides dont la plupart sont utilisés dans la construction de la paroi cellulaire et de la capsule lorsque présente. On nomme les polysaccharides structuraux attachés de façon permanente à la capsule des polysaccharides capsulaires. Les polysaccharides sécrétés sous la forme d'une couche visqueuse indépendante de la paroi et de la capsule de la bactérie sont appelés exopolysaccharides (EPS). Par contre, plusieurs ouvrages parlent de EPS comme étant le regroupement de ces deux familles [74].

Il existe deux groupes d'EPS soit les homo et les hétéropolysaccharides. Ces deux variantes sont distinguables par leur composition. Les homopolysaccharides sont des polymères composés d'une seule unité monosaccharidique répétée, les unités sont attachées entre elles par des liaisons d'homogènes à variées [75]. On peut alors parler d' $\alpha$ -glucans (dextrans, mutans) dont la prépondérance de liaisons  $\alpha$ -1-6 dans le premier cas ou de liaisons  $\alpha$ -1-3 dans le deuxième est marquée par des branchements de ramifications en positions 2,3 ou 4 [75]. Le polymère ainsi formé atteint des hauts poids moléculaires allant de 80 à  $7,1 \times 10^6$  Daltons [76].

Pour leur part, les hétéropolysaccharides sont formés par la répétition d'un oligosaccharide de trois à sept résidus de long, lui-même composé d'un minimum de deux variétés d'unités monosaccharides. Cette structure ainsi formée est répétée un nombre variable de fois permettant l'obtention de chaînes allant dans le million de daltons.

Les exopolysaccharides sont en général des polymères stables, sécuritaires, non-toxiques, hydrophiles, gélifiants et biodégradables. [77]. Les souches bactériennes les produisant, lorsque celles-ci sont des LAB, possèdent souvent l'appellation GRAS (Generally Recognized As Safe), rendant ainsi l'acceptation du polymère plus facile par les organismes de réglementation.

## 5.2 Fonctions

Les polysaccharides membranaires sont reconnus pour jouer plusieurs rôles importants chez les bactéries comme l'attachement, la reconnaissance cellulaire via des lectines, la virulence, la formation de biofilms, la résistance au stress [78]. Cela soulève la question du rôle encore obscur que les polysaccharides sécrétés dans le milieu pourraient exercer, car ils sont coûteux en énergie à produire. Certaines hypothèses ont été postulées. Dans la plupart des environnements naturels, le style de vie prédominant des microorganismes est de s'associer avec une surface en formant des biofilms. Les EPS pourraient donc ainsi permettre de coloniser des niches écologiques. Les EPS pourraient aussi être un moyen de défense des LABs contre les phages, car ils préviendraient l'adsorption [79]. Ils protégeraient aussi les bactéries contre la prédation par les protozoaires, la dessiccation, la phagocytose, les antibiotiques et les composés toxiques et antimicrobiens (e.g. ions métalliques, dioxyde de soufre, éthanol, nisine...) [78, 80]. Il est peut probable que les EPS servent de réserve de nourriture étant donné l'absence des enzymes hydrolytiques nécessaires à leur dégradation chez la plupart des LABs les produisant [78].

Les EPS microbiens forment une classe importante de polymères dont les propriétés intrinsèques sont entre autres définies par leur charge, leur poids moléculaire, leur rigidité, leurs chaînes latérales ainsi que par la nature des unités monosaccharidiques les composant et les liaisons les unissant [33] (voir Figure 2). Il existe une variété de polysaccharides couramment utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs qui sont produits par les plantes (cellulose, pectine, amidon [81], gomme de caroube et de guar [78], les algues (agar, alginate, carragénine) et les bactéries (alginate, dextran, gellan, pullulan, xanthane) [81]. Cependant, l'utilisation ne se limite pas à l'industrie alimentaire, mais leur diversité les amène dans des champs aussi variés que les domaines pharmaceutique, biomédical, métallurgique et pétrolier [75].



**Figure 2 : Clichés de la structure moléculaire dynamique du EPS de *Lactobacillus helveticus* Lh59 dans l'eau. La structure (...→3)-α-D-Galp-(1→3) β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glc-(1→5)-[β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→3)]-β-D-Galf-(1→...) est alignée sur le branchement monosaccharidique β-D-Galf. Tiré de Jolly et collaborateurs [33].**

### 5.3 Kéfir

Généralement, la production d'exopolysaccharides par les LABs est faible et varie beaucoup selon les conditions de culture [78]. C'est pourquoi, en raison de leur forte production, la recherche a été poussée dans la direction des EPS de bactéries Gram-négatives dans les années précédentes [82].

L'affinement des méthodes de récupération a permis d'orienter la recherche sur les EPS vers les souches Gram-positives telles que les LABs. Les EPS utilisés dans le cadre de ce projet sont issus des grains de kéfir, ces derniers sont obtenus par la fermentation du perméat de lactosérum par un consortium de LABs et de levures.

### 5.3.1 Provenance

Le kéfir est un lait acide et faiblement alcoolisé [83], originaire des montagnes caucasiennes, fermenté par des grains de kéfir. Ces grains sont composés d'un consortium symbiotique de bactéries lactiques (LAB), de bactéries acétiques et de levures, fermement imbriqués dans une matrice polysaccharidique visqueuse [84]. La microflore varie en fonction de la région d'isolement des grains. Les grains de kéfir sont gélatineux, blanchâtres, ont un diamètre entre 0,1- 4cm et une forme irrégulière rappelant le chou-fleur [83].

### 5.3.2 Composition

Les LABs représentent de 83-90% de la microflore des grains de kéfir et les levures de 10-17% [85]. Il y aurait plus de 40 espèces de LABs dans les grains de kéfir dont la plupart se partagent entre les genres suivants : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* [75, 84-86]. Cependant, ce sont les levures qui sont majoritairement responsables de l'arôme et de la saveur du kéfir. La distribution des différents microorganismes dans les grains de kéfir a été étudiée par microscopie électronique à balayage [83, 84]. Ces études ont montré que les bactéries en bâtonnets courts se retrouvaient à la surface des grains de kéfir. Le centre des grains de kéfir ayant une forme de choux-fleurs est plutôt occupé par des bactéries encapsulées, en forme de larges bâtonnets rugueux. Ces dernières sont indispensables à la propagation des grains. [83]. Les interactions des microorganismes entre eux et avec la matrice créent un microenvironnement qui est essentiel à la propagation des grains. Bien que le kéfir soit le support primordial pour la production de grains de kéfir, il est impossible de reconstituer des grains de kéfir en mélangeant du kéfir avec des cultures pures de tous les microorganismes qui composent les grains, même si les proportions sont conservées. Cela indique une symbiose biologique nécessaire à la constitution des grains de kéfir.

*L. kefirifaciens* est le principal producteur de kéfir dans les grains de kéfir [84, 87]. Cette souche bactérienne fut isolée pour la première fois par Fujisawa et collaborateurs (1988) et décrite par Arihara et collaborateurs

(1990) [83, 88]. Cette bactérie Gram positive encapsulée, anaérobie facultative en forme de bâtonnets rugueux moyens à longs, non mobile, catalase négative, ne formant pas de spores et mesurant entre 0,4-1,0  $\mu\text{m}$  par 3,5-20  $\mu\text{m}$  (souche  $K_1$ ), a été isolée par le groupe de Keizo Arihara [83]. Après une croissance de dix jours sur gélose, les colonies ont un diamètre de 4.0 mm et sont translucides, rugueuses, visqueuses et blanches. La température de croissance optimale se situe entre 30-37°C et la croissance est inhibée en-deçà de 15°C et au-dessus de 45°C. C'est une bactérie homofermentaire, c'est à dire une bactérie dont au moins 90% du produit final de fermentation est constitué d'acide lactique. *L. kefiranofaciens* peut fermenter le glucose, le galactose, le mannose, le fructose, le maltose, le lactose, le melibiose, le sucrose et le raffinose [83].

### 5.3.3 Kéfiran

La matrice formant la structure des grains de kéfir est composée de kéfiran, un glucogalactane branché soluble [89], contenant un rapport de D-glucose et de D-galactose de 1 : 1,22 [90, 91]. Le kéfiran représente au moins 24% du poids du matériel sec des grains de kéfir [90]. La structure chimique de cet hétéropolysaccharide a été proposée par Yokoi [92] et Mukai [93], mais l'EPS a été isolé et décrit pour la première fois par La Rivière et Kooiman [86].

### 5.4 Propriétés physiologiques des EPS

Les EPS, dont le kéfiran décrit, gagnent à être connus comme modulateurs biologiques. Le nombre de polymères de la sorte ne cesse d'être identifié et beaucoup d'efforts sont présentement mis à définir une meilleure caractérisation de la provenance des effets biologiques observés.

Le  $\beta$ -(1-3)-glucan est un exemple de molécule qui affiche des propriétés modulatrices en fonction du poids moléculaire des chaînes employées. Les effets vont de l'activité antitumorale à l'augmentation de l'activité antimicrobienne des neutrophiles et de l'activité fonctionnelle des macrophages

[94]. Les glucans stimulent aussi la prolifération des monocytes et des macrophages et ont une activité hématopoïétique. Le mannan, pour sa part, est immunosuppresseur et retarde les réactions d'hypersensibilité retardée. L'acide hyaluronique prévient le rejet de greffe tout en préservant l'organe et possède aussi une activité tégumentaire curative [94].

*Schizophyllum commune* Fries est un champignon produisant un EPS, le schizophyllan (SPG), dont les effets anti-tumoraux ont été démontrés sur des cellules tumorales de carcinomes de poumons de Lewis [95]. Sakagami et collaborateurs ont ensuite ciblé plus précisément le mécanisme lié à l'effet anti-tumoral observé. Le SPG (0,05% p/v) a démontré une augmentation de 100 fois la concentration d' IFN- $\gamma$  et de 6 fois l'IL-2 dans des cellules mononucléaires périphériques du sang (PBMC). Cette évidence a aussi permis d'établir des hypothèses sur les caractéristiques antibactériennes de cet EPS. [96].

Dans la même lignée, le champignon *Ganoderma lucidum* produit aussi un exopolysaccharide possédant des effets anti-tumoraux [97] particulièrement par la répression à la baisse de l'expression de l'activateur urokinase plasminogène (uPA) régulé de NF- $\kappa$ B et de son récepteur ce qui supprimerait la migration de cellules tumorales impliquées dans le cancer du sein hautement invasives [98]. Ses effets immunostimulants par la production de cytokines pro-inflammatoires du type TNF- $\alpha$  ont aussi été mis de l'avant tout comme son potentiel anti-oxydatif sur les radicaux superoxydes et hydroxyles [99].

Récemment, la recherche a été dirigée sur les exopolysaccharides de plantes. Par exemple, l'EPS de l'*Aloe vera* (acemannan) présente des modulations au niveau de biomarqueurs associés au processus de carcinogénèse *in vitro* [99]. Les effets immunostimulants observés par cet EPS (entre autres l'augmentation d'un facteur de 100 dans la production d'IL-6, de 10 dans la sécrétion de TNF- $\alpha$  sur la lignée cellulaire RAW de macrophage murin [100]) ont poussé à utiliser ce polymère dans le traitement de fibrosarcomes chez les chiens [101], dans la guérison d'ulcères chez les humains [102]. Des études



*in vitro* ont aussi démontré un effet anti-viral de ce polymère contre certains virus d'immunodéficience humains [103].

Des études ont montré que certains des EPS produits par les bactéries lactiques apportent des bénéfices sur la santé comme la réduction des ulcères et des taux de cholestérol [3, 81, 104]. Il a également été prouvé que *L. rhamnosus* sécrète un polysaccharide qui stimule l'expression de certaines cytokines (IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ) [7, 81, 85]. Il a aussi été avancé que les EPS seraient bénéfiques pour les probiotiques afin d'aider dans leur processus de colonisation au niveau du TGI [33].

Également, les polysaccharides qui sont dégradés dans le côlon peuvent être fermentés par la microflore en acides-gras à courtes chaînes (SCFAs). Ces SCFAs procurent de l'énergie aux cellules épithéliales du côlon et pourraient même exercer un effet protecteur contre le cancer colorectal [84, 105].

Les polysaccharides qui ne sont pas dégradés dans le côlon peuvent directement offrir une protection contre le cancer colorectal en augmentant la densité des selles ou en absorbant spécifiquement les cancérigènes [85, 105].

Le groupe de Shiomi et collaborateurs a, au début des années 1980, mis de l'avant les effets antitumoraux d'une portion soluble de polysaccharides provenant de grains de kéfir (KGF-C) [2,4,8]. Ce polysaccharide administré oralement a permis d'obtenir une régression de 40-59% (solutions de KGF-C de 0,02%-0,1% (p/v) respectivement) sur les carcinomes d'Ehrlich (EC) injectées sous-cutané (s.c.) à des souris. Une régression de 21% et 81% (KGF-C 0,02% et 0,1% (p/v)) a aussi été observée sur des souris ayant reçu en injection une autre lignée cellulaire tumorale : le Sarcome 180 (S-180) [2, 4]. Des doses inférieures à 0,1% (p/v) de KGF-C (0,05mg - 0,25mg) ont aussi été injectées intrapéritonéalement (*i.p.*) provoquant aussi une régression dans une échelle variant entre les 60 à 80% des mêmes cellules tumorales injectées sous-cutanées [2]. Le même exopolysaccharide a ensuite été utilisé pour évaluer la réponse de souris à un test d'hypersensibilité retardée. Le KGF-C a été administré oralement et une corrélation a pu être établie entre l'inhibition de la croissance tumorale et une réponse d'hypersensibilité de type réduite

(DTH) élevée chez des souris développant des tumeurs solides. Cependant, l'EPS réprime la réponse DTH chez des souris saines d'environ 80% (KGF-C 0,1% p/v) [4]. Dans une étude subséquente des mêmes auteurs, le polymère a été marqué au tritium afin d'évaluer sa distribution lors du gavage chez des souris. Le contenu des fèces comptait pour 77,37% de la radioactivité, alors que le reste de la radioactivité était retrouvée dans le thymus (0,002%), la rate (0,032%), les poumons (0,015%), le cœur (0,025%), les reins (0,25%), le foie (0,28%), la vessie (0,84%), le sang (0,66%) et dans l'urine (2,88%) [8]. Cette étude avait pour but de supporter l'évidence du passage en circulation du KGF-C et de l'activation directe des populations de lymphocytes T dans le thymus et la rate par le KGF-C [8].

Ce survol des effets physiologiques des EPS montre leur potentiel dans le domaine de la santé. Cependant, beaucoup de recherche reste à effectuer étant donné le peu de connaissances sur les mécanismes d'action de ces EPS comme modulateur biologique au niveau de l'hôte.

## 6. Objectif de travail

Le but de ce projet vise à pousser plus loin les connaissances sur les avenues du polymère isolé du consortium des grains de kéfir. Les effets anti-tumoraux du kéfiran ont déjà été mis de l'avant. Par contre, le comportement du polymère en solution reste à évaluer. Les EPS pourraient représenter un polymère intéressant dans une optique de transport. Ses caractéristiques physico-chimiques et les observations établies dans la littérature sur ses fonctions biologiques permettent d'avancer l'hypothèse que les EPS pourraient avoir un potentiel d'agir comme un transporteur synergique. Le cancer colorectal représente un bon modèle pour débiter ces travaux étant donné que les EPS présentent des caractéristiques de résistance à l'acide et aux enzymes et possèdent les caractéristiques physicochimiques nécessaires afin d'être acheminé intact jusqu'au côlon. Pour permettre la réalisation du projet, il fallait identifier par les techniques connues si les EPS isolés de notre consortium pouvaient former une structure favorable au transport de molécules.

Nous avons commencé par effectuer la production des EPS. La suite du projet a consisté en une série d'étapes en parallèle, soit débiter la caractérisation du polymère tout en vérifiant sa capacité à former un réseau micellaire par des techniques de fluorescence. La toxicité des EPS produits, seuls ou formulés avec divers médicaments, a été évaluée en culture cellulaire. Avec des résultats de formation de micelles encourageants, des pharmacocinétiques sur des rongeurs ont été entreprises avec les EPS formulés à des sondes fluorescentes. Enfin, l'efficacité de nos formulations a été déterminée sur des modèles de cancer induits *ex vivo* et *in vivo* sur des souris.

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Exopolysaccharides

#### 1.1 Source

Les exopolysaccharides sont issus de grains de kéfir dont les bactéries ont été adaptées pour croître dans le lactosérum non supplémenté. Les grains de kéfir sont fournis par Technologie Biolactis Inc.

##### 1.1.1 Extraction

Les grains de kéfir sont dissous à un ratio optimal de 2% (p/v) dans de l'eau distillée et extraits pendant 3h à 100°C sous une agitation rotative de 250 RPM. Chaque lot se fait dans un volume de 100 litres dans un fermenteur New Brunswick (NAT'L BD no. 452) d'une capacité de 250 litres muni d'un agitateur à double ailette.

##### 1.1.2 Purification et conservation

L'homogénat récupéré à l'étape d'extraction est ensuite filtré sur une membrane de 0,60 m<sup>2</sup> d'une porosité de 0,45µm (Hydrosart, Sartorius) par un processus de filtration tangentielle (Pellicon) afin d'éliminer les impuretés grossières, les bactéries et les levures. Le liquide est propulsé dans le système de filtration à double cassette par une pompe (Labtop 250, Teknoflow) fonctionnant à 50 Hertz. Le filtrat est récupéré à une pression de sortie de 15 psi.

Le filtrat est ensuite concentré sur deux membranes de 0,46 m<sup>2</sup> d'une porosité de 3KDaltons (Centrasette 3K, Pallfiltron) par le même processus de filtration tangentielle. Cette étape permet d'obtenir un facteur de concentration de 20 fois. Le concentré est centrifugé à 7500 X g, 15 minutes à 4°C, puis le surnageant récupéré est précipité avec un volume égal d'éthanol pur pour 16 heures à 4°C. Le précipité engendré est ensuite récupéré par centrifugation (7500 X g, 15 minutes à 4°C), puis dissous

dans un volume minimum d'eau distillée et les impuretés protéiques insolubles sont éliminées par centrifugation (7500 X g, 15 minutes à 22°C). Le surnageant est ensuite lyophilisé. Les EPS obtenus sont gardés sous vide dans un dessiccateur. Dans l'intérêt d'améliorer la purification et d'éliminer les étapes de précipitation à l'éthanol, des échantillons du lot NBE4 ont été soumis à une étape subséquente de dialyse. Lors de cette étape, 250 ml d'une solution d'EPS 1% (p/v) ont été dialysés contre une membrane de porosité de 100 KDaltons (Spectra por) pendant 48 heures à 2 changements d'eau par jour. Dans un autre essai, un échantillon d'EPS NBE4 a subi la même dialyse, cependant, préalablement à cette étape, les EPS ont été traités avec une protéase (Protease type XIX d'*Aspergillus sojae*) à une concentration de 4 U / 100 ml à 37°C pendant 1 heure. Les EPS ont ensuite été lyophilisés.

## 1.2 Caractérisation chimique

Suite à la production, les EPS ont été soumis à une analyse chimique pour déterminer leur composition.

### 1.2.1 HPLC

Les EPS (1 mg/ml) sont hydrolysés dans une solution 1N final de HCl / eau déionisée pendant 3 heures à 100°C. La solution est neutralisée avec du NaOH 1N. Le tout est filtré sur 0,22 µM puis dilué 1 :5 dans de l'eau déionisée pour l'analyse subséquente. Des standards sont préparés à 1mM (glucose, galactose, fructose, lactose, mannose, N-acétylglucosamine, xylose) dilués à une concentration de 100 µM pour l'analyse. Le D (-) arabinose constitue le contrôle interne (100 µM).

Les analyses sont effectuées sur un système HPLC Dionex DX-500 muni d'une colonne CarboPack<sup>MC</sup> PA-10 (4 X 250 mm) (Dionex) équilibrée dans une solution de 18 mM de NaOH avec un débit linéaire de 119,4 cm/h. Pour les analyses, 100 µl d'échantillon sont injectés selon le même débit. Le

programme d'élution est présenté au Tableau 3. Un système de détection à ampérométrie pulsive couplé à un ordinateur a été utilisé.

### 1.2.2 H-RMN

L'analyse par H-RMN et l'analyse des liens (linkage analysis) ont été effectuées par l'équipe du Dr. Michel Gilbert Ph.D dans une collaboration avec le CNRC à Ottawa.

### 1.2.3 Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire du carbone, de l'azote, de l'hydrogène a été réalisée par le service d'analyse élémentaire de l'université de Montréal. Environ 2 mg d'échantillon sont déposés dans une cupule d'étain. Celle-ci est placée à l'intérieur d'un auto-échantillonneur purgé avec un courant d'hélium continu. Les échantillons sont introduits un à un, à intervalle régulier dans le réacteur de combustion, un tube de quartz maintenu à 1021°C. À l'intérieur du réacteur, le courant d'hélium est temporairement enrichi avec de l'oxygène pur. L'échantillon et son contenant fondent. L'étain provoque une violente réaction de combustion sous cette atmosphère enrichie d'oxygène. Dans ces conditions favorables, toutes les substances organiques et inorganiques, même les plus résistantes, sont oxydées et converties en produits de combustion: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>. Les gaz de combustion sont transportés dans la colonne chromatographique (Fisons AE 1108, CHNS) par le gaz porteur. Ils sont séparés et détectés par un détecteur de conductivité thermique qui donne un signal correspondant à la concentration de chacun des composants : C, H, N, S.

**Tableau 3 : Programme d'injection des solvants en vue de l'identification des unités monosaccharidiques composant les EPS.**

Temps (minutes)	% A (eau Milli-Q)	%B (NaOH 200 mM)
0	91	9
15,0	91	9
25,0	0	100
40,0	0	100
40,5	91	9
55,0	91	9

### 1.3 Caractérisation physique

#### 1.3.1 Microscopie électronique

La solution d'EPS 1% (p/v) déposée sur une grille à microscopie a été centrifugée à 120 000 X g, 5 minutes à température ambiante (microfuge) puis colorée à l'acétate d'uranyle. L'échantillon a été observé à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi à un grossissement de 120 000X par Robert Alain du Service de Microscopie de l'Institut Armand-Frappier.

#### 1.3.2 Spectrofluorométrie

Une solution de 20  $\mu$ l de pyrène/acétone (Sigma) a été déposée à une concentration de 50  $\mu$ M dans des tubes de borosilicate (Fisher). Suite à l'évaporation à l'air libre de l'acétone, 2 ml de différentes dilutions d'EPS allant de 1% à 0,001% (p/v) ont été déposées dans ces mêmes tubes. Les tubes ont ensuite été laissés à l'obscurité pendant 72 heures puis une lecture a été effectuée au spectrofluoromètre (Eclipse, Varian) à une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et dans un spectre d'émission allant de 350 nm à 600 nm. La concentration micellaire critique (CMC) est ensuite déterminée par le ratio de l'intensité de fluorescence des signaux  $I_3/I_1$  correspondants aux

longueurs d'ondes d'émission de 393 nm et 373 nm respectivement. La CMC correspond au point d'inflexion de la courbe sigmoïdale produite [106].

La deuxième méthode consiste à utiliser de l'eau saturée en pyrène (100 nM) et agitée 16 h à l'obscurité après l'ajout de pyrène. Des dilutions de cette solution d'EPS (1% (p/v))/pyrène ont ensuite été préparées afin d'atteindre des concentrations allant jusqu'à 0,001% (p/v). Un spectre d'excitation était ensuite effectué de 300 nm à 360 nm à une longueur d'onde d'émission de 390 nm avec un spectrofluoromètre (Eclipse, Varian). La CMC est calculée par le ratio des signaux de fluorescence obtenus à des longueurs d'onde d'excitation de 333 nm et de 336 nm ( $I_{336}/I_{333}$ ) [54].

## 2. Cellules cancéreuses

### 2.1 Origine

La lignée cellulaire immortalisée adhérente B16F10 (ATCC, Rockville, MD, USA) est issue d'un mélanome de peau de souris (*Mus musculus*).

Les CaCo-2 (ATCC, Rockville, MD, USA) sont des cellules immortalisées adhérentes d'adénome de cancer colorectal humain (*Homo sapiens*).

### 2.2 Conditions de culture

Les cellules B16F10 sont maintenues dans du milieu DMEM (Invitrogen) complété à 10% de FBS et 1% Penicilline/Streptavidine à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont trypsinisées à l'aide de trypsine-EDTA (Invitrogen) pendant 5 minutes puis diluées 1 :10 et ce tous les 3 ou 4 jours dépendant de la confluence des cellules.

Les cellules CaCo-2 sont utilisées dans du milieu MEM- $\alpha$  complété à 20% de FBS et 1% Penicilline/Streptavidine à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont maintenues dans du milieu MEM- $\alpha$  complété à 10% de FBS et 1% Penicilline/Streptavidine à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont trypsinisées à l'aide de trypsine-EDTA (Invitrogen) pendant 5 minutes puis diluées 1 :3 à tous les 4 jours.



La différenciation des cellules CaCo-2 en épithélium s'effectue en laissant les cellules de 14 à 21 jours sur le même support. Cependant le milieu de culture est changé à tous les deux jours étant donné la densité cellulaire. Cela permet le maintien des cellules en santé et la formation d'un épithélium.

La composition des milieux de culture utilisés est présentée en annexe.

### 2.3 Tests de viabilité

Les cellules sontensemencées à 500 cellules/puits pour les B16F10 ou 1000 cellules/puits pour les CaCo-2 dans un volume de 200  $\mu$ l. Après 24 heures, les cellules sont exposées à différentes solutions d'agent anticancéreux (5FU) à des concentrations de 0,5  $\mu$ g/ml à 100  $\mu$ g/ml, ou à des solutions d'EPS seuls (0,1% (p/v)) ou à des formulations EPS/5FU. Après 72 heures le milieu est remplacé par 100  $\mu$ l de PBS 1X contenant 0,2 mg/ml final de 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). Après 4 heures, l'absorbance est relevée à 450nm.

## 3. Pharmacocinétiques (PK)

### 3.1 Modèle de rongeurs

Des groupes de 3 à 9 rats Wistar femelles âgées de 7 semaines et d'un poids d'environ 200g (Charles River, Ontario) sont utilisés pour les expériences de PK. Après une semaine d'acclimatation, les rats sont pesés puis randomisés selon leurs poids. Les rats sont gavés avec 1 ml de chacune des solutions (l'ajustement du volume se fait en fonction du poids de l'animal, ainsi chaque animal reçoit 1 mg/kg de fluorescéine (FL) ou 10 mg/kg de rhodamine 123 (R123)) puis les rats sont saignés de 250  $\mu$ l à différents temps (de 0 à 8 heures) par la veine jugulaire, le sang prélevé n'excédant pas un volume total correspondant, en volume, à 10% de leur poids et ce à l'intérieur d'une période de 2 semaines. La saignée se fait sans anesthésie à l'aide de seringues de 1 ml et d'aiguilles 23GX1 (Protocole CISAU # 0100-03 ). Selon les expériences, les concentrations d'EPS varient de 0,1% (p/v) à 5% (p/v). Les sondes fluorescentes sont ensuite ajoutées aux solutions d'EPS. La nouvelle solution

est vortexée 1 minute puis laissée à l'équilibre 30 minutes avant d'être administrée telle quelle.

Les expériences de PK sont reprises une deuxième fois avec les mêmes animaux. Deux semaines de repos sont octroyées aux rats pour leur permettre de rétablir leur hémocrite et permettre l'élimination des sondes fluorescentes résiduelles. Les rats sont à nouveau randomisés selon leur poids afin d'équilibrer tous les groupes.

### 3.2 Analyse par spectrofluorométrie

Les sangs récoltés dans des tubes héparinés de 500  $\mu$ l sont centrifugés à 12000 X g pour 5 minutes à température ambiante. Le plasma est récolté puis congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'aux analyses. Cinquante microlitres de plasma sont dilués dans 550  $\mu$ l de PBS 1X (Sigma). Les échantillons contenant la FL sont excités à une longueur d'onde ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) de 495nm et lus à une longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{\text{em}}$ ) de 515 nm. Les échantillons contenant la R123 sont excités à une longueur d'onde de 512 nm et lus à une longueur d'onde d'émission de 540 nm. Les concentrations sont déterminées en fonction de courbes étalon effectuées avec chacun des produits dilués dans du PBS 1X.

## 4. Modèle murin de cancer

### 4.1 Préparation

Des groupes de 10 souris Balb/c femelles âgées de 7 semaines sont utilisés pour les expériences. Un volume de 1 ml de  $10^6$  cellules cancéreuses B16F10 est injecté intrapéritonéalement aux souris, ces dernières ayant eu une période d'acclimatation d'une semaine. Après quatre jours les souris reçoivent leur traitement en injection intrapéritonéale. Les traitements sont : la saline (contrôle), le 5FU 100 mg/kg ou les EPS 0,1% (p/v) ou une formulation EPS/5FU. La dose maximale est décidée en fonction de la dose létale 50 (LD50) du produit (Sigma), puis un seul traitement est donné au jour 4 suivant l'inoculation [107] (Protocole CISAU # 0305-02).

## 4.2 Analyse

La survie est observée sur une période de 44 jours. Les souris sont pesées aux deux jours. Les souris mortes sont disséquées lorsque possible pour l'observation des organes.

## 5. Modèle de récupération *in vivo*

### 5.1 Préparation

Des cellules B16F10 à 60% de confluence sont exposées à 0.1 M de paclitaxel-diméthylsulfoxyde (DMSO) ou à une formulation EPS 0,1% (p/v) / paclitaxel 0,1 M-DMSO pendant 3h. Les cellules sont ensuite trypsinisées. Quatorze souris/groupe C57BL/6 femelles âgées de 7 semaines sont utilisées. Après 1 semaine d'acclimatation, les souris reçoivent une injection intramusculaire de 100 µl d'une solution de cellules cancéreuses traitées (Protocole CISAU # 0211-22). La balance des cellules non injectées est remise en culture dans du milieu frais pour déterminer si les cellules reprennent leur croissance.

### 5.2 Analyse

Après 2 semaines, le muscle est disséqué pour déterminer s'il y a formation de tumeur par observation visuelle.

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

### 3.1 Caractérisation

#### 3.1.1 Rendements

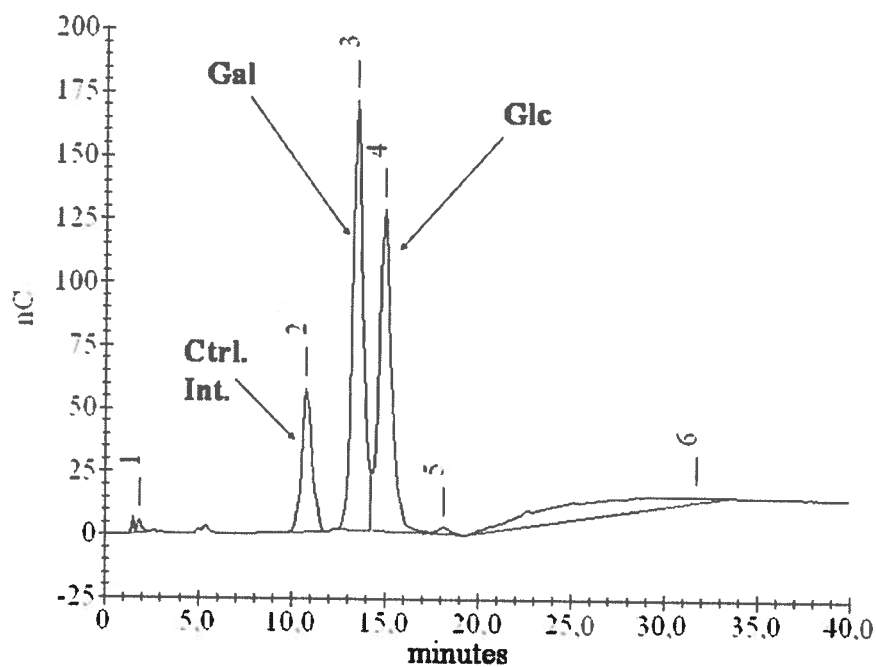
Les grains, utilisés pour l'extraction d'EPS, ont été produits en deux lots : le lot K1 et le lot K2. Les lots d'EPS issus du lot K2 correspondent aux numéros de lots d'EPS NBE2 et NBE4 alors que l'EPS NBE3 est issu des grains de kéfir du lot K1 (voir Tableau 4). Il est donc possible de constater les différences au niveau du rendement d'extraction des EPS selon le lot de grains utilisé. Les lots NBE2 et NBE4 ont un rendement cinq fois supérieur à celui du lot d'EPS NBE3.

**Tableau 4 : Rendements de production des différents lots d'EPS. Les rendements sont exprimés en mg d'EPS par litre de milieu de départ lors de la dissolution des grains de kéfir et donnés en mg d'EPS par gramme de grains de kéfir utilisés.**

Lot d'EPS	Rendement (mg/L)	Rendement (mg/g)
NBE2	260	13
NBE3	55	2,6
NBE4	294	15

#### 3.1.2 Composition et structure

Suite à la récupération des EPS, ces derniers ont été soumis à une hydrolyse acide afin de déterminer leur composition monosaccharidique (Voir Figure 3). Les différents profils ont été comparés à des standards monosaccharidiques afin d'être identifiés selon leur temps de rétention. Le contrôle interne (signal 2) correspond à l'arabinose et les signaux 3 et 4 correspondent respectivement au galactose et au glucose. Le ratio moyen obtenu lors de l'hydrolyse acide des différents lots d'EPS est de 1,33 : 1 galactose/glucose.



**Figure 3 : Profil HPLC type après hydrolyse acide des EPS (lot NBE4).  
Ctrl. int. : arabinose 100  $\mu$ m, Gal : galactose, Glc : glucose.**

Les échantillons d'EPS NBE2 ont ensuite été envoyés au Dr. Michel Gilbert (CNRC, Ottawa) afin de procéder à une analyse plus approfondie par l'entremise d'un laboratoire spécialisé dans les spectres de résonance magnétique nucléaire des sucres (voir Annexes).

Le profil obtenu par résonance a permis l'élaboration de la structure hexamérique la plus fréquente dans l'échantillon (voir Figure 4) par une analyse computationnelle de branchement. La structure est en accord avec la structure connue du kéfiran [93], polymère de sucre permettant l'unification du consortium bactérien dans son milieu de culture lors de la fermentation.



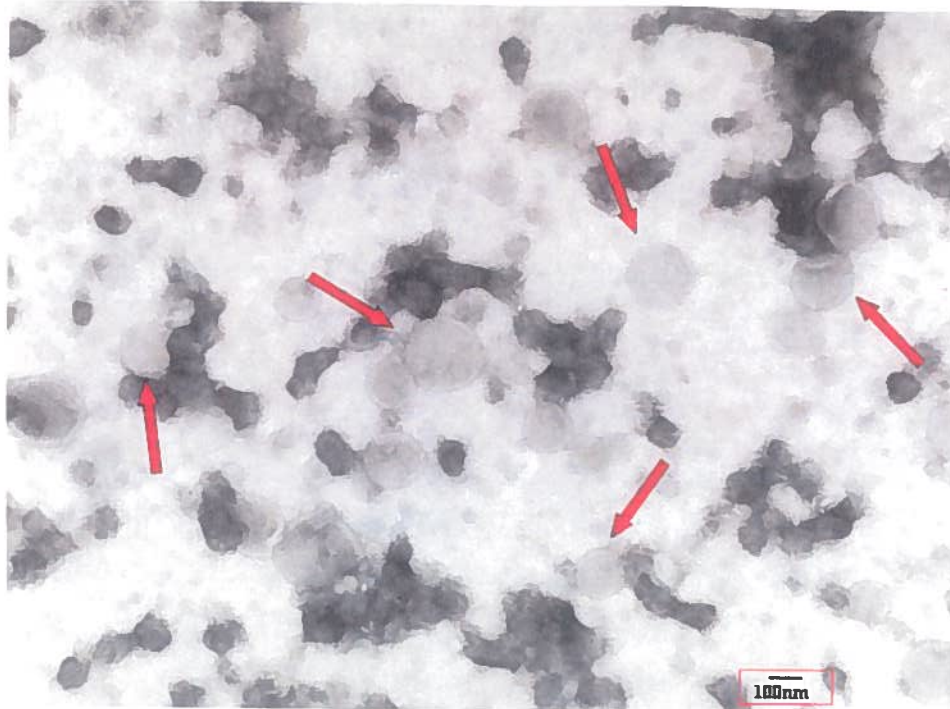
**Tableau 5 : Pourcentage d'éléments tels que le carbone (C), l'hydrogène (H), l'azote (N) et le soufre (S) contenus dans nos EPS en comparaison avec les pourcentages déterminés dans la littérature pour le kéfiran [2]. Déterminés par le service d'analyse élémentaire de l'Université de Montréal.**

Atomes	p/p (%)			
	C	H	N	S
EPS NBE2	42,50	7,15	4,06	0
EPS NBE3	42,16	6,96	5,06	0
EPS NBE4	40,65	6,62	2,73	0
EPS NBE4 digéré *	39,56	6,62	0,55	0
Kéfiran	41,83	6,19	0,20	

\* traité tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes.

### 3.1.4 Microscopie électronique

Suite à la caractérisation chimique, les EPS en solution (1% (p/v)) ont été observés par microscopie électronique (voir Figure 5). Des structures ressemblant à des liposomes monocouches ont été identifiées comme étant nos EPS formant des micelles de l'ordre des 50nm jusqu'à 700nm. Les dépôts noirs correspondent au métal lourd précipité utilisé pour la coloration négative (acétate d'uranyle).



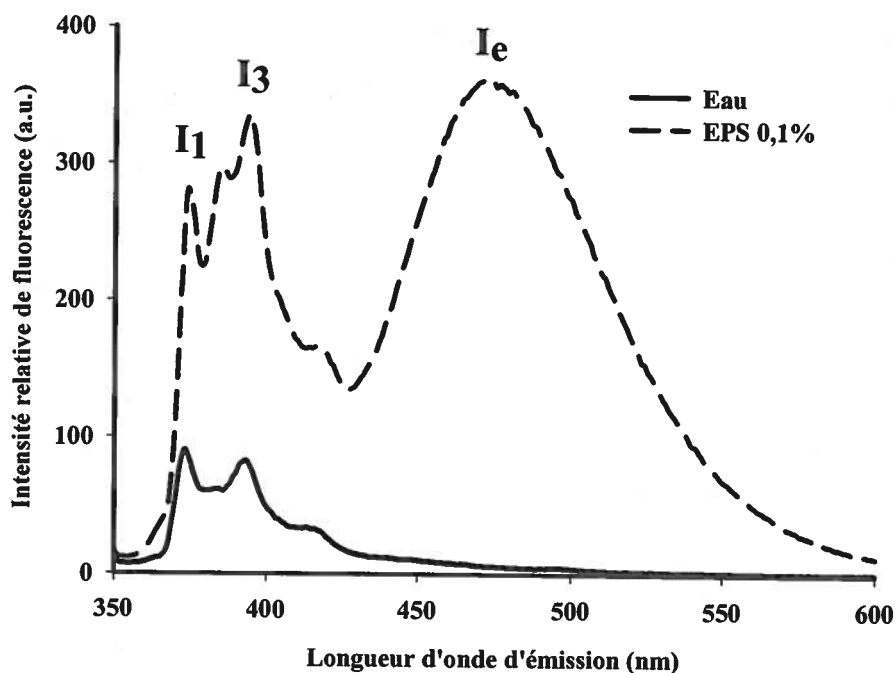
**Figure 5 : Microscopie électronique à transmission d'une solution d'EPS NBE4 1% (p/v) en coloration négative à l'acétate d'uranyle. Grossissement 120 000 X. Les dépôts noirs représentent des précipités d'acétate d'uranyle alors que les sphères claires représentent des micelles.**

### 3.2 Détermination de la formation de micelles et du potentiel d'encapsulation

Des essais d'encapsulation et d'incorporation ont ensuite été entrepris afin de confirmer les observations faites par microscopie et d'évaluer le potentiel des micelles. Deux méthodes d'évaluation de la concentration micellaire critique (CMC) ont été employées en mettant de l'avant la technique de fluorescence et en utilisant une sonde à cet effet; le pyrène.

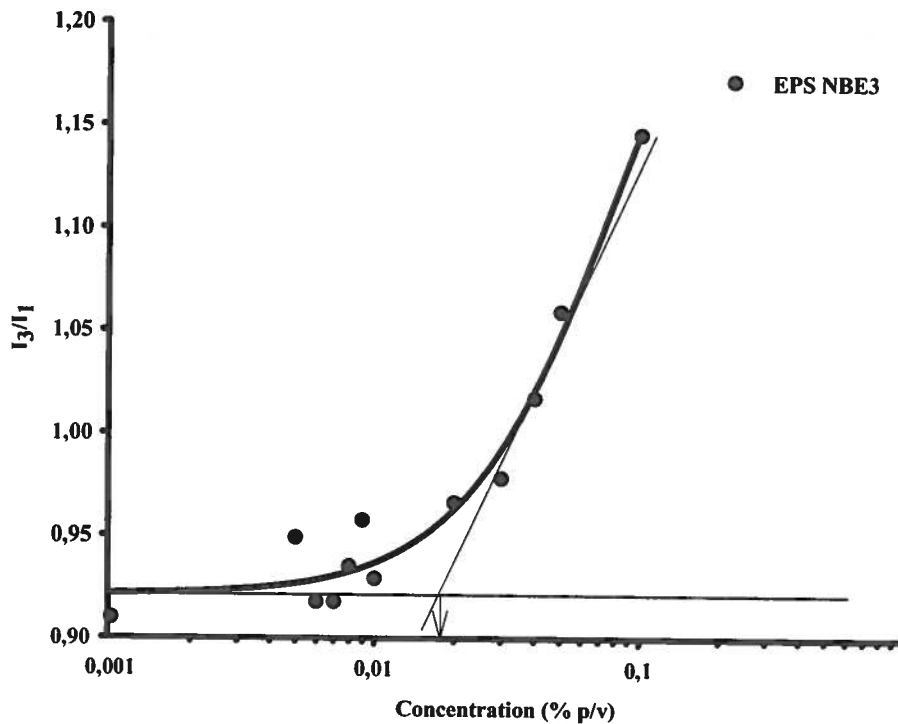
La première méthode consiste à déterminer le changement d'intensité de fluorescence de la sonde en fonction de la longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{em}$ ). La Figure 6 illustre un profil type pouvant être obtenu par cette méthode.





**Figure 6 : Profil type de fluorescence du pyrène dans l'eau ou en présence d'EPS solubilisés (NBE2 0,1% (p/v)). Les courbes représentent l'intensité de fluorescence relative (a.u.) en fonction de la longueur d'onde d'émission suite à une excitation à 340 nm.  $I_1$  : intensité relative à 374 nm,  $I_3$  : intensité relative à 394 nm et  $I_e$  : intensité relative à 474 nm.**

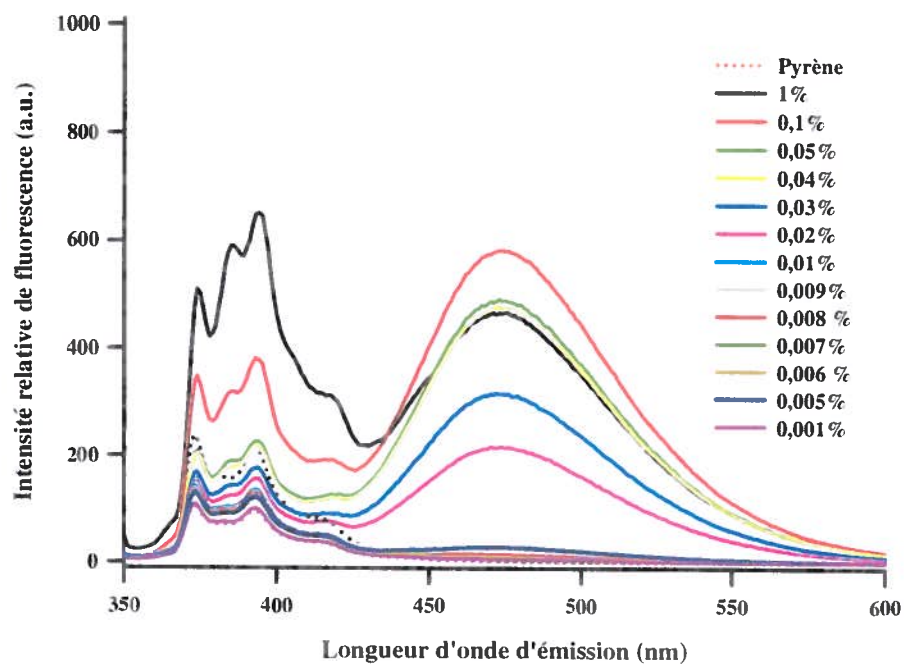
Le balayage en longueur d'onde d'émission permet de recueillir plusieurs paramètres desquels découle le calcul de la CMC. Ainsi, dans le spectre de fluorescence à la Figure 6,  $I_1$  correspond à l'intensité maximale enregistrée à une émission de 374 nm, intensité qui augmente significativement dans les solvants polaires.  $I_3$  pour sa part, s'identifie à l'intensité maximale de fluorescence à une émission de 394 nm, mais ne varie pratiquement pas en fonction de la polarité du solvant [106]. L'intensité à ces deux longueurs d'onde varie donc en fonction de la présence (ou l'absence) d'un système micellaire dans le solvant. Le ratio  $I_3/I_1$  permet d'évaluer la présence d'un tel système par la polarité. Dans un solvant tel que l'eau, le ratio se situe aux alentours de 0,8 à 0,9 alors que dans un solvant apolaire ou dans un environnement hydrophobe, comme à l'intérieur d'une micelle, le ratio peut augmenter jusqu'à 1,7 [106]. Le calcul de la CMC s'établit donc en fonction de ce ratio. La Figure 7 illustre la courbe utilisée pour obtenir la CMC dans le cas des EPS NBE3.



**Figure 7 : Courbe sigmoïdale type du ratio  $I_3/I_1$  pour la détermination de la CMC des EPS (lot NBE3). Le point d'inflexion, correspondant à la CMC, est déterminé en traçant deux tangentes à la courbe. Le point d'intersection des 2 tangentes correspond à la CMC soit 0,02% (p/v) dans ce cas précis.**

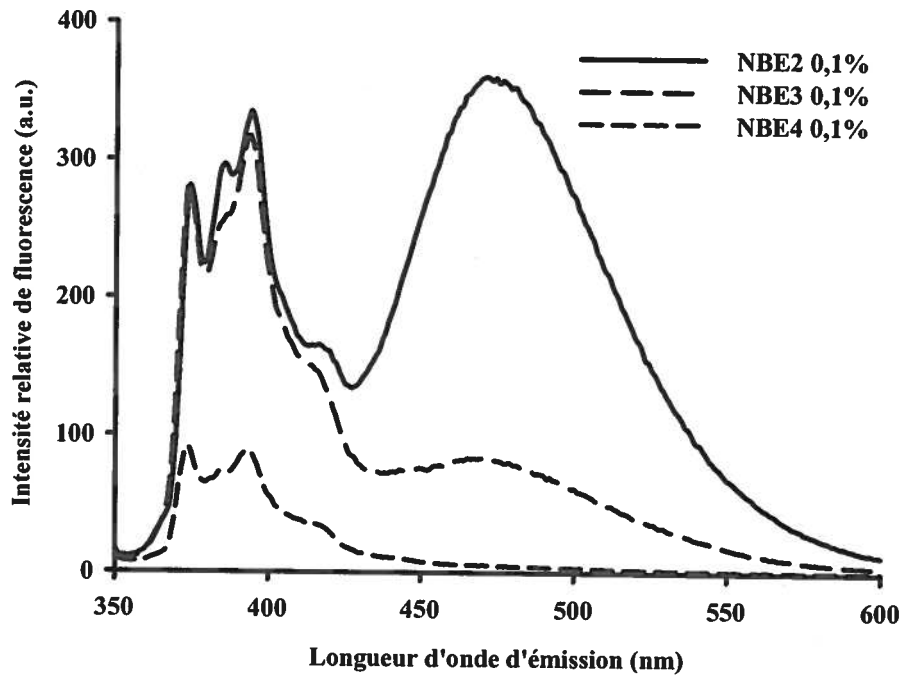
Le ratio  $I_3/I_1$  permet donc l'élaboration d'un graphique à courbe sigmoïdale dont la rencontre des deux tangentes permet de déterminer la CMC. Celle-ci se situe à 0,02% (p/v) pour les EPS NBE3.

Le troisième signal qui attire l'attention à la Figure 6 correspond à 474 nm dont l'intensité maximale affiche la présence d'un excimère. Ce profil particulier a tendance à se former lorsque la concentration de pyrène à l'intérieur d'un espace restreint est très élevée. Il se produit alors un empilement du pyrène dû à la très grande proximité des molécules. Cet empilement conduit à l'émission de photons à une longueur d'onde différente, soit un stade énergétique lors duquel les électrons sont à un état transitoire instable. Cet effet est lié à la concentration d'EPS en solution comme la Figure 8 l'illustre.



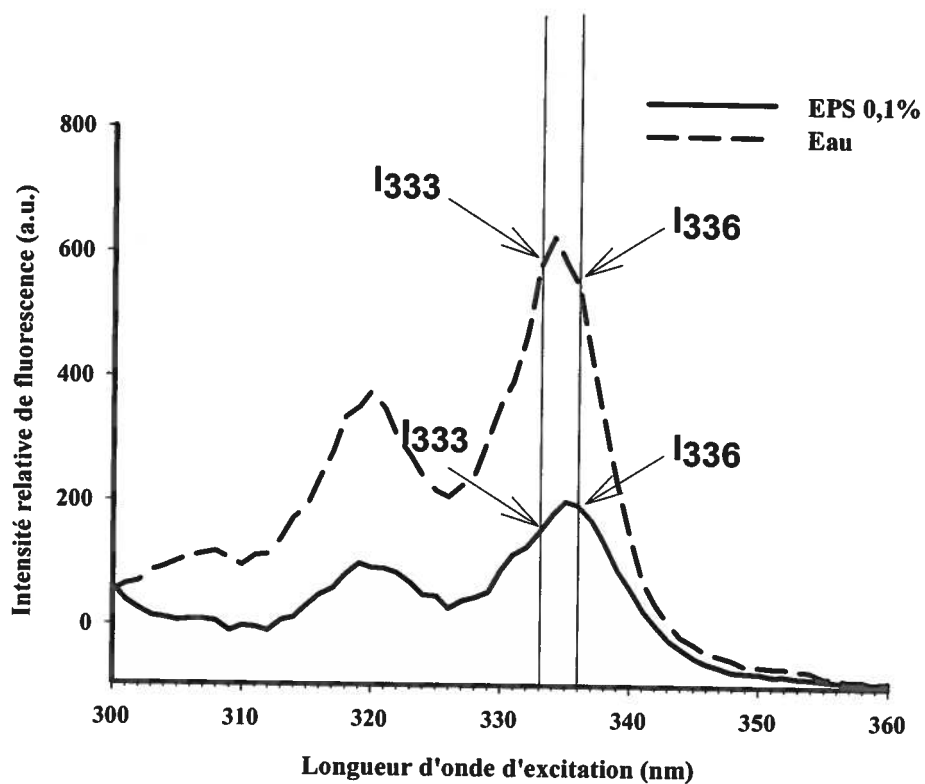
**Figure 8 : Profil de fluorescence du pyrène en fonction de la concentration des EPS (lot NBE2). Les courbes représentent l'intensité de fluorescence relative (a.u.) en fonction de la longueur d'onde d'émission suite à une excitation de 340 nm**

Il a été envisagé que la présence d'excimères soit liée aux propriétés des EPS, cependant avec l'affinement du procédé de récupération, la présence d'excimères s'est peu à peu atténuée. La Figure 9 illustre ce phénomène qui s'amenuise du lot NBE2 au lot NBE4. Cependant la CMC n'est pas affectée.



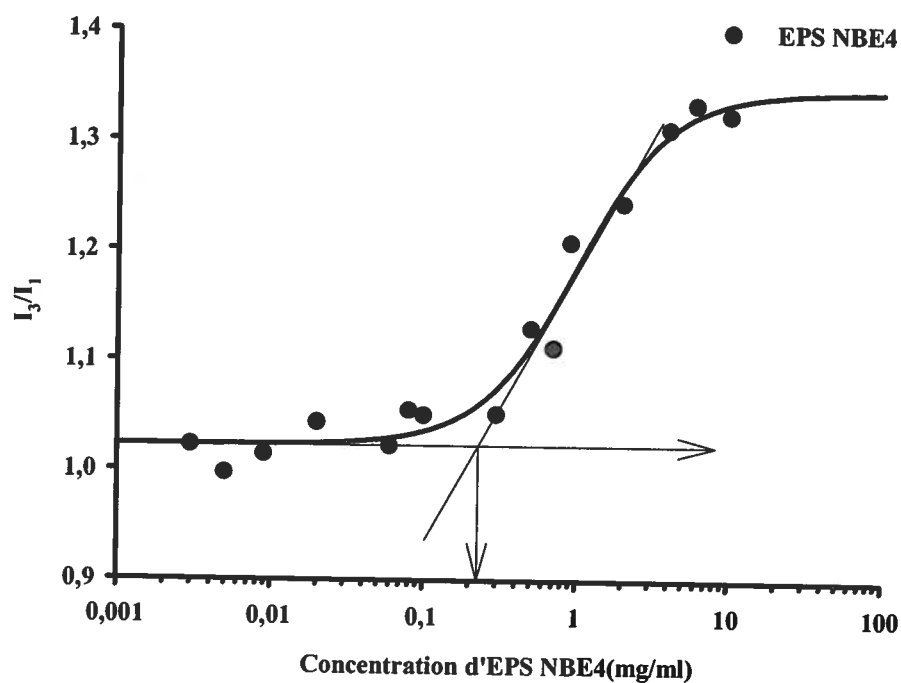
**Figure 9 : Profil de fluorescence du pyrène en fonction du lot d'EPS utilisé. Les courbes représentent l'intensité de fluorescence relative (a.u.) en fonction de la longueur d'onde d'émission suite à une excitation à 340 nm.**

La deuxième méthode utilisée afin de déterminer la CMC, utilise toujours le pyrène comme sonde, mais cette fois-ci les changements de fluorescence sont détectés par balayage d'excitation selon une longueur d'onde d'émission fixe. Cette méthode permet aussi de produire un ratio  $I_{336}/I_{333}$  afin d'obtenir un graphique à courbe sigmoïdale. À l'instar de la précédente méthode, ce type de spectre ne permet pas d'observer la formation d'excimères. Cependant, elle permet d'observer un déplacement (Figure 10) dans les intensités maximales de 333 nm (pyrène dans l'eau) vers 336nm (pyrène dans un microdomaine hydrophobe e.g. en présence de micelles).



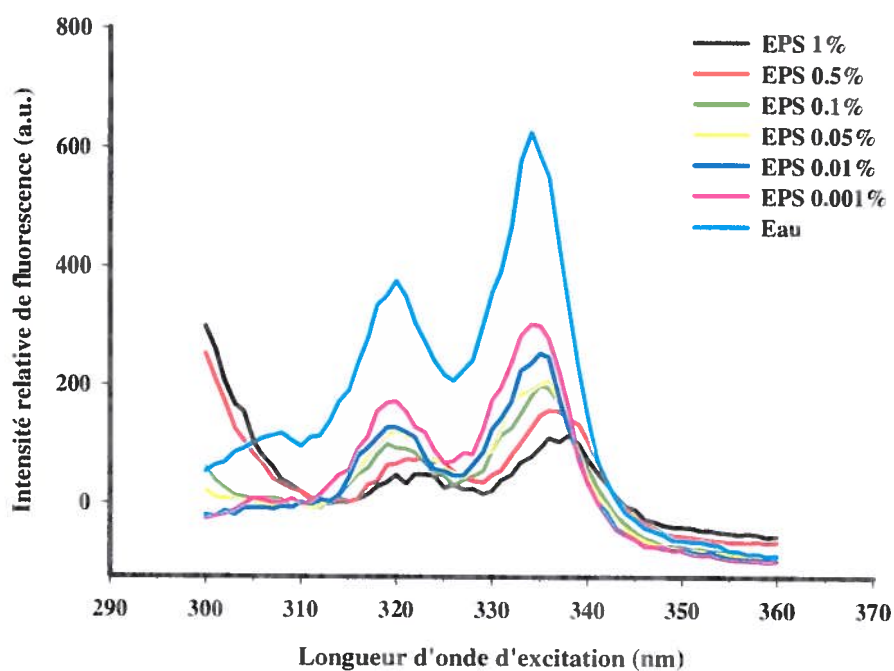
**Figure 10 : Profil type de fluorescence du pyrène dans l'eau et en présence d'EPS (lot NBE4). Les courbes représentent la fluorescence relative observée à une longueur d'onde d'émission de 390 nm suite à un balayage d'excitation (300 nm -360 nm)**

La figure 11 permet d'observer la régression sigmoïdale effectuée sur les données obtenues par le calcul du ratio  $I_{336}/I_{333}$ . Le point d'inflexion déterminé correspond aussi à 0,2% (p/v).



**Figure 11 : Courbe sigmoïdale type du ratio  $I_{336}/I_{333}$  pour la détermination de la CMC des EPS (lot NBE4). La CMC est déterminée par l'intersection des 2 tangentes à la courbe soit 0,2 mg/ml ou 0,02% (p/v).**

Outre le déplacement de l'intensité maximale de 333nm à 336nm, il est aussi possible d'observer une diminution de l'intensité de fluorescence et ce en fonction de la concentration d'EPS (voir Figure 12). Ce blanchiment énergétique (quenching) à ces longueurs d'ondes précises se caractérise aussi par une augmentation de l'intensité de fluorescence entre 300 et 310 nm.



**Figure 12 : Profils des spectres obtenus avec différentes concentrations d'EPS (lot NBE4). Les courbes représentent la fluorescence relative observée à une longueur d'onde d'émission de 390 nm suite à un balayage d'excitation (300 nm -360 nm).**

### 3.3 Pharmacocinétique

#### 3.3.1 Transport de fluorescéine

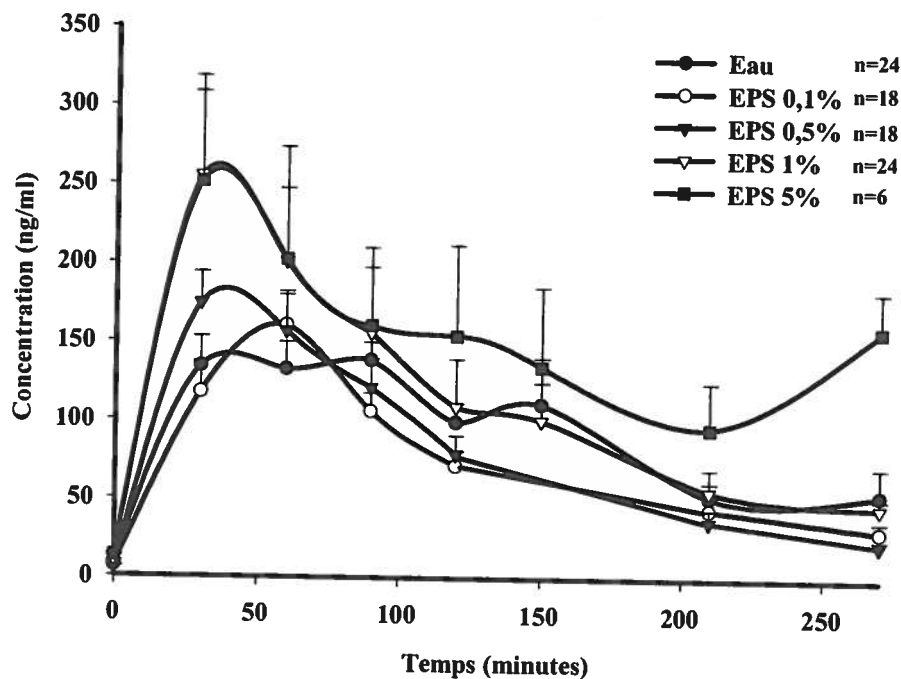
Les EPS ont été formulés avec différentes sondes fluorescentes afin d'évaluer le changement potentiel de la pharmacocinétique de ces dernières. Pour ce faire, la comparaison a été établie avec un groupe dans lequel le véhicule était de l'eau. Les intensités de fluorescence ont été transformées en concentrations (ng/ml) selon une courbe standard correspondant à la sonde utilisée, soit la fluorescéine ou la rhodamine 123. Les résultats présentés dans cette section correspondent à une partie des expériences de transport *in vivo*. Il s'agit de compilations de plusieurs expériences.

Dans le cas de la fluorescéine, les formulations EPS 0,1% / FL et EPS 0,5% / FL démontrent une faible variation des paramètres, en général, par rapport au groupe eau. Les variations s'affichant à l'intérieur d'une marge d'environ 20%. Cependant, pour les formulations de EPS 1% / FL et de EPS 5% / FL, un déplacement des valeurs supérieur à approximativement 20% est constatable pour certains paramètres.

Les données de cinétiques affichées dans les graphiques qui suivent (Figures 13 et 14) ont été utilisées dans une analyse plus approfondie afin de déterminer des valeurs découlant des données obtenues. Bien que l'utilisation d'un logiciel d'analyse pharmacologique (WinNonLin) ait été faite, nous n'avons pas présenté les valeurs puisqu'à ce stade ces données sont plus arbitraires que quantitatives. Cependant, ces valeurs nous ont permis de détacher certaines tendances par rapport à des paramètres importants en pharmacologie.

L'AUC représente l'aire sous la courbe du temps initial de dosage jusqu'à la dernière prise de sang effectuée. L'AUC est directement proportionnelle à la quantité totale de médicament introduite dans la circulation systémique, indépendamment de la vitesse à laquelle le médicament y pénètre [9]. Tmax représente le temps auquel la concentration maximum (C max) est atteinte. Le temps de demi-vie terminal ( $T_{1/2}$ ) est calculé du temps 0 ( $t=0$ ) à la dernière donnée ( $t=270$ ).

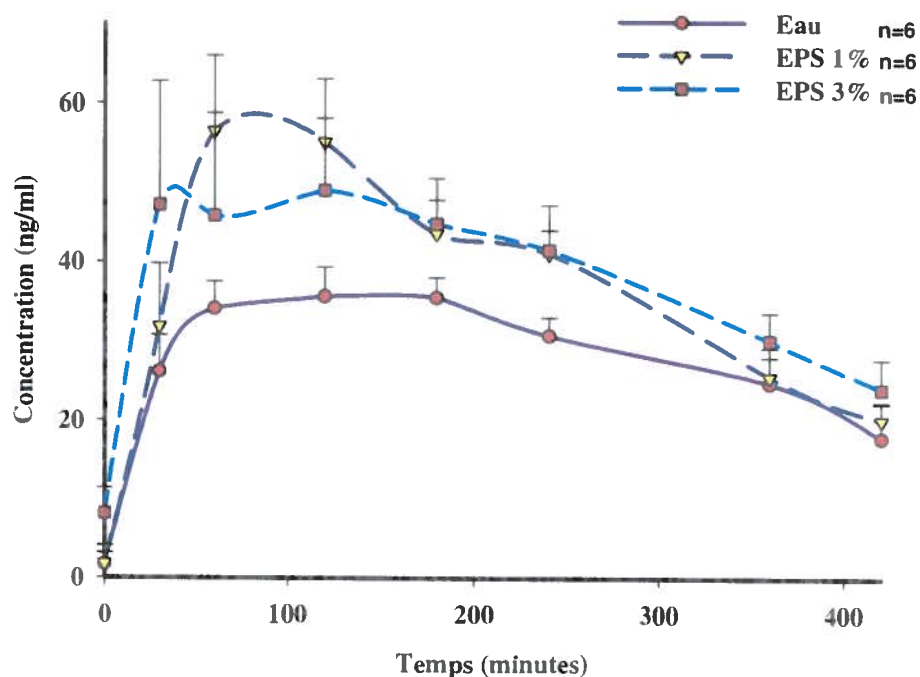




**Figure 13 : Compilation de courbes de concentration plasmatique de fluorescéine en fonction du temps. Les rats Wistar femelles ont été gavés de formulations d'EPS / FL au temps 0 suite à la saignée préliminaire (n = nombre d'animaux).**

La fluorescéine est une molécule qui diffuse rapidement dans la circulation sanguine. De toutes les formulations présentées à la figure 13, celle qui se démarque le plus correspond aux EPS 5% (p/v) / FL. Cette formulation démontre une AUC et une concentration maximale supérieures ainsi qu'un temps de demi-vie différent en raison d'une modification du profil à 270 minutes. La formulation d'EPS 1% / FL affiche aussi une  $C_{max}$  élevée bien que l'AUC ne change pratiquement pas par rapport aux autres formulations d'EPS. Le temps de demi-vie de ces formulations (0,1% à 1%) semble diminuer face au groupe Eau qui présente une courbe d'élimination non-linéaire particulière.

## 3.3.2 Transport de rhodamine 123



**Figure 14 : Compilation de courbes de concentration plasmatique de rhodamine 123 en fonction du temps. Les rats Wistar femelles ont été gavés de formulations EPS / R123 au temps 0 suite à la saignée préliminaire (n = nombre d'animaux).**

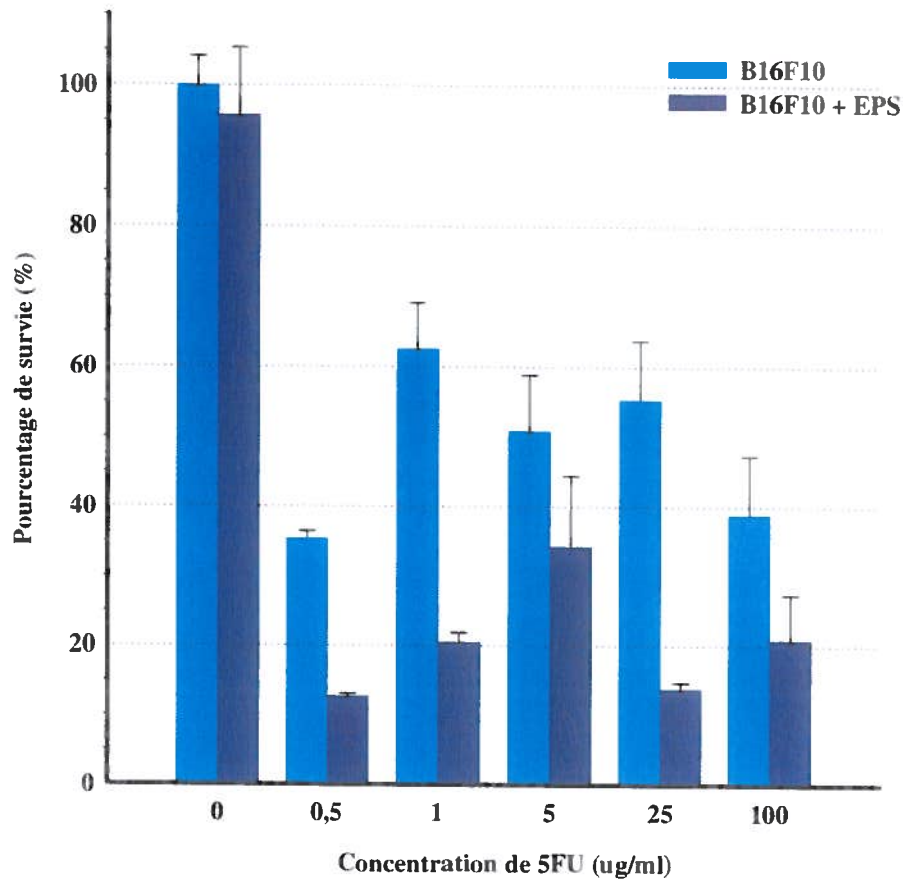
À ce jour, les formulations de rhodamine ont été testées sur un nombre plus restreint d'animaux que dans le cas de la fluorescéine (Voir Figure 14). Cependant, certaines tendances s'affichent. L'AUC et la concentration maximale augmentent de façon visible pour les deux formulations contenant des EPS nous poussant à avancer l'hypothèse que les EPS puissent favoriser l'entrée de molécules dans la circulation sanguine. La formulation EPS 1% (p/v) / FL indique un déplacement de son temps de demi-vie vers la droite ce qui pourrait indiquer que les EPS puissent passer en circulation avec la molécule transportée.

### 3.4 Détermination du potentiel anticancéreux sur des lignées cellulaires

Des lignées cellulaires tumorales, B16F10 et CaCo-2, ont ensuite été utilisées afin d'évaluer le potentiel synergistique de nos EPS à améliorer la cytotoxicité liée à un médicament anticancéreux, soit le 5FU.

#### 3.4.1 Cellules prolifératives

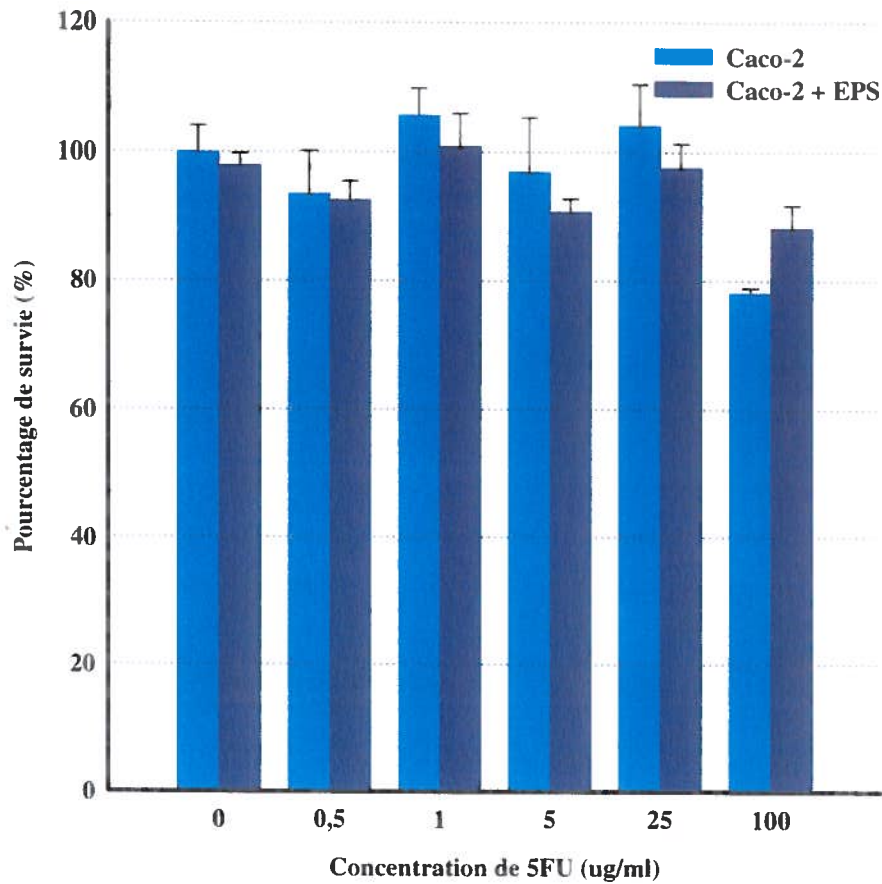
Les cellules tumorales B16F10 possédant un rythme de croissance très soutenu ont été mis en présence de formulations de EPS 0,1% (p/v) / 5FU. La méthode d'évaluation de la survie utilise le XTT qui est un colorant vital. Lorsque les cellules sont vivantes, leurs déhydrogénases mitochondriales scindent le XTT ce qui donne une coloration orangée pouvant être quantifiée par spectrophotométrie. Après 72h, il n'y a aucune toxicité reliée aux EPS seuls relevée sur les cellules B16F10 (voir Figure 15). Cependant, à une dose de 0,5µg/ml de 5FU la survie des cellules est affectée à 60%. L'augmentation de la dose ne semble pas affecter davantage les cellules, même qu'elles gagnent jusqu'à 20% de survie. L'effet de la formulation d'EPS / 5FU est assez notoire par une augmentation de près de 25% additionnels à l'effet du médicament seul. Cet effet reste persistant indépendamment de la dose, tout en gardant le même profil que la courbe du 5FU seul.



**Figure 15 : Survie de cellules B16F10 en présence de 5FU formulé ou non avec les EPS NBE3. Le pourcentage de survie est exprimé en fonction de la concentration de 5FU présent dans les formulations. La survie est évaluée 72 heures après l'application du traitement sur les cellules.**

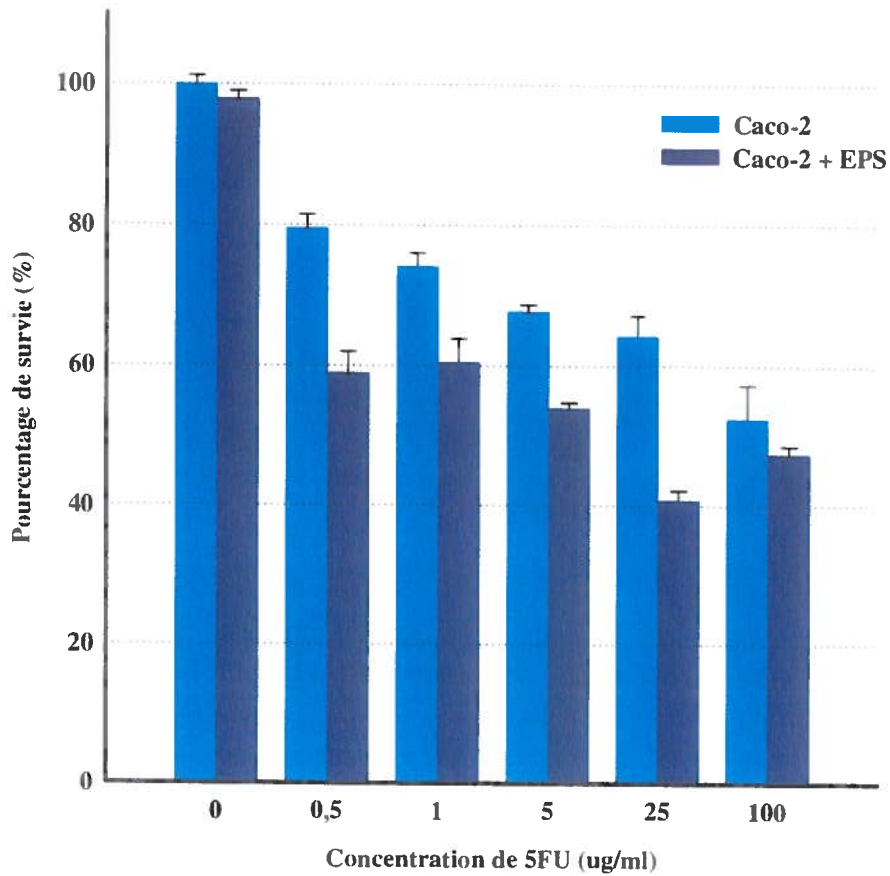
#### 3.4.2 Cellules différenciées

Les cellules CaCo-2 ont aussi été exposées à différentes doses de 5FU, formulé ou non avec des EPS à concentration fixe (0,1% (p/v)). L'utilisation de cellules de carcinome intestinal avait pour but de se rapprocher du modèle visé, soit le cancer du côlon. Les cellules CaCo-2 différenciées subissent peu sinon aucunement l'effet cytotoxique du 5FU formulé avec les EPS ou pas (voir Figure 16).



**Figure 16 : Survie de cellules CaCo-2 différenciées en présence de 5FU formulé ou non avec les EPS NBE3. Le pourcentage de survie est exprimé en fonction de la concentration de 5FU présent dans les formulations. La survie est évaluée 72 heures après l'application du traitement sur les cellules.**

Cependant, les cellules sous leur forme proliférative sont affectées par le 5FU d'une façon dépendante de la concentration. L'apparition d'un effet synergique apparaît avec les formulations d'EPS 0,1% (p/v) dans des proportions atteignant jusqu'à 20% d'amélioration (Figure 17).

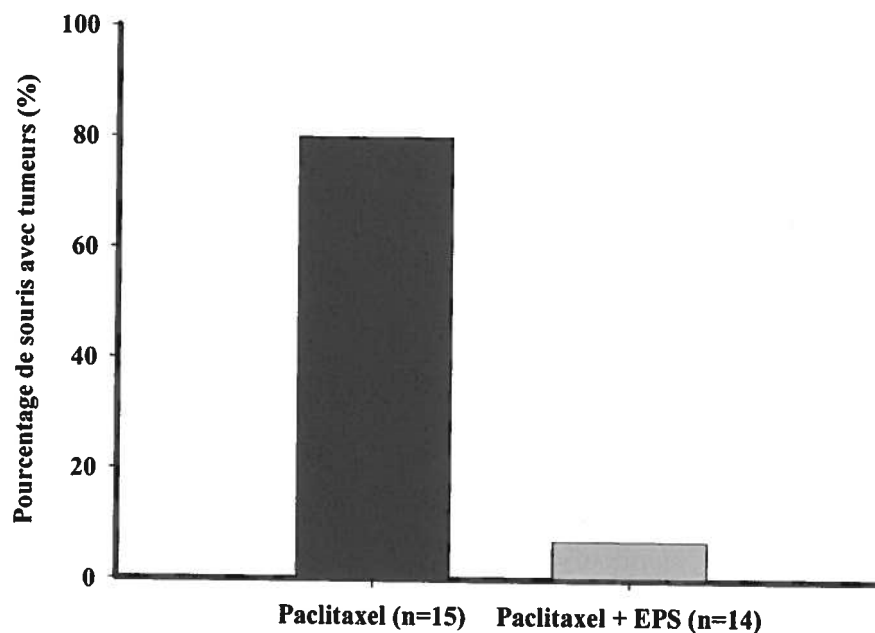


**Figure 17 : Survie de cellules CaCo-2 en prolifération en présence de 5FU formulé ou non avec les EPS NBE3. Le pourcentage de survie est exprimé en fonction de la concentration de 5FU présent dans les formulations. La survie est évaluée 72 heures après l'application du traitement sur les cellules.**

### 3.5 Détermination de l'effet *ex vivo* des EPS

Un deuxième médicament anticancéreux a été utilisé dans un autre modèle de cancer. Le paclitaxel est un médicament à très faible solubilité dans l'eau. L'intérêt de cette expérience était d'évaluer si des cellules, dont les chances de survie étaient nulles en culture cellulaire, pouvaient recouvrir dans un bio-réacteur tel que le muscle de la cuisse d'une souris. Les cellules exposées trois heures au traitement sévère du paclitaxel ont ensuite été injectées dans le tibialis antérieur de souris C57BL/6. Les souris ont été suivies afin d'évaluer l'apparition de tumeurs, donc la récurrence des cellules tumorales. Les souris

ont été sacrifiées après 14 jours et 80% des souris, dans le groupe de cellules traitées seulement au paclitaxel, avaient d'importantes masses tumorales au niveau de la patte. À l'opposé, les souris dont les cellules injectées avaient été traitées avec la formulation EPS/Paclitaxel ne présentaient aucune tumeur au niveau de la patte et ce dans une proportion atteignant 93% (Figure 18).



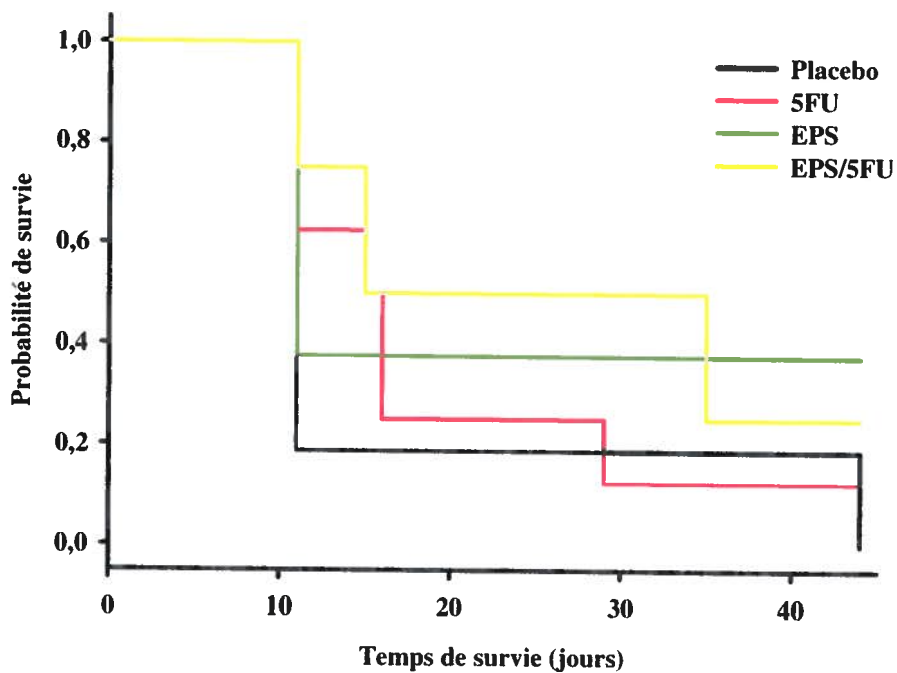
**Figure 18 : Pourcentage de souris affichant des tumeurs 14 jours après l'injection intramusculaire de cellules B16F10 traitées au paclitaxel +/- EPS NBE3 0,1% (p/v). (n = nombre d'animaux par groupe).**

### 3.6 Détermination du potentiel anticancéreux *in vivo*

Suivant les observations que nous avons pu faire sur des lignées cellulaires tumorales, nous avons procédé à des tests sur des rongeurs afin de déterminer *in vivo* l'effet de nos EPS dans un traitement anticancéreux. Quatre jours suivant l'injection intrapéritonéale des cellules B16F10, les traitements ont été donnés puis la survie observée sur 44 jours. Les deux prochaines figures (19-20) illustrent deux expériences de survie effectuées sur des souris Balb/c. Les

résultats sont exprimés sous forme de graphiques de probabilités calculés par la méthode du produit limite (Kaplan-Meier).

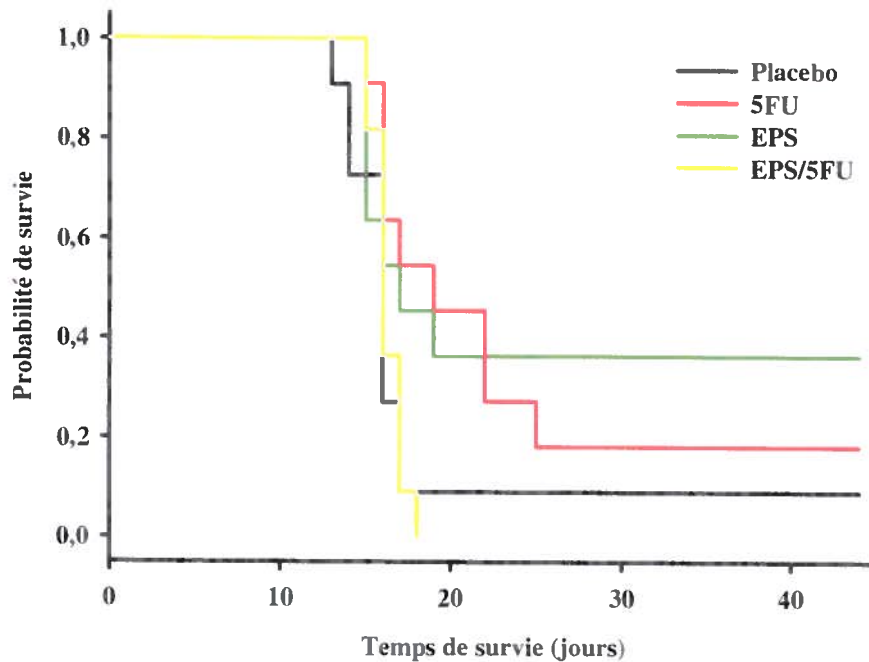
Nous pouvons constater une amélioration de 25% ou plus de la survie chez les souris traitées avec une formulation de EPS/5FU de 16 à 34 jours (Figure 19). Ensuite, cet effet chute sous l'effet indépendant des EPS qui conservent une probabilité de survie de 0,375 dès l'apparition des premiers décès.



**Figure 19 : Probabilité de survie de souris Balb/c en fonction du temps. Les souris ayant reçu une injection de cellules tumorales afin de mimer un cancer agressif. Les traitements ont été donnés au jour 4 (5FU et/ou EPS NBE2 0,1% (p/v)) et la survie observée sur 44 jours (n = 10 souris pour chacun des groupes).**



La Figure 20 démontre pour sa part une deuxième expérience de survie effectuée cette fois-ci avec les EPS NBE3. Nous voulions déterminer si les résultats étaient reproductibles avec un nouveau lot d'EPS. Cette fois-ci, les effets antitumoraux des EPS sont préservés, cependant l'effet additif qui était observable précédemment disparaît littéralement. La formulation EPS/5FU adopte le même profil que le groupe placebo.



**Figure 20 : Probabilité de survie de souris Balb/c en fonction du temps. Les souris ayant reçu une injection de cellules tumorales afin de mimer un cancer agressif. Les traitements ont été donnés au jour 4 (5FU et/ou EPS NBE3 0,1% (p/v)) et la survie observée sur 44 jours (n = 10 souris pour chacun des groupes).**

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION

À ce jour, plusieurs multi thérapies orales existent afin d'enrayer ou de réduire la progression de la croissance de masses tumorales. Cependant, l'effet thérapeutique obtenu n'est pas toujours à la hauteur des attentes. La résistance au transit gastrointestinal, la biodisponibilité reflétée par l'entrée plasmatique du médicament et son temps d'élimination ainsi que les effets secondaires sont des enjeux difficiles à surmonter. L'utilisation de molécules thérapeutiques simples (e.g. 5FU) lors de thérapies orales se termine souvent par des tentatives infructueuses. L'objectif d'acheminer le médicament aux cellules affectées ou de le faire passer en circulation sanguine par un transit au travers de la barrière épithéliale intestinale représente une série de tentatives dont les résultats sont souvent décevants. Les formulations thérapeutiques qui permettent l'amélioration du transport du médicament au site visé et donc un meilleur effet thérapeutique sont donc souhaitables.

Dans la présente étude, le cancer du côlon nous intéresse particulièrement étant donné le site de formation des tumeurs au niveau de l'intestin. Les traitements sont principalement donnés par voie intraveineuse ce qui engendre une élimination rapide ainsi que des effets secondaires systémiques. Bien que primée, la voie orale reste peu efficace en raison de conditions physiologiques défavorables aux médicaments, comme précédemment énuméré, mais aussi par la présence de protéines MDR (« multi drug resistant ») et MRP (« multi resistant protein »), limitantes. Ces deux dernières protéines membranaires diminuent l'efficacité des thérapies par le reflux du médicament vers la lumière intestinale. Si le médicament utilisé possède en partant une faible pénétration plasmatique, les protéines de résistance aux médicaments limitent considérablement son absorption et augmentent son élimination dans les fèces.

Ainsi, dans l'optique d'augmenter le rendement d'un agent chimiothérapeutique suite à la résection d'une masse tumorale ou dans des cas avancés de cancer, l'une des approches envisageables consiste à utiliser un transporteur. Un des buts de ce dernier est de protéger le médicament des conditions physiologiques du TGI et par le fait même de protéger le patient

des effets secondaires reliés à l'irritation de la muqueuse par ces médicaments relativement toxiques. Dans le meilleur des cas, la libération du médicament par le véhicule se fera au site d'intérêt visé pour le traitement de la maladie. Un transporteur en mesure de potentialiser l'effet du médicament sera davantage souhaitable.

Il existe présentement un bon nombre d'excipients sur le marché qui sont composés de sucres (lactose, gomme de guar...) [56]. On ne voue cependant pas d'effets à ces excipients, considérés pour la plupart comme inertes, autres que de différer la libération du médicament dans le TGI. Les exopolysaccharides, de leur côté, représentent des sucres à intérêt grandissant dans plusieurs domaines. Le domaine de la pharmacologie peut y voir des avantages dans le domaine des excipients ou dans le domaine du transport actif. À ce jour, une seule publication fait état de la capacité d'un exopolysaccharide, le pullulan, de former des nanostructures pour des fins de transport de médicaments [108]. L'intérêt du projet est d'élargir le potentiel des exopolysaccharides, particulièrement les EPS de LABs, dans le domaine du transport de substances thérapeutiques.

À prime abord, la récupération des EPS représentait une difficulté. La plupart des publications faisant état de la production et de la récupération d'EPS, produits par des souches pures, utilisent des techniques de précipitation à l'éthanol [90, 109]. Les cultures produites n'excédant rarement plus que quelques litres étant donné la nécessité de procéder par une étape de précipitation par un volume égal d'éthanol. Dans le cas présent, les grains de kéfir constituent un consortium de plusieurs espèces de bactéries et de levures, de protéines et d'EPS. La proportion de débris cellulaires et de contaminants est supérieure à la quantité que l'on pourrait retrouver lors de la production d'EPS par une souche pure. Le but était d'obtenir les EPS en grande quantité, compte tenu des rendements faibles habituellement observés lors de la production d'EPS en général, afin d'en bénéficier d'une quantité suffisante pour l'élaboration de plusieurs projets. Les premiers essais de récupération et de purification d'EPS ont été réalisés par ultrafiltration (système Amicon). Cependant, la membrane colmatait en raison du volume de liquide brut à

concentrer. Le tout s'effectuait sous pression d'azote constante et générait donc des coûts en matériel et en temps trop importants pour le volume que nous désirions traiter. Les grains de kéfir ont donc été dissous dans de l'eau chaude puis la solution obtenue filtrée par un processus de filtration tangentielle. L'utilisation de cassettes de membranes allant de 0,46 à 0,60 mètres carrés de surface dans un système de filtration en continu fourni par une puissante pompe a permis d'éliminer la majeure partie de la masse bactérienne et des débris excédant  $0,45 \mu\text{M}$  par un seul passage. La méthode était beaucoup plus rapide (deux jours au lieu de sept) pour un volume trente fois plus important. De plus, l'avantage d'utiliser des cassettes à filtration diminuait les coûts. Nonobstant, l'étape de précipitation à volume égal d'éthanol pur restait problématique surtout pour des quantités atteignant les quatre-vingt litres. L'utilisation de membranes de plus petite porosité (3KDa) a permis, par le même processus de filtration, de concentrer à cinq litres un volume de cent litres facilitant ainsi l'étape de purification à l'éthanol. Les EPS de *L. kefiranofaciens* étant supérieurs à 500 KDaltons, la proportion de sucres inférieurs à 3 KDaltons pouvant être éliminée lors de l'étape de concentration restait faible par rapport au rendement global de récupération. Ces étapes ont donc permis de développer une méthode efficace pour produire plusieurs grammes d'EPS en quelques jours. Afin de déterminer si l'excédent d'azote, observé dans le bilan d'analyse élémentaire, était dû à la présence de sucres aminés ou à la présence de protéines, nous avons modifié notre protocole de purification. Une étape de digestion enzymatique par une protéase a été ajoutée nous permettant d'avancer que l'azote était d'origine protéique. Cette nouvelle procédure nous a permis d'améliorer la pureté de nos EPS et pourrait bien à l'avenir nous épargner l'étape de précipitation à l'éthanol.

Dans l'effort de caractérisation, l'analyse par résonance magnétique nucléaire a eu pour but de permettre la détermination de la structure la plus récurrente du polymère. L'analyse de branchement a permis d'identifier un hexasaccharide dont la structure s'apparente à celle retrouvée dans la littérature pour le polymère appelé « Kéfiran ». Cette structure est répétée des milliers de fois et peut atteindre des poids moléculaires dépassant les 500

KDaltons [104]. La similitude avec le kéfirane a été confirmée par une analyse élémentaire dont les proportions d'atomes affichent des résultats similaires à ceux relevés dans la littérature ainsi qu'un ratio en galactose/glucose (1,33 : 1) s'approchant de celui du kéfirane [2]. Ces données ont pour but de nous aider à connaître les possibilités de notre polysaccharide et de nous renseigner sur les interactions qu'il pourrait avoir en solution.

En soit, jusqu'à cette étape, les EPS purifiés ne se distinguent pas de ceux retrouvés dans la littérature, outre la méthode de récupération qui reste plus efficace. L'analyse par microscopie électronique nous a permis d'observer des structures de l'ordre de 50 à 700 nm. L'anneau sombre, produit par le colorant négatif, présent au pourtour de plusieurs structures nous a permis d'avancer l'hypothèse qu'il s'agissait de micelles dans un état sphérique ou globulaire. Les structures similaires, mais sans contraste à leur pourtour, représenteraient les mêmes structures mais ayant été écrasées lors de la centrifugation dans les étapes de préparation des échantillons pour la microscopie. La présence de ces deux formes de structures pourrait indiquer que la couche d'EPS composant l'extérieur de la micelle est relativement mince.

Étant donné que quelques ouvrages font état d'effets anticancéreux rattachés au kéfirane [2, 4] et que d'autres EPS de LABs sont reconnus pour avoir des effets similaires [5, 6], le concept de synergie devient intéressant. Ce dernier concept intervient lorsque l'action de deux substances, par leur association, permet d'obtenir un effet global supérieur à la somme des effets isolés [110]. Ainsi lorsqu'on parle de synergie médicamenteuse, il est question d'effets additifs ou potentialisateurs [111]. Les premières observations consistent à évaluer si les EPS de LABs favorisent le transport de médicaments anticancéreux. Une deuxième étape réside à observer si en plus de transport, les EPS isolés peuvent améliorer l'efficacité du traitement thérapeutique en additionnant leur effet à celui du médicament.

Il est important de mettre ici l'accent sur l'aspect naturel du produit. Dans le domaine du transport du médicament, l'ère du polymère est très en vogue. La majorité des transporteurs en développement sont artificiels. La chimie moderne offre la possibilité de former des chaînes polymériques de toutes

sortes permettant une plus grande diversité au niveau de la solubilité, de la bioadhérence et de la viscosité. Cependant, nombre de ces polymères présentent des problématiques toxicologiques au cours de leur transit dans l'organisme, causant parfois des déstabilisations irrémédiables des cellules ou causant une hépatotoxicité ou autre pathogénécité causée par l'accumulation du polymère au sein de l'organisme. Un des intérêts de production réside dans le fait d'utiliser un produit facile à produire et qui nécessite très peu d'étapes en présence de solvants organiques.

La formation de micelles s'effectue normalement en présence de polymères amphiphiles. Cependant, les EPS de cette étude ne possédant pas de groupements chargés, l'hypothèse de la formation de micelles par des exopolysaccharides peut sembler particulière. Cependant, en raison de son arrangement spatial, le polysaccharide, bien que non chargé, possède un caractère amphiphile intrinsèque. Cela est dû aux groupements hydroxyles polaires du sucre, lui conférant un comportement hydrophile, ainsi qu'à la portion hydrophobe engendrée par sa surface planaire. La structure linéaire du kéfiran est donc connue mais sa conformation tridimensionnelle demeure inconnue. Comme la microscopie nous a permis de le constater, nous pouvions nous attendre à l'agencement des EPS en une structure micellaire.

L'utilisation du pyrène a permis de pousser plus loin les observations effectuées au microscope électronique par des résultats quantifiables.

Afin d'émettre un signal fluorescent, le pyrène doit être dans un état de soluté afin d'être excitable pour que ses électrons, lors de leur retour à leur niveau énergétique de base, émettent leur surplus d'énergie sous forme de photons. Sa faible solubilité en milieu aqueux ne lui permet pas cet état ainsi donc, en présence de micelles, le pyrène aura une prédominance pour le micro domaine hydrophobe des micelles à l'intérieur duquel il pourra être excitable [112]. Le choix du pyrène parmi d'autres sondes s'est fait particulièrement en raison de son temps de vie relativement long de fluorescence, de sa capacité à renseigner sur la polarité de son microenvironnement et sa capacité de former des excimères [113]. Les graphiques de balayage en longueur d'onde d'émission ont permis le calcul du ratio  $I_3/I_1$ . Ce ratio, obtenu en fonction de la concentration d'EPS, nous a permis de générer une courbe sigmoïdale et ainsi

d'identifier le point d'inflexion (CMC) à partir duquel il est possible de constater la formation de micelles, soit 0,2 mg/ml ou 0,02% (p/v). Deux méthodes différentes, utilisant le pyrène, nous ont permis de valider la CMC. Le point à soulever réside dans l'apparition d'excimères lors de l'utilisation du lot d'EPS NBE2. Les excimères précisent l'empilement du pyrène dans un environnement confiné. Pour ce faire, la concentration du pyrène doit être élevée soit aux alentours de  $10^{-4}$  mol/L alors que la limite de solubilité du pyrène est aux alentours de  $10^{-7}$  mol/L. À ce moment, les probabilités d'une molécule de pyrène à l'état excité de rencontrer une molécule à l'état de base pendant la période d'excitation (environ 200-300 nanosecondes) est grande, résultant en l'apparition de l'excimère [112]. Au lieu de retourner à leur état de base, les électrons du pyrène passent à un état énergétique de transition qui s'affiche en fluorescence par l'apparition d'un signal d'émission à 474 nm. Ce signal nous renseigne donc sur la friction au sein de la micelle. Ce phénomène porte donc à croire que les micelles, ou le réseau micellaire, formées par le lot NBE2 posséderaient une haute capacité de chargement. Phénomène des plus intéressants quand on sait qu'en microencapsulation, la limitation vient souvent du fait que les véhicules de transport sont de petite taille pour permettre un meilleur ciblage mais qu'ils ont une capacité de chargement restreinte pour la molécule active d'intérêt. Les EPS NBE2 auraient donc une certaine élasticité ou une microviscosité interne accrue. Ce phénomène est concentration-dépendant et disparaît à l'approche de la CMC. Nonobstant, la formation d'excimères disparaît dans les lots d'EPS NBE3 et NBE4 alors que les méthodes d'extraction et de purification se raffinent. Il a été avancé que la membrane solubilisée des bactéries puisse être responsable de la présence des excimères. Une expérience préliminaire semble attribuer aux bactéries cet effet, mais pas en totalité. Cette caractéristique propre aux EPS purifiés à partir des grains de kéfir est présentement sous investigation.

Cet effet n'est pas observable par la deuxième méthode de fluorescence employée. Toujours est-il que cet essai présente aussi quelques particularités. Normalement, en présence de micelles, le signal maximal à 334 nm se déplace à 336 nm, mais l'intensité demeure la même. L'utilisation des EPS de cette étude nous a démontré en partie ce phénomène par un déplacement vers 336

nm avec pour différence que les signaux ont affiché une perte d'intensité possiblement dû à un blanchiment. Cette observation demeure particulière et n'est pas référencée dans la littérature. Les molécules d'EPS sont avant tout de longues chaînes planaires et rigides dont un plan est hydrophobe et l'autre hydrophile. Il est possible de croire que le pyrène puisse être emprisonné entre les différentes chaînes dans la portion hydrophobe. Dans ce cas précis, il y aurait alors un blanchiment mais sans encapsulation. Cela se représenterait par une perte d'intensité de fluorescence, seulement il n'y aurait pas de déplacement du signal vers 336 nm. Étant donné que ce déplacement survient, on peut donc envisager qu'il y ait un blanchiment causé lors de l'incorporation de la sonde à l'intérieur des micelles d'EPS. Une autre possibilité vient du fait que le pyrène est une molécule aromatique et qu'elle pourrait interagir avec les EPS. Cependant, dans cette étude, le pyrène est utilisé comme sonde, il faudrait alors faire d'autres études avec des molécules aromatiques différentes pour constater si une quelconque interaction peut survenir.

La théorie des micelles ayant été avancée, il était envisagé de vérifier si les EPS pouvaient servir de transporteur et modifier le profil pharmacocinétique de molécules dans le sang suite au dosage (administration *p.o.*). Pour débiter ce genre d'expérimentation, des sondes fluorescentes ont été employées, plutôt que des sondes radioactives ou des médicaments, afin d'avoir un marqueur dont la méthode de détection était simple et rapide à suivre.

Une première approche a été d'utiliser une sonde fluorescente pouvant aisément traverser la barrière épithéliale du tractus intestinal. La fluorescéine s'y prêtait bien. Cette molécule passe rapidement en circulation sanguine, en raison de son absorption dès son passage dans l'estomac, et est rapidement éliminée par la filtration rénale [114]. L'intérêt était d'observer la modification d'au moins un paramètre dans la pharmacocinétique de la fluorescéine circulante dans le sang. Dans des domaines où les taux de mortalité sont élevés comme pour le cancer, l'amélioration, aussi mineure soit-elle, de la cinétique du transport de substances anticancéreuses peuvent représenter un écart satisfaisant dans le traitement de la maladie.

Les variations du nombre d'animaux dans les différents groupes viennent du fait que les graphiques et tableaux présentés proviennent de la compilation de



plusieurs expériences. Les premières expériences étaient effectuées avec moins d'animaux pour permettre l'adaptation aux techniques utilisées sur les rats pour les cinétiques. Le but de ce projet se voulant exploratoire, différentes concentrations ont été testées aux détriments d'autres, donc le nombre d'animaux ne reste pas nécessairement le même entre les différents groupes pour une même sonde.

Ainsi, si on se rapporte aux résultats obtenus, les groupes EPS 1% et 5%, ont une aire sous la courbe (AUC) plus élevée par rapport au groupe Eau. L'apparence visqueuse de la formulation d'EPS 5%/FL peut en être la cause, libérant de façon plus graduelle la fluorescéine encapsulée. Cependant, pour le groupe EPS 1% / FL, la viscosité est moins importante et justifie moins bien cette augmentation. La formulation EPS 5%/FL affiche aussi une concentration maximale plasmatique augmentée et un temps de demi-vie qui se déplace vers la droite de l'axe. Nous pouvons alors penser que cette formulation, outre de pouvoir potentiellement retarder l'entrée de la fluorescéine dans la circulation sanguine, pourrait traverser dans le plasma avec les molécules de fluorescéine. Une telle hypothèse peut être avancée puisque des paramètres cinétiques plasmatiques « intrinsèques » (e.g.  $t_{1/2}$ ) apparaissent affectés et que les courbes de distribution graphiques sont différentes de celles du groupe Eau. Dans le cas où un médicament est relargué plus lentement ou que son absorption est améliorée, le  $T_{max}$  et le  $C_{max}$  sont effectivement affectés, cependant, la courbe de distribution serait équivalente à celle du groupe contrôle. Un médicament qui entre en circulation sans son transporteur est éliminé à la même vitesse peu importe le véhicule, sauf dans le cas où le véhicule pénètre en association avec le médicament dans la circulation sanguine et interfère avec la distribution normale du médicament. Il en est de même pour le temps de demi-vie d'un médicament. Le temps de demi-vie demeure le même à moins de l'interférence d'un transporteur ou d'une association quelconque qui ne pourrait pas avoir lieu dans le groupe contrôle.

D'un autre côté, le groupe FL formulé à 1% d'EPS permet d'améliorer la concentration maximale, cependant le temps de demi-vie semble diminuer. Encore une fois, la courbe de distribution suit la même tendance que celle de

la formulation de FL formulé à 5% d'EPS tout en étant différente de celle du groupe contrôle. Il est donc plausible de croire que le transporteur affecte la distribution plasmatique par sa présence au niveau de la circulation systémique. Cette formulation pourrait accélérer l'élimination du composé.

Les autres formulations affectent moins les paramètres cinétiques. Cependant, il ne faut pas les négliger pour autant. La concentration maximale est la même que celle du groupe Eau dans des marges d'erreur respectables. Les valeurs obtenues lors du traitement des données dans le logiciel WinNonLin présentent des modifications au niveau des paramètres de demi-vie. Cependant ces différences sont difficiles à évaluer sur les graphiques et nous nous gardons de mettre les valeurs quantitatives obtenues en appui. Cependant, la tendance demeure et il se pourrait qu'à des concentrations plus faibles (0,1% et 0,5%) les EPS transitent encore dans la circulation plasmatique et qu'ils puissent y interagir avec la sonde.

Il faut mentionner que le groupe Eau affiche une phase de distribution et d'élimination particulière dans cette compilation. Cependant, les graphiques des diverses expériences pris séparément ne montrent pas cette tendance d'une façon aussi prononcée. Dans les expériences précédentes, les formulations d'EPS / FL ont affiché des courbes de distribution (D) et d'élimination (E) différentes du groupe Eau, alors que ce dernier avait une phase (D) et (E) linéaire. Cette observation était valable pour les cinétiques effectuées sur des rats pour une première expérience. Cependant, les mêmes animaux ont été utilisés une seconde fois, deux semaines après, pour reprendre les mêmes cinétiques. Le délai de deux semaines avait pour but de permettre l'élimination des molécules fluorescentes résiduelles et permettre à l'hématocrite des animaux de se rééquilibrer. Lors de la reprise des cinétiques, l'hypothèse que les EPS puissent passer en circulation et modifier les pharmacocinétiques n'avait pas été soulevée. L'élimination des EPS pouvait ainsi être plus longue que celle des molécules de fluorescéine et donc affecter les résultats obtenus lors de la deuxième pharmacocinétique. En observant que les taux de fluorescéine doubleraient lors de la deuxième pharmacocinétique aux mêmes concentrations d'EPS et de FL, nous avons réalisé la possibilité que les EPS pouvaient passer en circulation et n'étaient

soit pas éliminés ou avaient produit un effet au niveau de l'absorption de molécules via la barrière épithéliale. Les rats ont été randomisés en fonction de leur poids, afin d'équilibrer les groupes, autant lors de la première que de la deuxième pharmacocinétique. Étant donné que cette étape ait été réalisée au hasard entre tous les groupes, le groupe Eau de la deuxième pharmacocinétique possédait probablement des individus ayant déjà été mis en contact avec les EPS. Ceci pourrait donc être une explication à l'augmentation des courbes (D) et (E) du groupe Eau lors de la deuxième pharmacocinétique.

L'utilisation de la rhodamine 123 comme deuxième sonde avait pour but d'observer si les formulations d'EPS avaient un effet sur les P-gp. La R123 est un substrat de la P-gp et étant donné que le transit de plusieurs médicaments anticancéreux est affecté par cette protéine régulatrice, il était opportun de vérifier l'effet des EPS par rapport à ce système. Nous n'avons cependant pas conservé les mêmes concentrations d'EPS que lors de l'expérience utilisant la fluorescéine. La raison était que les formulations à 5% (p/v) nécessitaient trop d'EPS et que ceux-ci avaient tendance à précipiter à cette concentration. Nous avons donc réduit la concentration d'EPS, dans la formulation, à 3% (p/v) afin de s'assurer de ne pas avoir de précipité dans la solution.

La concentration maximale est affectée dans les deux formulations (EPS 1% / R123 et EPS 3% / R1233) et l'AUC tend à augmenter. Cela indique que les EPS pourraient améliorer le transport de la R123 vers la circulation systémique. L'analyse par logiciel a aussi révélé une augmentation pour le paramètre de demi-vie, il serait donc envisageable que les EPS, dans ce cas aussi, puissent passer en circulation systémique. Cela ne veut pas nécessairement dire que les EPS agissent sur les P-gp directement, mais ils pourraient plutôt permettre à la R123 de passer dans le sang par une route différente. Il est possible aussi que les EPS protègent la molécule active et limitent la présentation du substrat aux P-gp. Cependant, les cinétiques étant non-linéaires et difficilement analysables avec ce genre de logiciel, nous gardons une certaine réserve quant aux valeurs quantitatives obtenues, autant pour la fluorescéine que pour la rhodamine 123. Par contre, les tendances demeurent et nous permettent d'avancer ces hypothèses qui devront être

vérifiées par d'autres techniques ou par l'utilisation d'un programme d'analyse bâti sur mesure.

Les EPS issus du consortium demeurent un mélange majoritairement composé de kéfiran et les modifications observées dans les pharmacocinétiques peuvent être liées à d'autres éléments actifs dans le mélange. Les étapes subséquentes de pharmacocinétiques devront s'effectuer par administration *i.v.* des formulations. Cela permettra de vérifier la théorie de la distribution du médicament. Tout comme mentionné précédemment, si les EPS n'interfèrent en rien dans la distribution plasmatique de la sonde, alors les profils *i.v.* des marqueurs devraient être les mêmes pour le groupe contrôle que pour les formulations. Cependant, si les EPS ont un effet, les courbes de distribution et d'élimination des formulations ressembleront à celles obtenues par gavage. Éventuellement, une méthode de marquage des EPS qui n'interférerait en rien avec leurs propriétés fonctionnelles et physico-chimiques pourrait permettre de confirmer les observations de Murofushi et collaborateurs (1986) [8], affirmant le passage des EPS en circulation, et ainsi de suivre la formulation médicamenteuse dans un organisme.

Suite aux cinétiques, nous avons procédé à l'évaluation du potentiel synergistique de nos EPS. Étant donné le potentiel des EPS de former des micelles, la présentation du médicament à la cellule pourrait être modifiée et son efficacité accrue à dose égale. L'effet antitumoral des EPS relevé dans la littérature [2] pourrait aussi avoir un effet additif sur l'effet thérapeutique du médicament. Les premières expériences *in vitro* ont été effectuées sur une lignée cellulaire tumorale à croissance rapide, soit les B16F10. Ces cellules sont issues de mélanomes de la peau et puisqu'elles seraient utilisées dans un modèle de cancer du côlon à court terme dans une étude subséquente, des tests préliminaires *in vitro* ont été effectués. Le choix du 5FU comme médicament reste tout de même de circonstance avec ces cellules puisque le 5FU est utilisé en traitement topique pour les mélanomes de la peau chez l'humain. Le 5FU est un médicament à effet relativement lent étant donné qu'il crée des interruptions dans la synthèse d'ADN lors de la réplication de la cellule. La vitesse de réplication de ces cellules étant rapide, l'effet du médicament est

plus rapide que sur des cellules saines. Dès l'utilisation de la dose la plus faible (0,5µg/ml), l'effet cytotoxique est d'importance. La formulation de 5FU/EPS permet d'augmenter le taux de cytotoxicité de 20% environ au-delà de l'effet du 5FU seul. La culture des B16F10 étant effectuée en culture simple, donc sans présence de cellules immunitaires, on peut avancer l'hypothèse que les EPS ont un effet synergique, soit un effet global plus grand que la somme des effets isolés, indépendamment des systèmes de défense innée de l'hôte. Aucun recrutement de cellules immunitaires dans ce cas n'est responsable de l'amplification de la réponse obtenue.

Dans le cas des cellules CaCo-2, les résultats attendus devaient être moins évidents, que lors de l'utilisation de la lignée B16F10, en raison de la vitesse de croissance de ces cellules et du fait qu'elles possèdent en grande partie les mécanismes de défense des cellules intestinales soit les MRP et les MDR [9]. Le choix de ces cellules, outre le fait qu'elles possèdent plusieurs mécanismes encore actifs, réside dans le fait qu'elles sont celles qui miment le plus un modèle intestinal humain et que les recherches sur les EPS utilisés se font dans une perspective d'administration par voie orale. De 0,5µg/ml à 100µg/ml, la survie des cellules a diminué d'une façon graduelle. L'augmentation de la toxicité sur les cellules en fonction de la concentration peut être due au fait que les CaCo-2 prolifèrent à un rythme plus lent que les B16F10. Ainsi, le médicament a un effet moins rapide, causant la nécessité de doses plus élevées afin d'atteindre un seuil de toxicité plateau. Encore une fois, la formulation 5FU/EPS a permis d'augmenter la réponse thérapeutique du 5FU au-delà du médicament seul. Nous avons aussi laissé les cellules croître jusqu'à leur différenciation dans l'optique d'obtenir un épithélium intestinal complet. Le but de cette expérimentation était d'avoir un épithélium intestinal *in vitro* se rapprochant le plus possible d'un épithélium sain afin d'évaluer si les EPS seuls ou en formulation pouvaient affecter les cellules saines bordant les cellules cancéreuses dans l'éventualité d'un essai sur modèle animal. Les EPS seuls ou formulés au médicament n'ont eu que peu ou pas d'effet, tout comme le 5FU seul. Ces expérimentations nous permettraient donc d'avancer que les doses d'EPS ou de médicaments utilisées n'ont que très peu d'effets toxiques sur les cellules en faible prolifération. Étant donné que les cellules tumorales

sont nécessairement bordées de cellules saines, on pourrait s'attendre à ce que les cellules saines, qui se divisent à un rythme lent, ne subissent pas d'effets toxiques de l'envergure de ceux que des cellules tumorales pourraient subir en raison du taux de division accru de ces dernières. Le modèle de cellules CaCo-2 reste néanmoins un outil pour nous permettre d'avancer cette hypothèse, car bien que différenciées, ces cellules demeurent cancéreuses. Nous pourrions donc nous attendre à ce qu'un épithélium sain réagisse de la même façon que lors de cet essai ou mieux encore.

Enfin, l'évaluation du potentiel des EPS comme transporteur a été expérimentée sur des modèles vivants, soit de rongeurs. Le modèle vivant est d'autant plus complexe qu'il peut modifier les réponses observées *in vitro* et mesurer l'apport du système immunitaire.

La première approche sur modèle animal a constitué en une approche *ex vivo*. Le but de cet exercice était de confirmer l'effet cytotoxique des EPS tout en se rapprochant d'un modèle vivant. L'essai a été une fois de plus réalisé sur les cellules B16F10. Étant donné leur taux de prolifération rapide, ces cellules sont plus sujettes à la médication, mais ont aussi tendance à être des cellules réfractaires dont l'élimination peut représenter quelques difficultés. Ainsi, si les formulations d'EPS et de médicaments sont efficaces, l'effet cytotoxique devrait être évident. C'est ce qui a été observé en utilisant le paclitaxel comme agent thérapeutique. Le paclitaxel est un médicament agissant très rapidement au niveau du cytosquelette des cellules. Les cellules tumorales traitées avec le paclitaxel seul ou en formulation avec le EPS ont toutes démontré un arrêt de prolifération et une mort cellulaire *in vitro*. Malgré le fait de rincer les cellules et de mettre du milieu frais ou de trypsiniser les cellules et de les remettre en culture dans du milieu frais n'a changé en rien l'état des cellules exposées trois heures aux différentes thérapies. Aucune reprise de croissance n'a été observée. En procédant par une technique *ex vivo*, l'idée était de récupérer ces cellules et de les injecter dans le muscle de la patte de la souris C57BL/6. Les muscles constituent des bio-réacteurs exceptionnels et ce genre d'environnement rassemble les meilleures conditions physiologiques pour permettre à des cellules en instance de mort de récupérer

et de provoquer des récives chez les patients. La formulation à base d'EPS / paclitaxel permet donc de constater un effet cytotoxique amélioré sur les cellules tumorales contrairement au paclitaxel non-formulé. Seulement 7% des souris ont affiché la présence de tumeurs dans le groupe EPS / paclitaxel après 14 jours comparativement à 80% dans le groupe traité au paclitaxel non-formulé.

Le paclitaxel est reconnu pour être très peu soluble dans des solvants aqueux. L'utilisation de solvants du type DMSO est normalement nécessaire. Dans le cas de la formulation avec les EPS, nous avons utilisé ces derniers en solution comme solvant pour le médicament. Le résultat a été des plus intéressants, les EPS créant une dispersion nuageuse du médicament alors que normalement dans l'eau, le paclitaxel se retrouve sous la forme d'un précipité. Cette expérience permet donc de constater que les EPS ont permis l'obtention d'un effet cytotoxique accru, possiblement par l'amélioration de la présentation du paclitaxel aux cellules. L'hypothèse de la formation de micelles ayant encapsulé le médicament et permis une meilleure entrée du paclitaxel au sein de la cellule peut être avancée mais reste à vérifier. Cet essai a aussi permis de constater que les EPS ont un potentiel à agir comme agent solubilisant de médicaments à faible solubilité.

Enfin, comme deuxième approche, un modèle murin a été utilisé *in vivo*. L'utilisation d'un modèle murin par injection intrapéritonéale avait pour but de mimer un cancer agressif autour des intestins de l'animal. Les cellules tumorales dans ce genre d'essai ont tendance à s'attacher à la séreuse des intestins et cela constitue une façon de vérifier, à court terme, l'effet possible de formulations anticancéreuses. Les résultats ont permis de constater que les EPS avaient un effet lorsque administrés seuls. Leur effet était cependant plus important pour une période d'une quinzaine de jours lorsque formulés avec le SFU. Ces résultats ont ultérieurement été reproduits lors d'un deuxième essai utilisant un nouveau lot d'EPS (NBE3). Le lot NBE3 provient d'un lot de grains de kéfir différent des lots NBE2 et NBE4. Les conditions de culture du kéfir de départ peuvent avoir modifié les sucres produits ou en avoir modifié les proportions. Comme on pouvait le constater dans le tableau 4, le rendement du lot NBE3 est plus faible en comparaison aux deux autres lots.

La reproductibilité des méthodes de fermentation pour l'obtention du kéfir est donc nécessaire afin de conserver des EPS aux propriétés constantes.

Certains groupes expérimentaux ont été rajoutés dans les expériences de survie. L'utilisation d'EPS de souche pure, *L.kefiranofaciens* Inix, isolée des grains de kéfir de la présente étude, semble démontrer et confirmer les observations relevées dans la littérature soit l'effet antitumoral des EPS. L'effet des EPS de la souche pure, semble aussi être lié à une activation du système immunitaire étant donné l'hypertrophie de la rate observé lors de nécropsies réalisées à la fin des expériences sur des individus qui avaient survécu. Cette observation irait dans le même sens que les observations de Shiomi et collaborateurs (1982) [2] qui affirmaient par des tests *in vitro* que les EPS provenant de leur souche *L.kefiranofaciens* agiraient probablement via l'activation des défenses immunitaires de l'hôte.

Il reste cependant beaucoup d'évaluations à faire dans les modèles vivants. La première étant d'utiliser des souris syngéniques aux cellules tumorales injectées, soit des C57BL/6 dans le cas de l'utilisation de cellules B16F10. Les effets des formulations de EPS peuvent avoir été affectés par un effet de rejet des cellules B16F10 par les souris Balb/c bien que le phénomène aurait été relativement le même dans tous les groupes. Des expériences préliminaires ont été entreprises sur des souris C57BL/6. Cependant, ces cellules tumorales sont beaucoup plus agressives chez ces souris ne laissant aucunement le temps au traitement d'agir. La nécessité d'ajuster la quantité de cellules B16F10 injectées est donc essentielle pour évaluer l'efficacité de nos formulations.



## CONCLUSION

Beaucoup de possibilités sont offertes dans l'exploration du potentiel des EPS et non seulement pour ceux des grains de kéfir mais aussi pour une panoplie d'EPS issus des LABs. L'ensemble de ce projet a permis d'ouvrir une voie inexplorée dans l'utilisation des EPS. En dehors de leur attrait pour l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique est au nombre de celles qui portent un intérêt grandissant aux EPS. Leur potentiel de transporteur pourra donc leur permettre de se frayer un chemin aux côtés des polymères synthétiques. Leur mode de fonctionnement reste encore à clarifier, bien que, chose étonnante, il n'existe aucun transporteur polymérique dont le mécanisme n'ait été élucidé malgré des études beaucoup plus poussées et financées. Les EPS revêtissent des caractéristiques propres qui pourraient être exploitées dans le but d'identifier leur fonctionnement.

Dans une optique de cancer, beaucoup reste aussi à faire. Il existe d'autres modèles qui devront être testés. L'injection sous-cutanée de cellules tumorales et l'administration de traitements oraux est encore rarement à l'essai avec des formulations d'EPS. Cette méthode permettra de mesurer la progression des tumeurs dans le temps en fonction des traitements utilisés. Il y a aussi les modèles de second plan, dans l'évaluation d'une formulation efficace, qui constituent des approches intéressantes. Ceux-ci sont aussi effectués sur des rongeurs. Ces modèles sont cependant fastidieux et long, nécessitant l'instauration du cancer par injection d'agents chimiques dans l'intestin et l'ingestion de diètes hautes en gras. L'expérience prend en général de 8 à 10 mois. Un autre modèle, cette fois-ci sur des souris, émerge peu à peu et prend beaucoup d'importance. Il s'agit des souris APC<sup>min</sup> qui possèdent une délétion du gène de la polypose adénomateuse responsable de l'apparition de polypes colorectaux. Il s'agit aussi d'un modèle coûteux, mais d'une durée plus courte d'environ 3 mois. Le volet d'agent solubilisant des EPS reste aussi à explorer. L'utilisation de polymères naturels pour améliorer la solubilité de médicaments est fort appréciable dans le domaine de la pharmacologie alors que bien souvent des suspensions complexes doivent être utilisées.

Bref, plusieurs avenues sont encore à approfondir. La première consiste évidemment à améliorer la caractérisation et la pureté de notre molécule d'intérêt pour pouvoir être plus en mesure d'obtenir des résultats hautement reproductibles. Une fermentation stable du consortium pourrait permettre d'aller chercher cette reproductibilité. Cette étude a néanmoins permis d'établir une preuve de concept, soit que les EPS peuvent former des micelles. Certaines pistes semblent indiquer leur potentiel à agir comme transporteurs tout en synergisant avec le médicament véhiculé. Il faut maintenant solidifier cette preuve de concept et ces hypothèses par des approches expérimentales et des modèles de tout genre. Le monde des transporteurs est en essor, particulièrement dans le domaine de la thérapie du cancer où les médicaments sont souvent peu solubles ou affectés par des mécanismes de protection. Les EPS offrent donc un potentiel à exploiter dans l'avancement des technologies dans la lutte contre le cancer.

## REMERCIEMENTS

À toi ma cocotte!

Pour ton support moral et chiropratique (et amoureux bien sûr!). Tous s'entendent bien pour dire que c'est pas toujours facile de vivre avec un roux. Merci de ta patience et de ton écoute (et un gros merci pour le ménage...).

À mes parents bien sûr, mes frères et leur marmaille. Même si vous ne compreniez rien (je tire tout de même mon chapeau à Ben pour avoir suivi autant!) merci de m'avoir écouté tant de fois répéter mes discours scientifiques incompréhensibles et d'être là pour me soutenir (étant le plus jeune, c'est quand même votre devoir!)

À mes amis, que ferait-on sans eux! Qu'ils soient à Sherbrooke en train de s'occuper de ma douce ou à Montréal pour me pomper le moral, ou à Ottawa on ne sait pas trop pourquoi, un gros merci! Que ce soit autour d'une bière en train de divaguer sur : À la bière fontaine... ou au sommet d'une montagne avec un vinier ou une bouteille de porto et du chocolat noir Djyeah! Je vous garde tout près de mon cœur!

Au Ultimate Frisbee, une passion qui est née pendant ma maîtrise, je ne peux le nier! Aux FREAK BEES, longue vie à notre équipe et à tous les tournois, internationaux je l'espère, dans lesquels nous aurons la chance de jouer et de faire des conneries.

Et enfin, merci à Claude et Pierre d'avoir supporté mon humour de Français pendant 2 ans et de m'avoir permis de faire de la recherche dans un domaine des plus intéressants dans leur équipe de travail qui je ne nommerai pas pour ne pas être exhaustif, mais je vous donne tous un gros bec pour votre aide.

Nicolas

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALONSO, M.J. (2004). Nanomedicines for overcoming biological barriers. Biomedical Pharmacotherapy 58, 168-72.
2. SHIOMI, M., *et al.* (1982). Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. Japanese Journal of Medical Sciences and Biology 35, 75-80.
3. LIU, J.R., *et al.* (2002). Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. Nutrition and cancer 44, 183-7.
4. MUROFUSHI, M., M. SHIOMI et K. AIBARA (1983). Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. Japanese journal of medical science & biology 36, 49-53.
5. DOCO, T., *et al.* (1990) Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. Carbohydrates Research. 198: 953-957.
6. ODA, M., *et al.* (1983) Antitumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. Agricultural and biological chemistry. 47: 1623-1625.
7. CHABOT, S., *et al.* (2001). Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-gamma mouse splenocytes. Le lait 81, 683-697.
8. MUROFUSHI, M., *et al.* (1986). Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. Immunopharmacology 12, 29-35.
9. MAHATO, R.I., *et al.* (2003). Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 20, 153-214.
10. BARDELMEIJER, H.A., *et al.* (2000). Increased oral bioavailability of paclitaxel by GF120918 in mice through selective modulation of P-glycoprotein. Clinical Cancer Research 6, 4416-21.
11. AHMED, T. et G.J. FUCHS (1997) Gastrointestinal allergy to food: a review. Journal of diarrhoeal diseases research. 15: 211-23.
12. CHOURASIA, M.K. et S.K. JAIN (2003). Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. Journal of Pharmacy and Pharmaceuticals Sciences 6, 33-66.

13. EISEMAN, J.L., *et al.* (1994). Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice. Cancer Chemotherapy and Pharmacology *34*, 465-71.
14. SPARREBOOM, A., *et al.* (1997). Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *94*, 2031-5.
15. MAKINO, M., *et al.* (2001). Comparative study between daily and 5-days-a-week administration of oral 5-fluorouracil chemotherapy in mice: determining the superior regimen. Cancer Chemotherapy and Pharmacology *48*, 370-4.
16. GUILLEMARD, V. et H.U. SARAGОВI (2004) Prodrug chemotherapeutics bypass p-glycoprotein resistance and kill tumors in vivo with high efficacy and target-dependent selectivity. Oncogene. *23*: 3613-3621.
17. FLORENCE, A.T. (1997). The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. Pharmacological Research *14*, 259-266.
18. BARATT, G. (2003) Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. Cellular and Molecular Life Sciences. *60*: 21-37.
19. GUYTON, K.Z., T.W. KENSLER et G.H. POSNER (2003). Vitamin D and vitamin D analogs as cancer chemopreventive agents. Nutrition Reviews *61*, 227-38.
20. CONRADI, R.A., *et al.* (1991). The influence of peptide structure on transport across Caco-2 cells. Pharmacological Research *8*, 1453-60.
21. PAPPENHEIMER, J.R. et K.Z. REISS (1987). Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. Journal of Membrane Biology *100*, 123-36.
22. MADARA, J.L. (1998). Regulation of the movement of solutes across tight junctions. Annual Reviews of Physiology *60*, 143-59.
23. SOOD, A. et R. PANCHAGNULA (2001) Peroral route: an opportunity for protein and peptide drug delivery. Chemical Reviews. *101*: 3275-303.
24. FERNANDEZ-LOPEZ, J.A., *et al.* (1992). In the rat, intestinal lymph carries a significant amount of ingested glucose into the bloodstream. Archives of Internal Physiology Biochemistry and Biophysics *100*, 231-6.

25. SICINSKI, P., *et al.* (1990). Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. Gastroenterology 98, 56-8.
26. KIYONO, H., *et al.* (1982). Murine Peyer's patch T cell clones. Characterization of antigen-specific helper T cells for immunoglobulin A responses. Journal of Experimental Medecine 156, 1115-30.
27. OWEN, R. et A. JONES (1974). Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. Gastroenterology 2, 189-203.
28. HILLERY, A.M., P.U. JANI et A.T. FLORENCE (1994). Comparative, quantitative study of lymphoid and non-lymphoid uptake of 60 nm polystyrene particles. Journal of Drug Targeting 2, 151-6.
29. GOTTESMAN, M.M. et I. PASTAN (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. Annual Reviews of Biochemistry 62, 385-427.
30. HUNTER, J., B.H. HIRST et N.L. SIMMONS (1993). Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. Pharmacological Research 10, 743-9.
31. LE FERREC, E., *et al.* In Vitro models of the intestinal barrier, in The report and recommendations of ECVAM workshop 46. ECVAM Rennes : 649-68.
32. HUNTER, J. et B.H. HIRST (1997). Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related efflux systems in limiting oral drug absorption. Advanced Drug Delivery Reviews, 25: 129-157.
33. JOLLY, L., *et al.* (2002). Exploiting expolysaccharides from lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 82, 367-74.
34. CECIL (1997). Traité de médecine interne, 20ième ed. (Paris, Médecine-Science Flammarion), pp. 2339.
35. (1992). Expectancy or primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: a randomized trial. International Journal of Clinical Oncology (Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group), pp. 904-11.
36. SCHEITHAUER, W., *et al.* (1993). Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. British Medical Journal 306, 752-5.

37. VAN CUTSEM, E., C. VERSLYPE et I. DEMEDTS (2002). The treatment of advanced colorectal cancer: where are we now and where do we go? Best practice & research. Clinical gastroenterology, 16: 319-30.
38. META-ANALYSIS (1992). Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. J Clinical Oncology 10, 896-903.
39. PILLAI, O. et R. PANCHAGNULA (2001). Polymers in drug delivery. Current opinion in chemical biology 5, 447-51.
40. MCINTYRE, P.B., *et al.* (1988). Balsalazide in the maintenance treatment of patients with ulcerative colitis, a double-blind comparison with sulphasalazine. Alimentary pharmacology & therapeutics 2, 237-43.
41. RUBINSTEIN, A. (1995). Approaches and opportunities in colon-specific drug delivery. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems 12, 101-49.
42. DAVIS, B.G. et M.A. ROBINSON (2002). Drug delivery systems based on sugar-macromolecule conjugates. Current opinion in drug discovery & development 5, 279-88.
43. STELLA, V.J. et R.A. RAJEWSKI (1997). Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. Pharmacological Research 14, 556-67.
44. HORSKY, J. et J. PITHA (1996). Hydroxypropyl cyclodextrins: potential synergism with carcinogens. Journal of pharmaceutical sciences 85, 96-100.
45. LIU, L., *et al.* (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. Biomaterials 24, 3333-43.
46. VAUQUELIN, M. (1790). Analyse du Tamarin. Annali di chimica, 92.
47. RINAUDO, M. (1996). Physicochemical properties of pectins in solution and gel states. In Pectin and Pectinases, V.A. Visser J, ed. (New York, Elsevier Sciences), pp. 21-35.
48. VANDAMME, T., *et al.* (2002). The use of polysaccharides to target drugs to the colon. Carbohydrate Polymers, 219-231.
49. MULHBACHER, J., *et al.* (2001). Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings. Journal of controlled release 76, 51-8.

50. NOBLE, L., *et al.* (1999). A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel. International Journal of Pharmaceutics 192, 173-82.
51. MARTIN, L., *et al.* (2002). The release of model macromolecules may be controlled by the hydrophobicity of palmitoyl glycol chitosan hydrogels. Journal of controlled release 80, 87-100.
52. NSEREKO, S. et M. AMIJI (2002). Localized delivery of paclitaxel in solid tumors from biodegradable chitin microparticle formulations. Biomaterials 23, 2723-31.
53. MACHIDA, Y. et T. NAGAI (1978). Application of hydroxypropyl cellulose to peroral controlled release dosage forms. Chemical & pharmaceutical bulletin (Tokyo) 26, 1652-8.
54. FRANCIS, M.F., M. PIREDDA et F.M. WINNIK (2003). Solubilization of poorly water soluble drugs in micelles of hydrophobically modified hydroxypropylcellulose copolymers. Journal of controlled release 93, 59-68.
55. ADAMS, M.L., A. LAVASANIFAR et G.S. KWON (2003). Amphiphilic block copolymers for drug delivery. Journal of pharmaceutical sciences 92, 1343-55.
56. ROWE, R.C., P.J. SHESKEY et P.J. WELLER, eds. (2003). Handbook of pharmaceutical excipients (American Pharmaceutical Association).
57. WORKING, P., *et al.* (1997). Safety of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene glycol) derivatives. Paper presented at: Poly(ethylene glycol) chemistry and biological applications (Washington, D.C., American Chemical Society).
58. LEE, J., H. LEE et J. ANDRADE (1995). Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. Progress in colloid & polymer science, 20: 1043-1079.
59. JEON, S., *et al.* (1991). Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory. Journal of colloid and interface science, 142: 149-158.
60. MOGHIMI, S.M., A.C. HUNTER et J.C. MURRAY (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. Pharmacological reviews, 53, 283-318.
61. DELGADO, C., G.E. FRANCIS et D. FISHER (1992). The uses and properties of PEG-linked proteins. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 9, 249-304.



62. MAEDA, H., *et al.* (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. Journal of controlled release *65*, 271-84.
63. HOBBS, S., *et al.* (1999). Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 4607-4612.
64. LI, Y. et G. KWON (2000). Methotrexate esters of poly(ethylene oxide)-block-poly(2-hydroxyethyl-L-aspartamide). I. Effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles and on drug release. Pharmacological Research, *17*, 607-611.
65. ADAMS, M.L. et G.S. KWON (2002). The effects of acyl chain length on the micelle properties of poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugates. Journal of biomaterials science. Polymer edition *13*, 991-1006.
66. ADAMS, M.L. et G.S. KWON (2003). Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: effects of acyl chain length. Journal of controlled release *87*, 23-32.
67. ANSETH, K.S., *et al.* (2002). In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery. Journal of controlled release *78*, 199-209.
68. ALLEN, C., *et al.* (1998). Polycaprolactone-b-poly(ethylene oxide) block copolymer micelles as a novel drug delivery vehicle for neurotrophic agents FK506 and L-685,818. Bioconjugate chemistry *9*, 564-72.
69. BURT, H., *et al.* (1999). Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, *16*: 161-171.
70. ALAKHOV, V., *et al.* (1996). Hypersensitization of multi-drug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 copolymer. Bioconjugate chemistry, *7*: 209-216.
71. VENNE, A., *et al.* (1996). Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. Cancer research *56*, 3626-9.
72. BATRAKOVA, E., *et al.* (1999). Fundamental relationships between the composition of pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells. Pharmacological Research *16*, 1373-9.

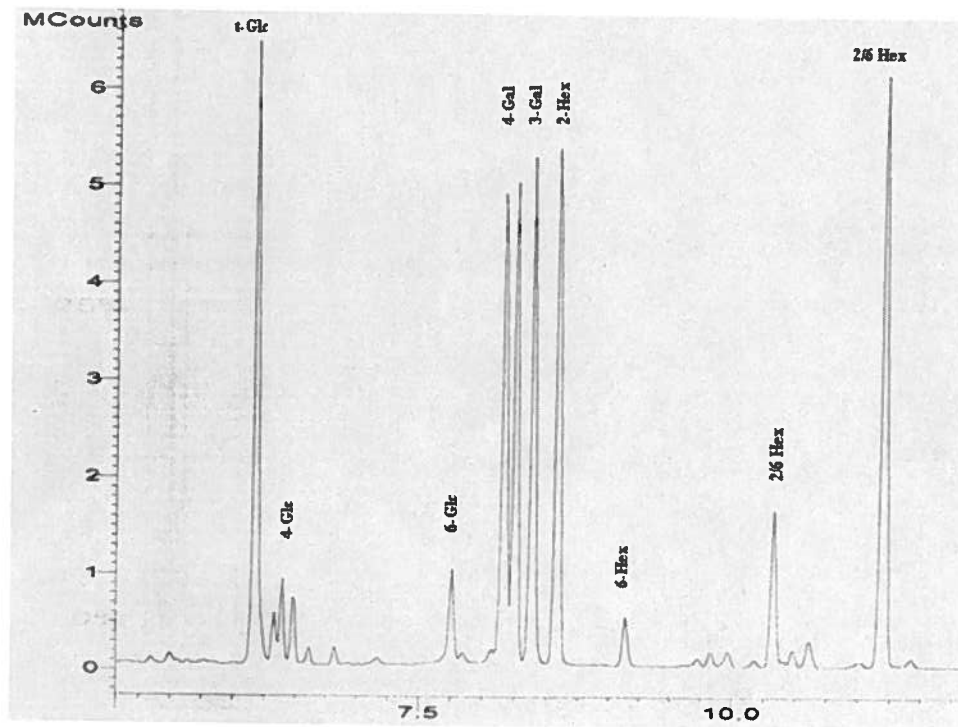
73. BATRAKOVA, E.V., *et al.* (2001). Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 299: 483-93.
74. CERNING, J., *et al.* (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Applied and environmental microbiology, 60: 3914-3919.
75. CERNING, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS microbiology reviews 7, 113-30.
76. SABATIE, J., *et al.* (1988). The effect of synthesis temperature on the structure of dextran NRRL B 512F. Carbohydrate Polymers, 9: 87-101.
77. SINHA, V.R. et R. KUMRIA (2001). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. International journal of pharmaceutics 224, 19-38.
78. DE VUYST, L. et B. DEGEEST (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS microbiology reviews 23, 153-77.
79. LAMOTHE, G.T., *et al.* (2002). Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Archives of microbiology 178, 218-28.
80. LOOIJESTEIJN, P.J., *et al.* (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. International journal of food microbiology 64, 71-80.
81. VAN CALSTEREN, M.R., *et al.* (2002). Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. The Biochemical journal 363, 7-17.
82. RICCIARDI A., C.F. (2000). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. Italian Journal of Food Sciences, 12: 22-45.
83. ARIHARA, K., T. TOBA et S. ADACHI (1990). Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Lactobacillus kefir* in kefir grains. International journal of food microbiology 11, 127-34.
84. FRENGOVA, G.I., *et al.* (2002). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences 57, 805-10.

85. SIMOVA, E., *et al.* (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. Journal of industrial microbiology & biotechnology 28, 1-6.
86. LA RIVIERE, J.W. et P. KOOIMAN (1967). Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. Archiv fur Mikrobiologie 59, 269-78.
87. DINIZ, R.O., *et al.* (2003). Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. Pharmacological research 47, 49-52.
88. FUJISAWA, T., *et al.* (1988). *Lactobacillus kefirifaciens* sp. nov. isolated from kefir grains. International journal of systematic bacteriology, 38: 12-14.
89. RIMADA, P.S. et A.G. ABRAHAM (2001). Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. J Dairy Res 68, 653-61.
90. MICHELI, L., *et al.* (1999). Isolation and characterisation of aropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. Applied microbiology and biotechnology 53, 69-74.
91. MACEDO, M.G., C. LACROIX et C.P. CHAMPAGNE (2002). Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a whey permeate based medium. Biotechnology progress 18, 167-73.
92. YOKOI, H., WATANABE, T., et FUJII, Y. (1990). Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains. Journal of dairy science, 73: 1684-1689.
93. MUKAI, T., *et al.* (1990). Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefirifaciens* K1. Carbohydrate research 204, 227-32.
94. TZIANABOS, A.O. (2000). Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. Clinical microbiology reviews 13, 523-33.
95. YAMAMOTO, S., T. YAMASITA et E. TSUBURA (1981). Invasive Metastasis, 1: 71-84.
96. SAKAGAMI, Y., *et al.* (1988). Effects of an anti-tumor polysaccharide, schizophyllan, on interferon-gamma and interleukin 2 production by peripheral blood mononuclear cells. Biochemical and biophysical research communications 155, 650-5

97. WASSER, S.P. et A.L. WEIS (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. Critical reviews in immunology 19, 65-96.
98. JIANG, J., *et al.* (2004). Ganoderma lucidum inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3. International journal of oncology 24, 1093-9.
99. KIM, H.S., S. KACEW et B.M. LEE (1999). In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (Aloe barbadensis miller, Lentinus edodes, Ganoderma lucidum and Coriolus versicolor). Carcinogenesis 20, 1637-40.
100. ZHANG, L. et I.R. TIZARD (1996). Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from Aloe vera gel. Immunopharmacology 35, 119-28.
101. MANNA, S. et B.H. MCANALLEY (1993). Determination of the position of the O-acetyl group in a beta-(1-->4)-mannan (acemannan) from Aloe barbardensis Miller. Carbohydrate Research 241, 317-9.
102. GRINDLAY, D. et T. REYNOLDS (1986). The Aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. Journal of Ethnopharmacology 16, 117-51.
103. CHINNAH, A.D., *et al.* (1992). Antigen dependent adjuvant activity of a polydispersed beta-(1,4)-linked acetylated mannan (acemannan). Vaccine 10, 551-7.
104. YOKOI, H., *et al.* (1991). Some taxonomical characteristics of encapsulated Lactobacillus sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. International journal of food microbiology 13, 257-64.
105. MANHART, N., *et al.* (2003). Influence of fructooligosaccharides on Peyer's patch lymphocyte numbers in healthy and endotoxemic mice. Nutrition 19, 657-60.
106. CAPEK, I. (2002). Fate of excited probes in micellar systems. Advances in colloid and interface science 97, 91-149.
107. SIROVICH, I., *et al.* (1999). Activity of ruboxyl, a nitroxyl derivative of daunorubicin, on experimental models of colorectal cancer metastases. Tumour Biology 20, 270-6.
108. GUPTA, M. et A.K. GUPTA (2004) In vitro cytotoxicity studies of hydrogel pullulan nanoparticles prepared by AOT/N-hexane micellar system. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences 7: 38-46.

109. PHAM, P.L., *et al.* (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. Applied and environmental microbiology 66, 2302-10.
110. MALOINE (1989). Dictionnaire des termes de médecine. 22 ième ed. (Paris, Garnier / Delamare) pp. 1031.
111. ROBERT (1991). Dictionnaire de la langue française, (Paris, Le Petit Robert) pp. 2171.
112. GODDARD, E. et F.M. WINNIK (1999). Fluorimetry: A useful tool in cosmetics research. Allured's Cosmetics and Toiletries 114, 63-82.
113. RANGARAJAN, B., L.S. COONS et A.B. SCRANTON (1996). Characterization of hydrogels using luminescence spectroscopy. Biomaterials 17, 649-61.
114. MATSUDA, K., *et al.* (1996). Effect of food intake on the delivery of fluorescein as a model drug in colon delivery capsule after oral administration to beagle dogs. Journal of Drug Targeting 4, 59-67.

## ANNEXES



Spectre de  $^1\text{H}$ -RMN des EPS NBE2. L'analyse a été effectuée par l'équipe du Dr. Michel Gilbert Ph.D. (CNRC, Ottawa).

## Milieux de culture utilisés

**Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (1X) liquid (high glucose)**

COMPONENTS	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	Molarity (mM)
<b>Amino Acids</b>			
Glycine	75	30	0,4
L-Alanyl-Glutamine	217	862	3,97
L-Arginine hydrochloride	211	84	0,398
L-Cystine	313	48	0,153
L-Histidine hydrochloride-H <sub>2</sub> O	210	42	0,2
L-Isoleucine	131	105	0,802
L-Leucine	131	105	0,802
L-Lysine hydrochloride	183	146	0,798
L-Methionine	149	30	0,201
L-Phenylalanine	165	66	0,4
L-Serine	105	42	0,4
L-Threonine	119	95	0,798
L-Tryptophan	204	16	0,0784
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	261	104	0,398
L-Valine	117	94	0,803
<b>Vitamins</b>			
Choline chloride	140	4	0,0286
D-Calcium pantothenate	477	4	0,00839
Folic Acid	441	4	0,00907
i-Inositol	180	7,2	0,04
Niacinamide	122	4	0,0328
Pyridoxal hydrochloride	204	4	0,0196
Riboflavin	376	0,4	0,00106
Thiamine hydrochloride	337	4	0,0119
<b>Inorganic Salts</b>			
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> ) (anhyd.)	111	200	1,8
Ferric Nitrate (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O)	404	0,1	0,000248
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) (anhyd.)	120	97,67	0,814
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5,33
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84	3700	44,05
Sodium Chloride (NaCl)	58	6400	110,34
Sodium Phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	138	125	0,906
<b>Other Components</b>			
D-Glucose (Dextrose)	180	4500	25
Phenol Red	376,4	15	0,0399

**Minimum Essential Medium (MEM) Alpha Medium (1X) liquid**

COMPONENTS	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	Molarity (mM)
<b>Amino Acids</b>			
Glycine	75	50	0,667
L-Alanine	89	25	0,281
L-Arginine	211	105	0,498
L-Asparagine-H <sub>2</sub> O	132	50	0,379
L-Aspartic acid	133	30	0,226
L-Cysteine hydrochloride-H <sub>2</sub> O	176	100	0,568
L-Cystine 2HCl	240	24	0,1
L-Glutamic Acid	147	75	0,51
L-Glutamine	146	292	2
L-Histidine	155	31	0,2
L-Isoleucine	131	52,4	0,4
L-Leucine	131	52	0,397
L-Lysine	146	58	0,397
L-Methionine	149	15	0,101
L-Phenylalanine	165	32	0,194
L-Proline	115	40	0,348
L-Serine	105	25	0,238
L-Threonine	119	48	0,403
L-Tryptophan	204	10	0,049
L-Tyrosine disodium salt	225	52	0,231
L-Valine	117	46	0,393
<b>Vitamins</b>			
Ascorbic Acid	176	50	0,284
Biotin	244	0,1	0,00041
Choline chloride	140	1	0,00714
D-Calcium pantothenate	477	1	0,0021
Folic Acid	441	1	0,00227
i-Inositol	180	2	0,0111
Niacinamide	122	1	0,0082
Pyridoxal hydrochloride	204	1	0,0049
Riboflavin	376	0,1	0,000266
Thiamine hydrochloride	337	1	0,00297
Vitamin B12	1355	1,36	0,001
<b>Inorganic Salts</b>			
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> ) (anhyd.)	111	200	1,8
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) (anhyd.)	120	97,67	0,814
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5,33
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84	2200	26,19
Sodium Chloride (NaCl)	58	6800	117,24
Sodium Phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O)	138	140	1,01
<b>Other Components</b>			
D-Glucose (Dextrose)	180	1000	5,56
Lipoic Acid	206	0,2	0,000971
Phenol Red	376,4	10	0,0266
Sodium Pyruvate	110	110	1





# PCT

## POWER OF ATTORNEY

(for an international application filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.4)

The undersigned applicant(s) (Names should be indicated as they appear in the request):

Nicolas Beaudet  
851 Chemin Brookbury  
Bury, Québec  
JOB 1J0, Canada

Claude Dupont  
7, rue de Fermont  
Blainville, Québec  
J7B 1L6, Canada

Pierre Lemieux  
97 Des Chênes  
Ste-Thérèse, Québec  
J7E 4Z2, Canada

hereby appoints (appoint) the following person as:  agent  common representative

### Name and address

(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

OGILVY RENAULT  
1981 McGill College Ave. - Suite 1600  
Montréal, Québec  
Canada H3A 2Y3

to represent the undersigned before  all the competent International Authorities  
 the International Searching Authority only  
 the International Preliminary Examining Authority only

in connection with the international application identified below:

Title of the invention: AN EXOPOLYSACCHARIDES DELIVERY SYSTEM FOR ACTIVE MOLECULES

Applicant's or agent's file reference: 15468-7 PCT VC

International application number (if already available):

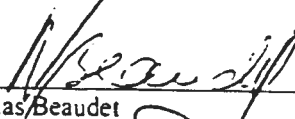
filed with the Canadian Patent Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

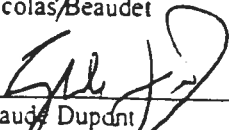
Signature of the applicant(s) (where there are several applicants, each of them must sign; next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs; if such capacity not obvious from reading the request or this power)

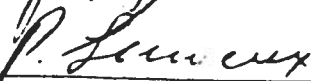
12/02/2004  
Date

12/02/2004  
Date

12/02/2004  
Date

  
Nicolas Beaudet

  
Claude Dupont

  
Pierre Lemieux

FEB 10 2004  
 PCT  
 7/8/9/10/11/12/1/2/3/4/5/6

**NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY**

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:  
  
 OGILVY RENAULT  
 Suite 1600  
 1981 McGill College Avenue  
 Montreal, Québec H3A 2Y3  
 Canada

Date of mailing (day/month/year) 30 January 2004 (30.01.2004)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 15468-7PCT ✓	International application No. PCT/CA2003/001899

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

TECHNOLOGIES BIOLACTIS INC. (for all designated States except US)  
 BEAUDET, Nicolas et al (for US)

International filing date : 04 December 2003 (04.12.2003)  
 Priority date(s) claimed : 04 December 2002 (04.12.2002)  
 Date of receipt of the record copy by the International Bureau : 21 January 2004 (21.01.2004)  
 List of designated Offices :

AP : BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW  
 EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM  
 EP : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR  
 OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG  
 National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

**ATTENTION**

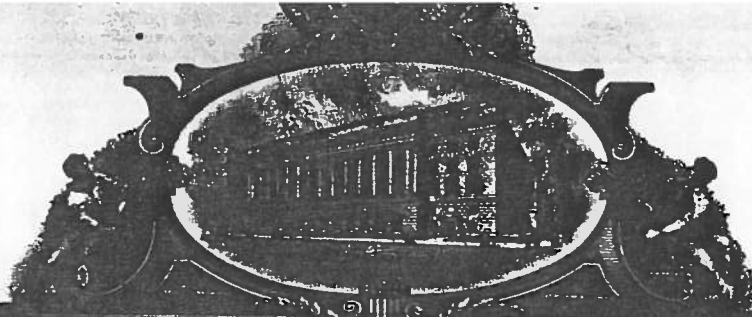
The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)
- confirmation of precautionary designations (if applicable)
- requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer:  Alexandre BOUVIER (Fax 338-8995)
Facsimile No. (41-22) 338.89.95	Telephone No. (41-22) 338 8765



**THE UNITED STATES OF AMERICA**

**TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:**

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE**

**United States Patent and Trademark Office**

**December 08, 2003**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

**APPLICATION NUMBER: 60/430,690**

**FILING DATE: December 04, 2002**



**By Authority of the  
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**

*H. L. Jackson*  
**H. L. JACKSON**  
**Certifying Officer**