AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I
2009

UFR de Pharmacie

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée et soutenue publiquement le **4 Novembre 2009**

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

Mention « Pharmacologie »

Par **Lucie JAVOT**

ETUDES *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE DEUX HEPARINES DE BAS POIDS MOLECULAIRE MICROENCAPSULEES DE RAPPORTS ANTI-Xa/ANTI-IIa DIFFERENTS : LA NADROPARINE ET LA TINZAPARINE

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs

Professeur O. CHAMBIN (Faculté de Pharmacie, Dijon)

Professeur A. LAMPRECHT (Faculté de Pharmacie, Besançon)

Juges

Professeur M. RABISKOVA (Faculté de Pharmacie, Brno)

Professeur T. LECOMPTE, co-directeur de thèse (Faculté de Médecine, Nancy)

Professeur P. MAINCENT, directeur de thèse (Faculté de Pharmacie, Nancy)

Professeur D. WAHL (Faculté de Médecine, Nancy)

Laboratoire de Pharmacie Galénique, EA 3452

Faculté de Pharmacie

5 rue Albert Lebrun, 54 000 Nancy

En mémoire de Nathalie.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Pharmacie Galénique de la faculté de Nancy sous la direction du Professeur Philippe MAINCENT et du Professeur Thomas LECOMPTE. Je tiens à adresser mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidée au cours de sa réalisation, et à ceux qui m'ont fait l'honneur d'en être les juges.

à Monsieur le Professeur Philippe MAINCENT, qui m'a accueillie de façon cordiale dans son laboratoire et qui a guidé mon travail. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a témoignée ainsi que pour son soutien au cours de ces années.

à monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE qui a accepté de co-diriger cette thèse. Je le remercie pour les connaissances pointues qu'il a su m'apporter en hématologie ainsi que pour nos discussions animées et toujours enrichissantes.

à Madame le Professeur Odile CHAMBIN et Monsieur le Professeur Alf LAMPRECHT, qui me font l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

à Madame le Professeur Mila RABISKOVA, pour sa sympathie, sa générosité et ses grandes qualités humaines. Ses conseils avisés ainsi que son aide, précieuse, m'ont permis d'avancer dans les moments de doute.

à Monsieur le Professeur Denis WAHL qui me fait l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail.

à Madame le Docteur Anne SAPIN-MINET, pour m'avoir initiée à la culture cellulaire et transmit ses connaissances dans ce domaine.

à Monsieur le Professeur Claude VIGNERON, pour sa grande disponibilité et ses encouragements.

à Madame Pascale CARNET, pour son efficacité inégalable ainsi que pour sa gentillesse et sa bienveillance.

A Madame le Professeur Yvette POURCELOT, qui a su me donner goût à la Pharmacie Galénique. Je la remercie pour son enthousiasme et sa joie de vivre.

à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au laboratoire pendant toutes ces années et qui sont devenues des amis, nous avons partagé beaucoup de bons moments ensemble que je n'oublierai pas.

à mes deux complices galénistes Javier et Julien, avec lesquels nous formons un trio soudé. Leur présence au quotidien va assurément me manquer et je les remercie pour leurs encouragements, leur soutien et tout ce qu'ils ont fait pour moi. Je leur adresse toute mon amitié et pour Julien, plus spécialement mon affection.

à ma famille et en particulier mes parents qui ont toujours cru en moi et qui ont été présents à tous les instants. Simplement merci pour tout.

Enfin, au moment où ce travail se termine, toutes mes pensées vont à Madame le Docteur Nathalie UBRICH, l'initiatrice de ce projet, disparue prématurément. Je la remercie du fond du cœur pour tout ce qu'elle m'a appris aussi bien sur le plan du travail que sur le plan humain. Elle restera à jamais pour moi un modèle de courage, de persévérance, d'optimisme et de vie. Je veux lui dédier cette thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

1. Hémostase et thrombose 6

1.1. Différents acteurs de l'hémostase 7

1.1.1. Facteurs de la coagulation 7

1.1.2. Inhibiteurs physiologiques de la coagulation 9

1.1.3. Facteur tissulaire 9

1.1.4. Paroi vasculaire et cellule endothéliale 10

1.1.5. Plaquettes 10

1.1.6. Facteur von willebrand 11

1.2. Hémostase primaire 12

1.3. Coagulation 14

1.3.1. Voie extrinsèque 15

1.3.2. Voie intrinsèque 17

1.3.3. Génération de fibrine insoluble 17

1.4. Fibrinolyse 19

1.5. Mécanismes de régulation de la cascade de coagulation 20

1.5.1. Complexe thrombine-thrombomoduline 20

1.5.2. Protéine C activée 20

1.5.3. Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire 20

1.5.4. Cofacteur II de l'héparine (HCII) 21

1.5.5. Antithrombine 21

1.6 Thrombose 24

1.6.1. Thrombose veineuse et thrombose artérielle 24

1.6.2. traitements anticoagulants 25
2. L'héparine, un mélange hétérogène de molécules 26
2.1. Historique de la découverte de l'héparine 26
2.2. Obtention de l'héparine 26
2.2.1. Généralités 26
2.2.2. Méthodes de dépolymérisation 27
2.3 Structure des chaines d'héparines 28
2.3.1. Héparine, une molécule de la famille des glycosaminoglycanes 28
2.3.2. Structure de base : le disaccharide 29
2.3.4. Domaine T et domaine C 31
2.4 Mécanisme d'action des heparines sur la cascade de la coagulation 31
2.4.1. Inhibition du facteur Xa 31
2.4.2. Inhibition du facteur IIa 32
2.5. Classification des chaines d'héparine en fonction de leur activité biologique 34
2.6. Caractéristiques physicochimiques des chaines d'héparine 37
2.6.1. Méthodes de dépolymérisation et fractions de masse moléculaire 37
2.6.2. Masse moléculaire moyenne et indice de polydispersité 38
2.6.3. pKa 39
2.6.4. Charge, solubilité, et degré de sulfatation 39
2.7. Evaluation de l'activité des héparines 41
2.7.1. Mesure des temps de coagulation 41
2.7.2. Mesure d'activite des facteurs Xa et IIa 42
2.8. Pharmacologie et pharmacocinétique des héparines 44
2.8.1. Liaison aux protéines plasmatiques 44
2.8.2. Clairance et demi-vie 45
2.8.3. Volume de distribution 47
2.8.4. C_{max}, T_{max}, aire sous courbe et biodisponibilité 47

3. Administration de l'héparine par voie orale 50

3.1. Les premiers travaux : mise en évidence du passage intestinal de l'héparine 51

3.2. Systèmes permettant d'augmenter l'absorption des héparines 52

3.2.1. Promoteurs d'absorption 53

3.2.2. Formes galeniques 77

4. Etude de l'absorption des héparines 85

4.1. Généralités sur les mécanismes d'absorption 86

4.1.1. Physiologie de l'intestin 86

4.1.2. Rôle de barrière de l'intestin 90

4.1.3. Différentes voies de passage possible 101

4.2. Modèles d'étude du passage des xenobiotiques au niveau intestinal 105

4.2.1. Biodisponibilité, fraction de dose absorbée et perméabilité 105

4.2.2. Description des modéles 106

4.3. Etude des mécanismes de passage sur un modèle de culture cellulaire : aspects pratiques 115

4.3.1. Verification de l'intégrité d'un épithélium de cellules 116

4.3.2. Détermination de la perméabilité 118

4.3.3. Elucidation des mécanismes de passage d'une substance active 118

4.3.4. Influence des conditions d'étude sur les résultats 121

4.4. Perméabilité et mécanismes de passages intestinaux de l'héparine 123

4.4.1. Modèle tissulaire 123

4.4.2. Modèle cellulaire 129

TRAVAIL EXPERIMENTAL 139

PUBLICATION I 140

PUBLICATION II 163

DISCUSSION GENERALE 191

1. Etude *in vitro* 194

1.1 Etude de la taille des microparticules 195

1.2 Taux d'encapsulation 196

1.2.1 Considérations sur les activités anti-Xa et anti-IIa 196

1.2.2 Observations 197

1.3 Cinétiques de libération 201

2 Etude *in vivo* 208

2.1. Activités anti-Xa et anti-IIa *in vivo* suite à l'administration orale de microparticules de nadroparine 209

2.2. Causes de l'absence de résultats *in vivo* pour certaines formulations 215

3. Etudes de passage 216

3.1. Passage tissulaire 216

3.1.1. Méthodologie de l'étude 217

3.1.2. Résultats 218

3.2. Passage cellulaire 220

3.2.1. Etudes de cytotoxicité 221

3.2.2. Etude de passage sur inserts de type Transweel® 223

4. Etudes de stabilité 233

4.1. Méthodologie et but de l'étude 233

4.2. Résultats et discussion 234

CONCLUSION 237

ANNEXES 240

BIBLIOGRAPHIE 254

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des protéines de la coagulation..... 8
Tableau 2 : Caractéristiques physicochimiques et caractéristiques d'activité des héparines..40
Tableau 3 : Caractéristiques pharmacocinétiques des héparines. 49
Tableau 4 : Caractéristiques pharmacodynamiques d'une HNF administrée à l'homme par voie orale en présence de SNAC. 61
Tableau 5 : Récapitulatif des résultats *in vivo* des principaux systèmes d'administration orale des héparines. 82
Tableau 6 : Principaux paramètres biologiques et physiques du tractus intestinal humain.... 86
Tableau 7 : Synthèse des études ayant évalué le passage intestinal de microparticules. 102
Tableau 8 : Exemple d'agents pharmacologiques utilisés pour l'étude des mécanismes de passage de molécules sur des modèles d'épithélium issus de la culture cellulaire. 120
Tableau 9 : Récapitulatif des résultats des études de passage (*in vitro* et *ex vivo*) de l'héparine au sein de systèmes d'administration par voie orale. 138
Tableau 10 : Effets de la microencapsulation de la tinzaparine et de la nadroparine sur leurs activités anti-Xa, anti-IIa et sur le rapport anti-Xa/anti-IIa. 199
Tableau 11 : Perméabilité apparente des activités anti-Xa et anti-IIa de la nadroparine sur un épithélium de cellules Caco-2 229
Tableau 12 : Caractéristiques physico-chimiques des microparticules de nadroparine fabriquées en utilisant du PEG en phase interne. 241
Tableau 13 : Paramètres pharmacocinétiques obtenus suite à l'administration orale de microparticules de nadroparine (à la dose de 600 unités anti-Xa/kg) ou suite à l'injection sous-cutanée de la solution commerciale de nadroparine (à la dose de 150 unités anti-Xa/kg). ... 246
Tableau 14 : Photographies de coupes d'intestin de lapin de 20 µm (plaques de Peyer) observées par microscopie confocale, grossissement X10..... 248
Tableau 15 : Photographies de microparticules encapsulant un indicateur de pH et soumises à une étude de stabilité accélérée.. 251

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Activation des plaquettes au contact du sous-endothélium exposé suite à une lésion vasculaire et interactions avec les éléments de la cascade de la coagulation. 14
Figure 2 : La cascade de la coagulation. 16
Figure 3 : Conversion du fibrinogène en fibrine par la thrombine conduisant à la formation de protofibrilles puis de fibres de fibrine ; puis dégradation de la fibrine sous l'action de la plasmine. 18
Figure 4 : Inhibition d'une protéase par une serpine. 23
Figure 5 : Constituants des chaines d'héparine. 30
Figure 6 : Mécanisme de l'inhibition des facteurs Xa et IIa par l'AT et l'héparine. 33
Figure 7 : Division des chaines d'héparine en « Low Affinity Material » et « High Affinity Material ». 35
Figure 8 : Conformation en hélice d'une séquence dodesaccharidique d'héparine contenant une répétition du disaccharide de base. 36
Figure 9 : Liaison de l'héparine avec les protéines sanguines, les cellules endothéliales, les macrophages et l'AT. 44
Figure 10 : Demi-vie plasmatique des HNF en fonction de la dose administrée. 46
Figure 11 : Activité plasmatique anti-Xa suite à l'administration orale de préparations solides de parnaparine. 55
Figure 12 : Activité anti-Xa plasmatique suite à l'administration orale d'héparine et de caprate de sodium. 56
Figure 13 : Structure chimique générale des composés SNAC. 57
Figure 14 : Profil pharmacocinétique de l'héparine obtenu suite à la co-administration de SNAC et de différentes doses d'HNF chez le singe. 58
Figure 15 : TCA et activités anti-Xa et anti-IIa plasmatiques obtenues lors des études cliniques de phase I du SNAC. 59
Figure 16 : Activités anti-Xa plasmatiques suite à l'administration orale de solutions d'héparine/SNAC chez le volontaire sain lors des études cliniques de phase I. 60
Figure 17 : Activités anti-Xa et anti-IIa plasmatiques obtenues lors des études cliniques de phase III du SNAC. 62
Figure 18 : Effet de la papaïne sur l'absorption orale d'héparine. 64

Figure 19 : Activité anti-Xa plasmatique après administration intraduodénale d'HBPM à la dose de 5 000 unités anti-Xa/kg avec ou sans Carbopol® C 934 P chez le cochon. 65
Figure 20 : Structure chimique du SNOCC (A), activité anti-Xa plasmatique après administration intraduodénale de 5000 unités anti-Xa/kg de reviparine avec ou sans SNOCC (B)..... 67
Figure 21 : Effet des thiomères en présence de GSH sur l'absorption orale d'héparine. 69
Figure 22 : Etudes *in vivo* de l'effet des conjugués HBPM-DOCA administrés *per os*, sous forme d'une microémulsion, chez le singe et la souris. 71
Figure 23 : Etudes *in vivo* de l'effet des conjugués HBPM-DOCA administrés *per os*, sous forme de solution, chez le singe et la souris. 72
Figure 24 : Activité anti-Xa plasmatique après administration orale de différents complexes acides biliaires-HBPM chez le rat. 73
Figure 25 : Structure de dendrons. 74
Figure 26 : Activité anti-Xa plasmatique suite à l'administration orale chez le rat d'HBPM (7 500 unités anti-Xa/kg) avec ou sans dendrons. 75
Figure 27 : Effet de l'AT 1002 sur l'absorption de l'ardéparine administrée par voie orale chez le rat. 76
Figure 28 : Photographies de microparticules d'héparine par microscopie électronique. 77
Figure 29 : TCA et activité anti-Xa plasmatique obtenus suite à l'administration orale d'héparine microencapsulée à des lapins. 78
Figure 30 : Activité anti-Xa plasmatique obtenue suite à l'administration par voie orale à des lapins de tinzaparine encapsulée au sein de nanoparticules polymériques. 79
Figure 31 : Activité anti-Xa plasmatique obtenue suite à l'administration par voie orale à des lapins de granulés de bémiparine. 80
Figure 32 : Différents types de cellules présents au niveau de l'épithélium intestinal. 88
Figure 33 : Schéma des élements formant le tissu lymphoïde intestinal. 89
Figure 34 : Structure schématique biochimique de la mucine sécrétée. 92
Figure 35 : Complexe jonctionnel apical et jonctions serées. 95
Figure 36 : Modèle moléculaire des desmosomes. 99
Figure 37 : Localisation des pompes d'efflux et du récepteur PEPT1 au niveau des cellules épithéliales intestinales. 100
Figure 38 : Schéma des différentes voies de passage possible des substances actives à travers l'épithélium intestinal. 103

Figure 39 : (A) Représentation schématique d'une portion d'intestin en configuration eversée (B) Dispositif expérimental. 109
Figure 40 : Schéma d'une chambre de Ussing circulatoire. 110
Figure 41 : Fraction de dose absorbée après administration orale en fonction du coefficient de perméabilité obtenu sur modèle Caco-2 ou sur jéjunum humain. 114
Figure 42 : Schéma d'un insert de transwell®. 115
Figure 43 : Effet du SNAC et du propylène glycol sur le TCA suite à leur administration intra-iléale chez des rats en présence d'héparine. 124
Figure 44 : Effet promoteur d'absorption d'un thiomère sur l'héparine, testé sur chambre de Ussing. 125
Figure 45 : Effet de la bromélaïne et de la papaïne sur le transport d'héparine évalué sur chambre de Ussing. 126
Figure 46 : Perméabilité régionale de l'ardéparine en présence de différents promoteurs d'absorption, évaluée sur chambre de Ussing. 128
Figure 47 : Etude de transport de l'héparine en présence de bromélaïne sur un modèle d'épithélium issu de la culture cellulaire. 131
Figure 48 : Etude du passage de l'héparine en présence de SNAC sur un modèle d'épithélium issu de la culture cellulaire. 134
Figure 49 : Etudes des mécanismes de passage du conjugué DOCA-HBPM en présence de DMSO à travers un épithélium de cellules Caco-2. 136
Figure 50 : (A) Activités anti-IIa et (B) anti-Xa et (C) rapport anti-Xa/anti-IIa libérés *in vitro* de microparticules de nadroparine formulées à partir d'Eudragit® RS seul ou en mélange avec du PLGA S. 204
Figure 51 : (A) activités anti-IIa et (B) anti-Xa et (C) rapport anti-Xa/anti-IIa libérés *in vitro* de microparticules de tinzaparine formulées à partir d'Eudragit® RS seul ou en mélange avec du PLGA S. 245
Figure 52 : (A) Activités plasmatique*s* anti-Xa et (B) anti-IIa obtenues suite à l'administration à des lapins de microparticules de nadroparine. 211
Figure 53 : Résistance électrique transépithéliale des cellules Caco-2 cultivées sur transwell® en fonction du temps de culture. 224
Figure 54 : Activité anti-Xa présente au pôle basolatéral, exprimée sous forme cumulée, suite au dépôt des témoins ou des microparticules 100 chargées en nadroparine. 228

Figure 55 : Profils de libération *in vitro* (exprimés en unités libérées/g de polymère) de la nadroparine (A et C) et de la tinzaparine (B et D) à partir de microparticules de différentes compositions..... 242
Figure 56 : Profils de libération *in vitro* (exprimés en pourcentages) de la nadroparine (A et C) et de la tinzaparine (B et D) à partir de microparticules de différentes compositions. 243
Figure 57 : (A) Activités anti-IIa et (B) anti-Xa et (C) rapport anti-Xa/anti-IIa libérés *in vitro* de microparticules de nadroparine formulées à partir d'Eudragit® RS seul ou en mélange avec le PLGA H..... 244
Figure 58 : (A) Activités anti-IIa et (B) anti-Xa et (C) rapport anti-Xa/anti-IIa libérés *in vitro* de microparticules de tinzaparine formulées à partir d'Eudragit® RS seul ou en mélange avec le PLGA H..... 245
Figure 59 : (A) Rapports anti-Xa/anti-IIa obtenus chez le lapin suite à l'injection sous cutanée de la solution commerciale de nadroparine ou (B) à l'administration par voie orale de microparticules de nadroparine 246
Figure 60 : Viabilité des cellules Caco-2 (exprimée en pourcentage), suite à leur exposition durant 2(A), 4(B), 6(C) ou 24(D) heures à des microparticules vierges, chargées en nadroparine ou en tinzaparine a des concentrations de 1, 5 ou 10 mg/cm^2..... 250

LISTE DES ABREVIATIONS

ACLM : Above the critical Chain Length

ADP : Adénosine diphosphate

AP : Apical

AT : Antithrombine

AT 1002 : nom d'un peptide synthétique dérivé d'une toxine des zonula occludens

ATP : Adénosine triphosphate

AUC : Aire sous courbe (Area Under the Curve)

BCLM : Below the critical Chain Length

BL : Basolatéral

C_{max} : Concentration maximale

CYP :Cytochrome

DMSO : Diméthylsulfoxide

FT : Facteur Tissulaire

FvW : Facteur von Willebrand

GAG : Glycosaminoglycane

GP : Glycoprotéine

HAM : High Affinity Material

HBPM : Héparine de Bas Poids Moléculaire (ou LMWH : Low Molecular Weight Heparin)

HCII : Cofacteur II de l'héparine (Heparin CoFactor II)

HNF : Héparine Non fractionnée (ou UFH : UnFractionnated Heparin)

INR : International Normalized Ratio

IV : Intraveineuse

kDa : Kilodaltons

LAM : Low Affinity Material

MCC : Mono-N-carboxyméthyl chitosane

NO : Monoxyde d'azote

P-gp : glycoprotéine P

SA : Substance active

SC : Sous-cutanée

SNOCC : N-sulfonato-N,O-carboxyméthyl chitosane

TCA : Temps de céphaline activée (ou aPPT = activated partial thromboplastin time)

T_{max} : Temps maximal

TFPI : Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (ouTissue Factor Pathway Inhibitor)

TEER : Résistance électrique transépitheliale (TransEpithelial Electrical Resistance)

UI : Unités internationales

U : Unités

INTRODUCTION

Utilisée en clinique depuis plus de 70 ans, l'héparine reste encore à l'heure actuelle la référence pour la prévention et le traitement de la maladie thromboembolique. En effet, sa grande efficacité et son innocuité font qu'aucune autre molécule n'est parvenue à la remplacer. Pourtant, le traitement par cette molécule n'est pas parfait et il présente certaines contraintes pour le patient, de plus préjudiciables pour le système de santé : l'administration se fait uniquement par voie parentérale et des réinjections régulières sont nécessaires en raison de la faible demi-vie de cette molécule. En plus du coût important généré par un tel traitement qui nécessite du personnel spécialisé, il existe des problèmes d'observance.

Le développement d'une forme orale constituerait donc une réelle avancée. Cependant, la masse moléculaire élevée et surtout la charge négative importante de ces molécules constituent un obstacle à leur passage à travers la paroi du tube digestif. De plus, il s'agit d'une des substances actives les plus complexes et les plus hétérogènes retrouvées sur le marché du médicament et on peut dire d'elle qu'elle n'est pas une substance active tout à fait comme les autres : elle est en effet atypique à bien des égards en ce qui concerne son mode d'obtention, sa structure, sa composition et son mécanisme d'action. Il est donc important de bien connaître ces paramètres et de les prendre en compte dans le développement d'une forme orale d'héparine.

En effet, cette substance active, retrouvée dans l'organisme au niveau des mastocytes, est toujours extraite des muqueuses intestinales et pulmonaires de bœuf ou de porc, alors que bon nombre de molécules d'origine biologique telle que l'insuline, sont, pour des raisons de sécurité, de simplicité et d'économie, synthétisées par voie chimique ou bactériologique. Cependant, en raison de la complexité de sa structure et de sa composition, toute synthèse de l'héparine proprement dite demeure actuellement impossible.

En effet, l'héparine n'est pas une molécule homogène : il s'agit d'un mélange de chaines polysaccharidiques de tailles différentes dont seulement certaines possèdent des propriétés anticoagulantes. Ce n'est que récemment, au début des années 80, que le mécanisme d'action anticoagulant a été élucidé. Les chaines actives d'héparines n'agissent pas directement sur la cascade de la coagulation : elles se lient, grâce à une séquence pentasaccharide spécifique, à l'antithrombine, un inhibiteur naturel des facteurs Xa et IIa de la cascade de la coagulation. Cette liaison potentialise alors son action. Enfin, parmi les chaines actives, on distingue des chaines dites « longues » (appelées ACL en anglais) qui sont à l'origine d'une inhibition des

facteurs Xa et IIa, alors que des chaines dites « courtes » (appelées BCL en anglais) sont uniquement responsables d'une inhibition du facteur Xa.

Ainsi, l'effet de l'héparine, qui possède une action catalytique vis-à-vis de l'antithrombine, ne peut donc pas être évaluée par la mesure de sa concentration, comme cela se pratique pour des molécules plus « classiques », mais par la mesure de son potentiel à inhiber le facteur Xa et le facteur IIa. C'est pour cette raison que les différentes héparines sont caractérisées par leur rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa.

Cependant, en pratique clinique, le maniement des héparines de bas poids moléculaire se fait uniquement en termes d'activité anti-Xa (posologie administrée et mesure de la « concentration » plasmatique par test de laboratoire). Tous les systèmes expérimentaux animaux destinés à étudier le passage dans la circulation sanguine d'une héparine de bas poids moléculaire administrée par voie orale n'étudient que l'activité anti-Xa ; l'activité anti-IIa n'est jamais mesurée. Or, le potentiel des héparines à inhiber la génération de la thrombine est principalement lié à l'activité anti-IIa, l'activité anti-Xa n'intervenant que de façon marginale dans ce phénomène.

Dans le cadre du développement de nouvelles formes pharmaceutiques d'héparine de bas poids moléculaire administrables par voie orale, la mesure de l'activité anti-Xa, bien qu'essentielle, devrait donc nécessairement s'accompagner de celle de l'activité anti-IIa. En plus de quantifier de façon simple l'importance relative de ces deux activités, le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa donne accès à la proportion de chaines BCL par rapport aux chaines ACL. Or le comportement de ces chaines au sein des systèmes de délivrance ou vis-à-vis de la membrane intestinale n'a jamais été évalué.

Des recherches menées au laboratoire de Pharmacie Galénique de Nancy (EA 3452) ont permis d'obtenir des microparticules d'héparine administrables par voie orale, capables de générer une forte activité anti-Xa plasmatique chez le lapin. Le travail présenté dans cette thèse constitue la continuité de ces études. Basés d'un point de vue méthodologique sur des déterminations *in vitro* et *in vivo* d'activités anti-Xa, anti-IIa et du rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa, ces travaux ont eu pour objectifs de déterminer :

- l'existence ou non d'une encapsulation, d'une libération *in vitro* et/ou d'une absorption *in vivo* préférentielle d'un des types de chaines actives de l'héparine présentes au sein des microparticules.

- le ou les mécanismes de passage des chaines d'héparine à travers l'épithélium intestinal.
- la place possible d'une forme microparticulaire d'héparine pour la voie orale comme alternative potentielle à l'injection sous-cutanée de la solution commerciale de référence.

Ce manuscrit s'articule en 2 volets. Dans le premier **volet bibliographique** est présenté un rappel sur la coagulation, la structure et le mécanisme d'action des chaines composant l'héparine, les travaux antérieurs sur les formes orales d'héparine et sur les moyens permettant d'étudier l'absorption intestinale des héparines. Dans le second **volet expérimental**, une étude du comportement *in vitro* (**publication I**) et *in vivo* (**publication II**) des chaines ACL et BCL d'héparine encapsulées au sein de microparticules est présentée.

Une **discussion générale** permet ensuite de faire le lien entre les différents résultats issus de ce travail de thèse qu'ils aient été publiés ou non.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. HEMOSTASE ET THROMBOSE

L'hémostase est l'ensemble des processus concourant à arrêter les hémorragies qui affectent la microcirculation sanguine et à restaurer la circulation sanguine lorsqu'un thrombus obstrue les vaisseaux sanguins.

La réponse hémostatique met en jeu des phénomènes mécaniques, physico-chimiques et enzymatiques qui sont imbriqués dans le temps et interdépendants. Toutefois, schématiquement, il est possible de les décomposer en trois grandes étapes :

- l'hémostase primaire, première étape d'urgence du contrôle hémorragique, conduisant à la formation du thrombus plaquettaire en une durée de 3 à 5 minutes et comprenant le temps vasculaire et le temps plaquettaire.
- la coagulation plasmatique c'est-à-dire l'activation de la coagulation plasmatique dont le rôle est de consolider le thrombus plaquettaire par la constitution d'un réseau protéique de fibrine en une durée de 5 à 10 minutes.
- la fibrinolyse assurant secondairement la dégradation enzymatique de la masse fibrineuse à l'issue de la réparation vasculaire en une durée de 48 à 72 heures.

L'ensemble de ces phénomènes est étroitement régulé par la mise en œuvre d'un système complexe d'activateurs et d'inhibiteurs, permettant à l'hémostase de se développer au foyer même de la brèche vasculaire, sans extension à distance.

Ces activateurs et inhibiteurs font notamment partie des nombreux acteurs que l'on trouve impliqués dans ces phénomènes, tels que :

- les protéines plasmatiques (facteurs et inhibiteurs de la coagulation)
- une protéine tissulaire (facteur tissulaire)
- la paroi vasculaire et la cellule endothéliale
- les plaquettes et les ions calcium
- le facteur von Willebrand

La section suivante présente les principales caractéristiques de ces acteurs ainsi que leur implication dans le processus d'hémostase.

1.1. DIFFERENTS ACTEURS DE L'HEMOSTASE

1.1.1. FACTEURS DE LA COAGULATION

Les facteurs de la coagulation sont des glycoprotéines plasmatiques synthétisées dans le foie (Tableau 1). Il en existe douze au total : les facteurs I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, la prékallikréine et le kininogène de haut poids moléculaire. Ces facteurs appartiennent à différentes familles dont le mécanisme d'action varie.

Les facteurs II, VII, IX, X font partie de la famille des protéines vitamine-K-dépendantes. Les précurseurs de ces protéines subissent au niveau du foie une transformation de leurs résidus acide glutamique en acide γ-carboxyglutamique. Cette réaction qui requiert de la vitamine K réduite est catalysée par une γ-carboxylase. Cette transformation permet aux protéines vitamine-K-dépendantes d'acquérir la faculté de se lier aux phospholipides membranaires en présence d'ions calcium. Les facteurs II, VII, IX et X sont des zymogènes de sérine-protéases : ils circulent sous une forme dénuée d'activité enzymatique mais peuvent être transformés en sérine-protéase par protéolyse limitée.

D'autres facteurs de la coagulation sont aussi des zymogènes de sérine-protéases, mais non vitamine-K-dépendant : il s'agit des facteurs XI, XII et la prékallikréine.

Le facteur XIII est un zymogène de transglutaminase.

Enfin les facteurs V et VIII ainsi que le kininogène de haut poids moléculaire sont des cofacteurs enzymatiques et non des zymogènes. L'activation des facteurs V et VIII se fait par protéolyse médiée principalement par le facteur IIa.

En revanche, l'activation du kininogène de haut poids moléculaire est permise par la simple fixation à une surface électronégative.

TABLEAU 1 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES PROTEINES DE LA COAGULATION [1].

Facteurs de la coagulation	Fonction	Lieu principal de synthèse	Vitamine K dépendance
I (fibrinogène)	Substrat	Foie	-
II (prothrombine)	Zymogène	Foie	+
V	Cofacteur	Foie	-
VII	Zymogène	Foie	+
VIII (facteur antihémophilique A)	Cofacteur	Foie	-
IX (facteur antihémophilique B)	Zymogène	Foie	+
X	Zymogène	Foie	+
XI	Zymogène	Foie	-
XII	Zymogène	Foie	-
XIII (facteur stabilisant de la fibrine)	Zymogène	Foie	-
Prékallikréine	Zymogène	Foie	-
Kininogène de haut poids moléculaire	Cofacteur	Foie	-
Facteur tissulaire*	Cofacteur	Multicellulaire	-
Inhibiteurs de la coagulation	**Fonction**	**Lieu principal de synthèse**	**Vitamine K dépendance**
Antithrombine	Serpine	Foie	-
HCII	Serpine	Foie	-
Protéine C	Zymogène	Foie	+
Protéine S	Cofacteur	Foie	+
Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire	Inhibiteur de type Kunitz	Multicellulaire	-

* = contrairement aux autres protéines du tableau, le facteur tissulaire n'est pas une protéine plasmatique mais une protéine membranaire.

1.1.2. INHIBITEURS PHYSIOLOGIQUES DE LA COAGULATION

Tout comme les facteurs de la coagulation, les inhibiteurs physiologiques de la coagulation appartiennent à plusieurs familles qui se différencient par leur mécanisme d'action.

La première famille regroupe les inhibiteurs de sérine-protéase ou serpines. Ils possèdent comme principale caractéristique de se comporter comme des substrats suicides pour les enzymes cibles qu'ils catalysent. Cet ensemble comprend principalement l'antithrombine (AT) et le second cofacteur de l'héparine (HCII).

La seconde famille est le système de la protéine C. Cette famille comprend deux protéines plasmatiques vitamine-K-dépendantes, la protéine C et la protéine S, ainsi qu'une protéine membranaire, la thrombomoduline.

La protéine C est un zymogène d'une sérine-protéase. Elle n'acquiert son activité que suite à l'activation par un complexe thrombine-thrombomoduline. En présence de son cofacteur, la protéine S, la protéine C a la propriété d'inactiver les facteurs Va et VIIIa [2]. La protéine C a également des propriétés anti-inflammatoires importantes via des effets cellulaires.

Un troisième système est constitué par l'inhibiteur plasmatique du facteur tissulaire. Il s'agit d'une glycoprotéine qui présente les caractéristiques d'un inhibiteur de type Kunitz c'est-à-dire qu'elle se comporte comme un faux substrat pour les enzymes cibles. Cet inhibiteur est lié à la surface luminale des cellules endothéliales, et il est l'inhibiteur du système de déclenchement par le facteur Va (voie dite du facteur tissulaire).

1.1.3. FACTEUR TISSULAIRE

Le facteur tissulaire (FT) est une glycoprotéine transmembranaire dont la partie la plus importante est située sur la face externe de la membranaire cellulaire. Il est présent au niveau de nombreuses cellules de l'organisme, notamment les fibroblastes de la paroi des vaisseaux sanguins. Ce n'est ni une pro-enzyme ni une enzyme. Il est à lui seul dépourvu d'activité coagulante, il se comporte comme un cofacteur enzymatique lorsqu'il se trouve associé aux phospholipides membranaires procoagulants.

1.1.4. PAROI VASCULAIRE ET CELLULE ENDOTHELIALE

Les vaisseaux sanguins sont composés de trois tuniques : l'intima, la média et l'adventice. L'intima est constitué par une monocouche de cellules endothéliales directement en contact avec le sang et le sous-endothélium. La média se compose de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques tandis que l'adventice consiste en des fibres de collagène et des vaisseaux nourriciers.

La paroi vasculaire possède une propriété fondamentale : l'hémocompatibilité, conférée par la cellule endothéliale qui, normalement, prévient l'activation du système de la coagulation. La thromborésistance de la cellule endothéliale est assurée notamment par la charge ionique négative de sa membrane plasmique, la production de médiateurs anti-activateurs plaquettaires, d'inhibiteurs de la coagulation et d'activateurs de la fibrinolyse. En revanche, une fois activée, la cellule endothéliale est hautement thrombogène. En effet, elle exprime alors à sa surface des facteurs prothrombotiques (phospholipides, facteurs tissulaire,…), responsables du déclenchement des phénomènes d'adhérence/agrégation plaquettaire.

De plus, la cellule endothéliale est le siège d'un métabolisme intense qui permet la production de nombreuses molécules impliquées dans l'hémostase telles que :

- le collagène, une des principales protéines thrombogènes.
- le facteur tissulaire.
- la thrombomoduline.
- le monoxyde d'azote, vasodilatateur.

1.1.5. PLAQUETTES

Les plaquettes sont produites par des précurseurs médullaires : les mégacaryocytes [3]. Chaque mégacaryocyte donne ainsi naissance à environ 1000 plaquettes anucléées.

La structure des plaquettes est complexe. Elles sont discoïdes et contiennent de nombreux microfilaments et un réseau tubulaire dense. Leur membrane plasmique est très invaginée et forme un système canalaire ouvert à la surface par lequel sont excrétées différentes substances contenues dans des granules.

Les granules sont de deux types, et on distingue :

- les granules α qui contiennent notamment du fibrinogène, du facteur von Willebrand, un inhibiteur des héparines appelé facteur 4 plaquettaire,…
- les granules denses qui contiennent de la sérotonine et de l'ATP, de l'ADP et du calcium.

La membrane des plaquettes est riche en de nombreuses glycoprotéines (GP) dont la GPIa/IIa, la GPIb/IX et la GPIIb/IIIa, qui jouent un rôle primordial dans les phénomènes d'adhérence plaquette/paroi du vaisseau et plaquette/plaquette.

La membrane de la plaquette possède en temps normal une répartition en phospholipides négatifs plus importante au niveau de sa face interne qu'externe. Lors de l'activation des plaquettes, cette répartition s'inverse par un mécanisme de flip flop. Ainsi, la phosphatidylsérine aux propriétés pro-coagulantes se retrouve du côté externe de la membrane plasmique des plaquettes. Les charges négatives de ces phospholipides permettent, en présence d'ions Ca^{++}, la fixation à la membrane plaquettaire des facteurs vitamine K dépendants. Il y également établissement de liaisons avec d'autres facteurs (facteurs V et VIII) au moyen d'interactions hydrophobes.

1.1.6. FACTEUR VON WILLEBRAND

Il s'agit d'une protéine synthétisée à la fois par les cellules endothéliales et par les mégacaryocytes. Elle est ensuite stockée au niveau des cellules endothéliales et des plaquettes, dans les granules α. Son rôle est multiple, elle permet :

- l'adhérence des plaquettes aux cellules endothéliales activées ou au sous-endothélium via son récepteur GPIb/IX.
- l'établissement d'un pont entre deux plaquettes adjacentes, de par sa structure symétrique, permettant ainsi leur agrégation.
- le transport du facteur VIII (facteur antihémophilique A).

1.2. HEMOSTASE PRIMAIRE

Il s'agit de l'ensemble des mécanismes physiologiques conduisant à l'obturation initiale de la brèche vasculaire et aux premières étapes de sa réparation. Le clou plaquettaire est le produit final de l'hémostase primaire dont les caractéristiques sont la rapidité de sa génération mais aussi sa fragilité. Une consolidation secondaire obtenue par la mise en œuvre de la coagulation est nécessaire.

Elle se décompose, pour une bonne compréhension, en un temps vasculaire et un temps plaquettaire bien qu'en réalité ces phénomènes soient imbriqués.

1.2.1. TEMPS VASCULAIRE

Suite à une lésion d'un vaisseau du système sanguin, une vasoconstriction reflexe immédiate et transitoire intervient. Il s'agit du temps vasculaire. Cette diminution de calibre du vaisseau permet un ralentissement du débit sanguin, induisant ainsi une stase qui favorise la mise en œuvre des différentes étapes de l'hémostase.

1.2.2. TEMPS PLAQUETTAIRE

1.2.2.1. ADHERENCE PLAQUETTAIRE

Le temps plaquettaire débute quasi au même moment, lorsque le sang se retrouve au contact des microfibrilles du sous-endothélium [3].

Les plaquettes, de par leurs récepteurs glycoprotéiques, ont la propriété de se lier à certains composants hautement thrombogènes du sous-endothélium. Cette liaison est soit (Figure 1) :

- directe entre la GPIa/IIa de la plaquette et le collagène sous endothélial.
- indirecte entre la GPIb/IX de la plaquette et les microfibrilles sous endothéliales, par l'intermédiaire du facteur von Willebrand qui joue le rôle de pont entre les deux structures [3].

1.2.2.2. ACTIVATION PLAQUETTAIRE

L'adhérence des plaquettes au sous-endothélium provoque la transduction de signaux cellulaires ce qui permet leur activation [4]. L'activation est également fortement amplifiée par l'apparition des premières traces de thrombine générées [5]. L'activation a pour but un recrutement de nouvelles plaquettes au site de lésion afin de constituer un agrégat d'une taille suffisante [6]. L'activation se traduit à la fois :

- par un changement de forme : les plaquettes deviennent plus sphériques et des pseudopodes sont émis dans toutes les directions. Le volume occupé par la plaquette augmente, elle a ainsi la possibilité de s'accrocher à d'autres plaquettes plus facilement [3, 5].
- par une activation métabolique qui permet notamment :
  - l'exposition à la surface de la membrane plaquettaire de l'intégrine GP IIb/IIIa dans un état activé, favorable à la liaison de ses ligands. En présence de calcium, la liaison du fibrinogène est possible permettant l'agrégation des plaquettes entre elles.
  - une sécrétion du contenu des granules avec libération notamment de substances favorisant l'agrégation (sérotonine, fibrinogène, ADP), procoagulantes (facteur V, …) ou vasomotrices (sérotonine) [7] qui permettent l'amplification du processus d'hémostase primaire et la mise en place de conditions favorables à la coagulation.
  - la génération de nombreuses substances actives, telles que le thromboxane A_2, à partir de phospholipides membranaires tels que l'acide arachidonique. Le thromboxane A_2 permet notamment l'activation de nouvelles plaquettes.
  - un remodelage de l'organisation lipidique de la membrane de la plaquette : grâce à un phénomène de flip-flop, des phospholipides à activité procoagulante (grâce à leur charge négative) sont présentés au niveau de la face externe de la membrane plasmique de la plaquette. Cela permet la liaison de nombreux facteurs de la cascade de la coagulation tel que les facteurs VII, IX, X et II.

Le processus d'activation des plaquettes est un processus dynamique qui nécessite de l'énergie (ATP cytoplasmique) mais également des ions calcium indispensables à l'activation cellulaire et au fonctionnement du système contractile actine myosine.

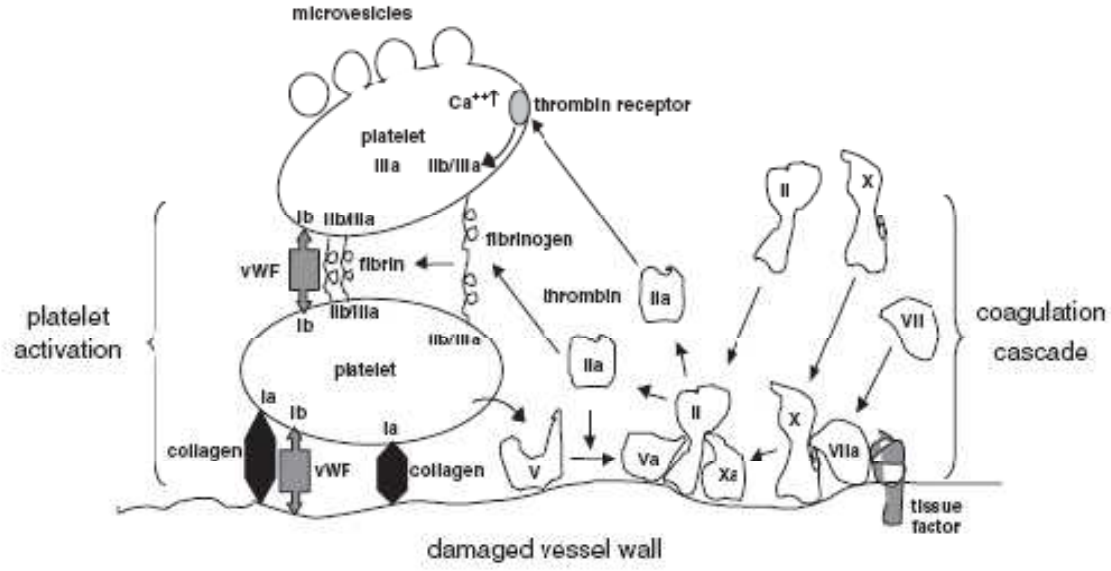


FIGURE 1 : ACTIVATION DES PLAQUETTES AU CONTACT DU SOUS-ENDOTHELIUM EXPOSE SUITE A UNE LESION VASCULAIRE ET INTERACTIONS AVEC LES ELEMENTS DE LA CASCADE DE LA COAGULATION [6].

1.2.2.3. AGREGATION PLAQUETTAIRE

L'ADP ainsi que les traces de thrombine produite par les premières phases de la coagulation sont les principaux agonistes de l'agrégation plaquettaire qui est ensuite amplifiée par d'autres substances telle que le thromboxane A_2, l'adrénaline et la sérotonine. L'agrégation est permise par le fibrinogène qui permet la création de ponts adhésifs entre les plaquettes par le biais de sa fixation avec son récepteur membranaire, la GPIIb/IIIa (Figure 1).

1.3. COAGULATION

Les deux voies traditionnellement utilisées pour décrire la cascade de la coagulation (la voie extrinsèque et la voie intrinsèque) convergent vers la génération de facteur Xa qui permet la transformation de la prothrombine en thrombine. Dans cette section, les mécanismes d'activation et de régulation de ces deux voies sont présentés.

1.3.1. VOIE EXTRINSEQUE

Lors de la rupture du vaisseau, le plasma se trouve placé au contact du sous-endothélium et plus particulièrement du facteur tissulaire exposé à la surface des fibroblastes. Le facteur tissulaire est associé aux phospholipides négatifs de la membrane en un complexe appelé thromboplastine [8].

Le facteur tissulaire a une très grande affinité pour le facteur VII / VIIa avec lequel il s'associe de façon équimolaire. Les faibles quantités de f acteur VIIa associées au facteur tissulaire vont permettre une autocatalyse du complexe [facteur tissulaire-FVII-phospholipides]. Cependant, d'un point de vue spatial, cette action reste localisée car le facteur tissulaire est immobilisé au niveau des lipides membranaires. La voie extrinsèque de la coagulation est alors initiée.

Le facteur VIIa va ensuite activer le facteur IX ou le facteur X. L'activation de l'un ou de l'autre dépend de la concentration en facteur tissulaire qui joue, là encore, un rôle de cofacteur dans la réaction. Si sa concentration est importante, il active directement suffisamment de facteur X pour que le sang coagule sinon il active aussi le facteur IX qui active à son tour le facteur X (Figure 2). Le facteur Xa permet la génération des premières traces de thrombine à partir de la prothrombine.

Les premières traces de thrombine jouent un rôle clef puisqu'elles permettent [7] :

- l'activation totale des plaquettes partiellement activées par divers agonistes.
- l'activation des facteurs VIII et V qui sont respectivement les cofacteurs de la transformation du facteur X en facteur Xa et de la prothrombine en thrombine. Ces facteurs se trouvent fixés au niveau des phospholipides négatifs de la membrane plaquettaire (nommés également facteur 3 plaquettaire) par liaison hydrophobe grâce au calcium.
- l'activation du facteur XI en XIa, de signification discutée.

L'activation des plaquettes combinée à l'activation des facteurs V et VIII accélère considérablement la production de thrombine. En effet, le facteur IXa forme au niveau des plaquettes en présence de son cofacteur le facteur VIIIa, un complexe tenase [2]. Ce complexe catalyse alors la transformation massive du facteur X en Xa. Ce dernier, avec son cofacteur

Va, forment un complexe prothrombinase qui permet la génération d'un « burst » de thrombine responsable de réactions de rétroaction (Figure 2).

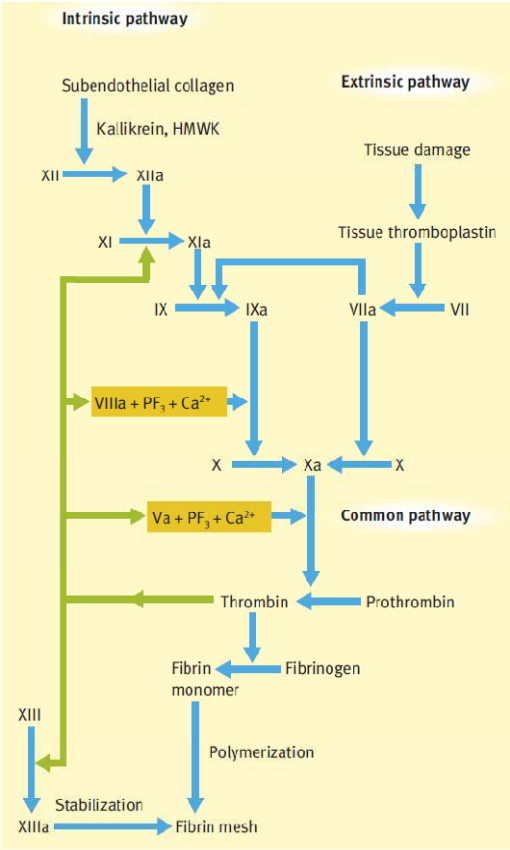


FIGURE 2 : LA CASCADE DE LA COAGULATION [3].

La forme active des facteurs de la coagulation est notée par un suffixe « a ». Les flèches vertes montrent les rétrocontrôles positifs médiés par la thrombine. Les réactions placées dans les rectangles jaunes se déroulent à la surface des plaquettes et mettent en jeu les plaquettes, et les ions calcium.

PF3 = Platelet Factor 3 = Facteur 3 plaquettaire = ancienne dénomination pour l'ensemble des actions procoagulantes (dont celle de la phosphatidylsérine).

HMWK = High Molecular Weight Kininogen (ou kininogène de haut poids moléculaire).

La voie extrinsèque s'est comportée comme la bougie d'allumage des réactions de la cascade de la coagulation afin qu'elles démarrent et gagnent en intensité. Son rôle étant terminé, le facteur Xa, en conjonction avec l'inhibiteur plasmatique du facteur tissulaire, inhibe le facteur

VIIa afin d'éteindre la voie extrinsèque. L'activation du facteur Xa est alors ralentie voire éteinte. En parallèle, la voie intrinsèque a été activée et elle a été surtout amplifiée par l'activation importante du complexe facteur IXa/VIIIa et du facteur XIa.

Nous allons maintenant voir comment la voie intrinsèque a été mise en place.

1.3.2. VOIE INTRINSEQUE

Il s'agit d'une voie d'activation importante *in vitro* mais son rôle i*n vivo* reste incertain. En effet, en cas de déficit d'acteurs de cette voie (facteur XII, prékallikréine, et kininogène de haut poids moléculaire), l'arrêt d'un saignement chez l'homme est possible [9] ce qui témoigne de son importance toute relative. La voie extrinsèque se déroule en plusieurs étapes :

- le contact avec certaines surfaces étrangères mouillables (verre, silice micronisée et kaolin *in vitro*) ou avec le sous-endothélium (*in vivo*) entraine l'activation du facteur XII en présence de kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) et de kallikréine (enzyme résultant de la transformation de la prékallikréine). Le facteur XIIa en présence de KHPM active le facteur XI en facteur XIa [10]. Cependant le facteur XI peut être également activé directement par la thrombine.
- le facteur XIa transforme à son tour et en présence de Ca^{++} le facteur IX en facteur IXa. Cette réaction se déroule physiologiquement à la surface plaquettaire. On a vu précédemment que le facteur IX peut être activé directement par la voie extrinsèque.
- le facteur IXa forme avec le facteur VIIIa en présence de phospholipides et de Ca^{++} un complexe enzymatique qui est à son tour capable de transformer au niveau de la surface plaquettaire le facteur X en facteur Xa.
- le facteur X permet de générer de la thrombine comme vu précédemment lors de la description de la voie extrinsèque. La thrombine exerce des rétroactions positives sur les facteurs V, VIII et XI entretenant la génération massive et rapide de prothrombine. La thrombine active également le facteur XIII dont le rôle est décrit ci-dessous.

1.3.3. GENERATION DE FIBRINE INSOLUBLE

La thrombine, en aval de toutes les voies de la coagulation, permet la génération de fibrine insoluble à partir du fibrinogène plasmatique soluble [3]. Le fibrinogène contient deux ensembles symétriques de trois chaines polypeptidiques : les chaines Aα, Bβ et γ [11]. Ces six

chaines sont assemblées par leur extrémité N-terminale, au niveau du nodule « E » central de la molécule. Les extrémités C-terminales des chaines Bβ et γ forment de chaque côté du nodule E deux nodules D.

La thrombine permet de détacher au niveau du nodule E du fibrinogène les extrémités N-terminales de la chaine Aα puis celles de la chaine Bβ [11]. Le fibrinopeptide de chaine Aα (ou fibrinopeptide A) ainsi découpé permet l'exposition d'un site « A » (Figure 3). Ce site permet l'association de façon non covalente du nodule E avec la chaine γ d'un nodule D. Ainsi on assiste à la formation spontanée de doubles rangées de monomères de fibrine associés les uns aux autres. Suivant le même mécanisme, la thrombine découpe un fibrinopeptide B au niveau de la chaine Bβ, permettant l'exposition d'un site « B » sur le nodule E qui a la propriété de rentrer en interaction non covalente avec un nodule D d'une autre chaine. Ainsi l'agrégation latérale des doubles chaines de fibrine est rendue possible, solidifiant alors le réseau.

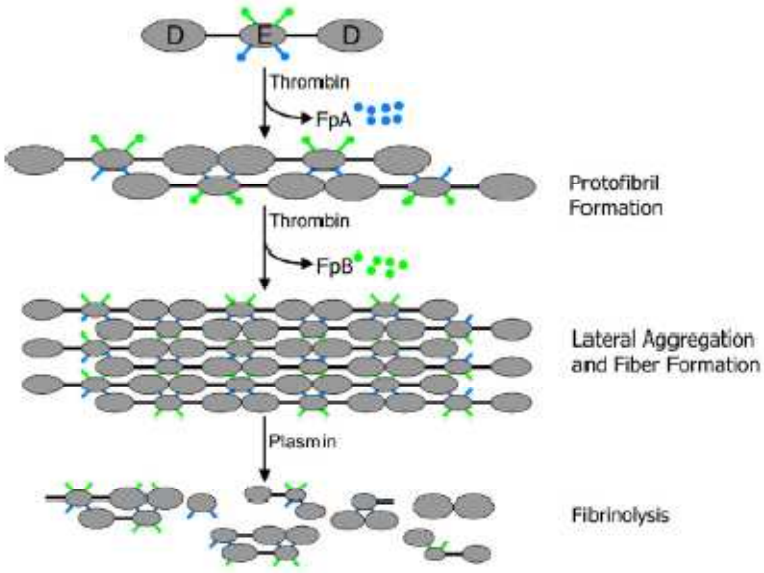


FIGURE 3 : CONVERSION DU FIBRINOGENE EN FIBRINE PAR LA THROMBINE CONDUISANT A LA FORMATION DE PROTOFIBRILLES PUIS DE FIBRES DE FIBRINE ; PUIS DEGRADATION DE LA FIBRINE SOUS L'ACTION DE LA PLASMINE [11].

FpA = Fibrinopeptide A et FpB = Fibrinopeptide B

Le facteur XIII, activé par la thrombine, joue un rôle important dans la stabilisation du caillot puisqu'il permet, par son action transglutaminase [11] de former des liaisons covalentes entre les chaines γ ainsi qu'entre les chaines γ et Aα [8]. Cela permet la génération d'une structure complexe et ramifiée de chaines de fibrine qui stabilise le caillot et améliore ses propriétés viscoélastiques [11]. Le facteur XIIIa permet également de créer des liens entre la fibrine et la fibronectine, et la fibronectine et le collagène permettant ainsi d'amarrer le caillot de fibrine au tissu.

1.4. FIBRINOLYSE

La fibrinolyse est le mécanisme physiologique permettant de dégrader la fibrine et de résorber le caillot sanguin [2]. L'enzyme responsable de cette dégradation protéolytique est la plasmine qui circule au niveau sanguin sous forme d'un zymogène inactif : le plasminogène.

L'enzyme responsable de la conversion du plasminogène en plasmine est l'activateur tissulaire du plasminogène (en anglais tPA, tissue Plasminogen Activator). Il s'agit d'une sérine-protéase produite par les cellules endothéliales [8] qui nécessite comme cofacteur la fibrine. Le « tissue Plasminogen Activator » se lie au niveau de récepteurs endothéliaux et plaquettaires, ce qui restreint son action au lieu de formation du thrombus.

Ainsi, une fois la réaction de dégradation de la fibrine amorcée, de moins en moins de fibrine étant présente, la réaction de transformation du plasminogène en plasmine ralentie. Ainsi la fibrine autorégule sa réaction de dégradation [2].

Une autre sérine-protéase est capable de convertir le plasminogène en plasmine ; il s'agit de l'activateur du plasminogène de type urokinase (appelé en anglais UtPA, Urokinase-type Plasminogen Activator). Cette enzyme est notamment générée par le facteur XIIa, lors de l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation [12].

De nombreuses protéines sont impliquées dans l'inhibition de la fibrinolyse. On trouve principalement :

- l'α2-antiplasmine qui forme un complexe stable et irréversible avec la plasmine.
- l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (appelé en anglais PAI, Plasminogen Activator Inhibitor) qui permet d'interférer avec l'activation du plasminogène.

1.5. MECANISMES DE REGULATION DE LA CASCADE DE COAGULATION

La tendance naturelle du sang à coaguler *in vivo* est régulée par une série d'anticoagulants plasmatiques qui permet de maintenir un équilibre entre saignement et coagulation.

On dénombre cinq principaux systèmes:

- le complexe thrombomoduline-thrombine.
- le complexe protéine C activée et protéine S.
- l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire.
- le cofacteur II de l'héparine.
- l'antithrombine.

1.5.1. COMPLEXE THROMBINE-THROMBOMODULINE

La thrombomoduline présente à la surface de l'endothélium peut se lier à la thrombine, formant ainsi un complexe thrombine-thrombomoduline. La liaison se fait un niveau de l'exosite de la thrombine nécessaire pour la liaison au fibrinogène et pour sa dégradation. Cela génère une diminution de l'activité coagulante de la thrombine. Le complexe thrombomoduline-thrombine est également responsable de l'activation du complexe protéine C [2].

1.5.2. PROTEINE C ACTIVEE

Pour pouvoir fonctionner, la protéine C activée nécessite un cofacteur plasmatique : la protéine S. Ils forment ainsi le complexe de la protéine C activée et protéine S. Ce complexe permet une inhibition des facteurs Va et VIIIa contrôlant ainsi la formation de thrombine autour du caillot.

1.5.3. INHIBITEUR DE LA VOIE DU FACTEUR TISSULAIRE

L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (appelé en anglais TFPI, Tissue Factor Pathway Inhibitor) est responsable du blocage du complexe facteur tissulaire-facteur VII [FT-FVII], au niveau du démarrage de la cascade de la coagulation. Il se comporte comme un pseudo-substrat au sein d'un complexe quaternaire entre facteur tissulaire, facteur VIIa, facteur Xa et inhibiteur de la voie du facteur tissulaire [FT-FVIIa-FXa-TFPI] au niveau de la surface cellulaire. Le complexe est ensuite endocyté, inhibant ainsi le facteur VIIa et le facteur Xa.

Cette inhibition est dépendante du calcium et du facteur Xa [13]. Au niveau plasmatique, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire est retrouvé sous forme inactive au niveau des lipoprotéines plasmatiques et sous forme active au niveau de la surface des cellules endothéliales ainsi que dans le contenu des granules α des plaquettes activées.

Il est à noter que l'administration d'héparine augmente significativement les concentrations d'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ce qui laisse à penser que ce dernier forme un complexe avec les glycosaminoglycanes de la surface endothéliale. La libération de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire de la surface cellulaire pourrait partiellement expliquer l'effet anticoagulant de ces molécules [13].

1.5.4. COFACTEUR II DE L'HEPARINE (HCII)

Le cofacteur II de l'héparine est une serpine qui a la faculté d'inhiber uniquement la thrombine, qu'elle soit liée ou non dans le thrombus. Son rôle exact reste encore mal défini ; cependant il semblerait qu'elle inhibe la thrombine intervenant plutôt dans des rôles non hémostatiques, tels que dans le développement de l'athérosclérose [14, 15]. En effet, il a été démontré que des niveaux élevés d'HCII permettent une protection contre l'athérosclérose et la resténose [2].

L'inhibition de la thrombine est catalysée grâce à l'action cofacteur de molécules polyanioniques sur l'HCII telles que les héparines, l'héparane sulfate et le dermatane sulfate. Cependant, les concentrations nécessaires en héparines ou héparanes pour activer l'HCII sont très supérieures à celles nécessaire pour activer l'AT.

1.5.5. ANTITHROMBINE

1.5.5.1. GENERALITES

Autrefois appelé cofacteur I de l'héparine, l'antithrombine (AT) est une serpine responsable principalement de l'inhibition de la thrombine ; elle est également impliquée dans l'inhibition des facteurs Xa, IXa et dans une moindre mesure, XIa. L'AT agit par un mécanisme d'inhibition suicide, c'est-à-dire qu'il y a établissement d'une liaison irréversible avec la cible. Même si l'AT circule à fortes concentrations plasmatiques (2 à 3 µM [16]), son état est faiblement réactif par rapport aux protéases de la coagulation [17, 18].

Une accélération d'un facteur 1000 de l'action de l'AT est possible en présence d'un cofacteur à action catalytique. Ce cofacteur consiste en une séquence pentasaccharidique très particulière, localisée sur les chaines d'héparanes sulfates en faible proportion (<1%) [2, 19]. L'héparane sulfate et les héparines appartiennent à la famille des glycosaminoglycanes (GAG) : leur structure chimique est donc très similaire et les héparines peuvent également jouer le rôle de cofacteur de l'AT (voir section 2.4.). Les chaines d'héparane sulfate sont trouvées, au niveau physiologique, liés au niveau de l'endothélium vasculaire sain non lésé, et permettent de maintenir la nature non thrombogène de ce dernier. L'AT n'agit donc pas au niveau de la surface plaquettaire, lieu de formation du caillot, mais neutralise les facteurs enzymatiques dès qu'ils diffusent à distance.

Le mécanisme d'action inhibiteur de l'AT sur les protéases de la coagulation est décrit dans le paragraphe suivant.

1.5.5.2. MECANISME D'ACTION DES SERPINES

Les serpines, qui forment une super-famille de protéines à laquelle appartient l'AT, se caractérisent notamment par la structure de leur site inhibiteur et leur mode d'action.

Dans leur état natif, les serpines disposent d'une boucle réactive retrouvée au niveau de leur partie C-terminale supérieure qui permet la liaison aux serine-protéases. L'inhibition d'une protéase permet d'obtenir une stabilisation énergétique de la serpine qui ne se trouve pas sous l'état thermodynamique le plus favorable à l'état natif [2]. Ce mécanisme d'inhibition se décompose en deux temps (Figure 4), avec :

- la rencontre entre la boucle réactive et le site de fixation de la protéase à la serpine, ce qui permet la formation d'un complexe réversible de type Mickaelis.
- le passage du complexe de Mickaelis à un complexe covalent où la protéase est emprisonnée de façon irréversible, sous forme inactive. La serpine est alors stabilisée dans son niveau de plus basse énergie.

Ainsi, la coagulation est un mécanisme physiologique caractérisé par un équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs. Cependant, quand un dérèglement de l'équilibre intervient en faveur d'une hypercoagulation, des pathologies telles que la thrombose et l'embolie surviennent. Afin de rétablir l'équilibre, des molécules, qui permettent de diminuer l'état de

coagulation par activation des systèmes régulateurs (tels que l'AT), peuvent être utilisées. C'est notamment le cas des héparines.

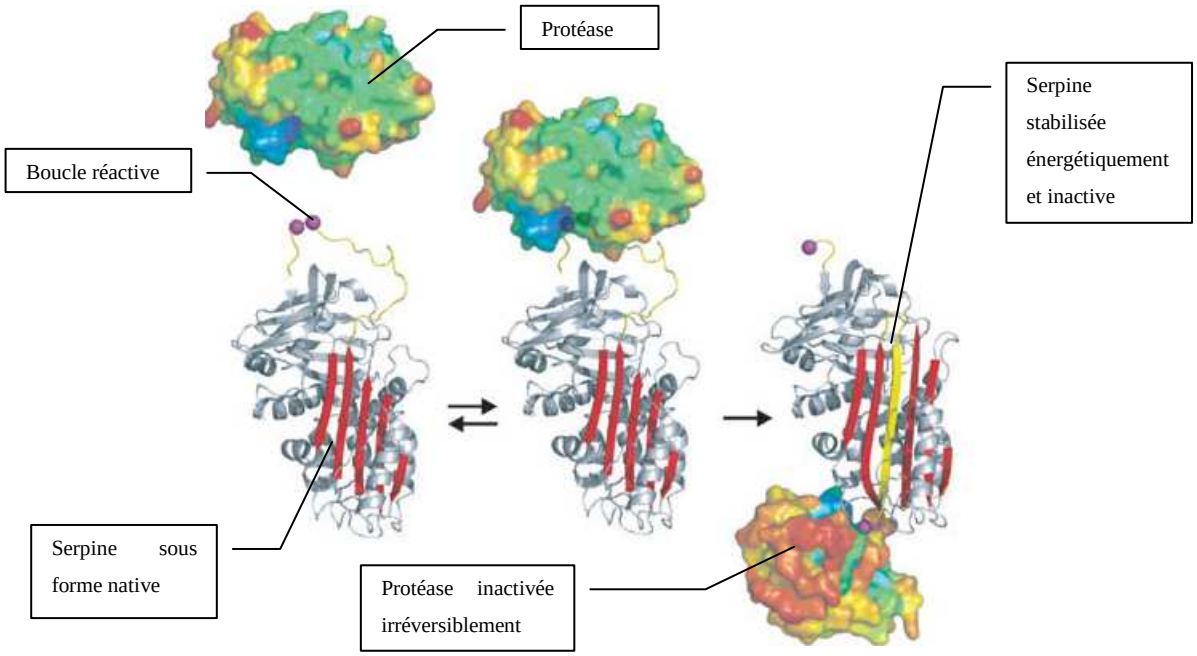


FIGURE 4 : INHIBITION D'UNE PROTEASE PAR UNE SERPINE [2].

A gauche : la serpine est sous sa forme native, cet état n'est pas le plus stable d'un point de vue thermodynamique.

Au centre : la protéase s'approche et se lie avec la boucle réactive formant ainsi un complexe de Mickaelis. Des interactions entre les exosites de la protéase et la serpine aident à la stabilisation du complexe. La protéase catalyse la rupture de la boucle réactive par une attaque nucléophile. Il en résulte la formation d'une liaison covalente entre un des restes de la boucle réactive de la serpine et la protéase.

A droite : Une force de traction exercée sur la liaison covalente crée une distorsion au niveau de la protéase. La protéase change alors de position par basculement. Elle est alors inactivée de façon irréversible : la serpine se trouve à son niveau de plus basse énergie.

1.6 THROMBOSE

1.6.1. THROMBOSE VEINEUSE ET THROMBOSE ARTERIELLE

La thrombose est définie comme une activation pathologique de l'hémostase qui aboutit à des dépôts plaquettaires et / ou fibrineux dans la lumière vasculaire.

La survenue d'une thrombose peut se localiser aussi bien :

- au niveau des artères ou voire des cavités cardiaques (en cas de pathologie cardiaque dite emboligène) on parle alors de thrombose artérielle. La thrombose artérielle survient dans des zones où le sang s'écoule rapidement et avec de fortes contraintes de cisaillement. Le thrombus se compose alors principalement de plaquettes [20]. En effet, les thromboses artérielles se développent souvent sur une lésion pariétale d'athérosclérose. En général, le thrombus est mural et rarement obstructif mais sous l'effet du courant sanguin, il peut se fragmenter et emboliser la microcirculation distale d'agrégats fibrinoplaquettaires. Il est alors responsable des complications organiques cérébrales, cardiaques et rénales de la maladie artérielle et contribue au développement des lésions d'athérosclérose en s'incorporant dans la paroi.
- au niveau des veines ou des petits vaisseaux, on parle alors de thrombose veineuse. La thrombose veineuse survient plutôt dans des conditions hémodynamiques de stase, de débit sanguin réduit et de faibles forces de cisaillement à la paroi. Ces facteurs expliquent la prépondérance de l'accumulation locale de thrombine et l'importance des mécanismes générateurs de thrombine. Ainsi, dans ce cas, le thrombus, se compose principalement de globules rouges insérés dans un réseau abondant de fibrine [20]. Les thromboses veineuses prennent souvent naissance au niveau des membres inférieurs, bien qu'elles puissent aussi se développer en n'importe quel point du système veineux.

Des déficits héréditaires en inhibiteurs de la coagulation (déficit en AT, en protéine C et en protéine S) sont des facteurs reconnus qui prédisposent à la thrombose veineuse [21]. Il existe un grand nombre d'autres facteurs de risques pour cette maladie tels qu'un âge avancé, les actes chirurgicaux, l'immobilisation, la survenue de traumatismes, le cancer, les modifications hormonales (grossesse, traitements hormonaux substitutifs de la ménopause) [22].

1.6.2. TRAITEMENTS ANTICOAGULANTS

Dans la plus part des cas, le traitement à la phase aiguë de l'épisode thrombotique comporte un médicament anticoagulant. Généralement, ce médicament est, encore à ce jour, soit une héparine non fractionnée (HNF), soit une héparine de bas poids moléculaire (HBPM) ou soit le fondaparinux, un pentasaccharide de synthèse apparu sur le marché plus récemment.
L'HBPM a supplanté l'HNF, molécule de référence jusqu'au début des années 90. En effet, de par une biodisponibilité et une demi-vie supérieure à celles de l'HNF, l'HBPM permet de diminuer la fréquence des injections. De plus, le risque de thrombopénie induite est beaucoup plus faible. Cependant, l'HNF reste utilisée dans certains cas particuliers tel que l'insuffisance rénale.

Pour la prévention primaire et pour la prévention de la récidive de la thrombose veineuse et des complications thrombotiques lors des cardiopathies emboligènes, il est fait souvent appel à un traitement anticoagulant pour une semaine, des mois voire des années. En général, suite au traitement par héparine en phase aiguë, un traitement par antivitamine K est institué en relais pour le long cours. La durée recommandée pour le traitement initial par héparine est d'au moins 5 jours. L'administration d'héparine est stoppée au moment où, lors du relais par l'antivitamine K, un INR supérieur à 2,0 est obtenu pendant 24 heures [23]. Cependant, dans certaines indications telles que la survenue d'une thrombose chez un patient cancéreux ou chez une femme enceinte, c'est un traitement au long cours par une HBPM qui est préconisé.

Ainsi, l'héparine est largement utilisée depuis des dizaines d'années pour les traitements aussi bien préventifs que curatifs de la thrombose. Comme nous allons le voir dans le chapitre suivant, cette substance active d'origine animale possède une nature hétérogène très particulière. Cette hétérogénéité joue un rôle décisif aussi bien au niveau de son mécanisme d'action qu'au niveau des valeurs de ces paramètres pharmacocinétiques.

2. L'HEPARINE, UN MELANGE HETEROGENE DE MOLECULES

2.1. HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DE L'HEPARINE

L'héparine a été découverte en 1916 par J. MacLean, un étudiant en médecine, qui démontra qu'un extrait de foie de chien prolongeait, *ex vivo*, le temps de coagulation d'un plasma. Sept ans plus tard, son professeur, le Dr. Howell, réussit à isoler et à purifier l'héparine. Il lui donne le nom qu'elle porte encore aujourd'hui, dérivant du grec « hepar » qui signifie foie, rappelant ainsi l'organe dont elle a été extraite pour la première fois [24]. En 1939, Crafford met en évidence l'efficacité de l'héparine sur la thrombose expérimentale. Dès le début des années 40, les héparines vont être utilisées en clinique, et ce, bien avant l'utilisation des antagonistes de la vitamine K. Aujourd'hui l'héparine reste encore l'un des anticoagulants les plus utilisés en clinique aussi bien pour la prophylaxie que pour le traitement de nombreuses pathologies thrombotiques.

2.2. OBTENTION DE L'HEPARINE

2.2.1. GENERALITES

L'héparine est composée par un mélange hétérogène de molécules polysaccharidiques d'origine biologique. Ces molécules sont exprimées au niveau des cellules mastocytaires du tissu conjonctif. Elles dérivent de protéoglycanes de masse moléculaire très importante (750 000 à 1 000 000Da) constitués par une partie protéique unique sur laquelle s'attachent de nombreuses chaines d'héparine, de masse moléculaire comprise entre 60 000 et 100 000 Da. Ces chaines d'héparine sont ensuite clivées aléatoirement par une endoglucosidase ce qui permet de réduire leur longueur et donc leur masse moléculaire (comprise entre 5 000 et 25 000 Da). Ce mélange hétérogène est stocké dans les granulations du cytoplasme des cellules mastocytaires [25].

Les mastocytes étant présents notamment au niveau de la muqueuse du tube digestif et des bronches, l'extraction de l'héparine se fait donc à partir de ces organes chez des animaux d'élevage (muqueuse intestinale de porc et muqueuse pulmonaire de bœuf). L'hétérogénéité de la matière première est à l'origine de l'existence des variations de masse moléculaire mises en évidence dans les préparations commerciales d'héparine [26].

L’extraction des héparines est suivie par une purification réalisée par précipitation puis dépyrogénation.

Un autre type d’héparine, l’Héparine dite de Bas Poids Moléculaire (HBPM), est préparée à partir de l’héparine non fractionnée (HNF), par dépolymérisation. La masse moléculaire d’une HBPM est donc plus faible que celle d’une HNF et comprise généralement entre 2 000 et 9 000 Da, avec une masse moyenne centrée sur 4 000 à 5 000 Da [27].

2.2.2. METHODES DE DEPOLYMERISATION

Il existe des méthodes de dépolymérisation chimique et enzymatique. Les méthodes chimiques consistent soit :

- en une rupture des ponts glucosidiques après désamination des résidus glycosamines par l’acide nitreux (méthode de préparation de la nadroparine).
- en un clivage alcalin des ponts glycosidiques avec hydrolyse des groupes esters (méthode de préparation de l’énoxaparine).

La méthode enzymatique utilise une héparinase bactérienne (*Flavobacterium heparinum*) qui permet la libération d’un acide uronique insaturé en bout de chaine par clivage des ponts α (1-4)-glycosidiques (méthode de préparation de la tinzaparine) [24].

Chaque HBPM, dérivant de méthodes de dépolymérisation différentes, possède une composition spécifique en chaines polysaccharidiques qui lui confère des propriétés distinctes. Ainsi, chaque spécialité à base d’HBPM est développée pour une application spécifique, à une dose donnée : les informations la concernant ne sont pas interchangeables avec celles des autres HBPM. Les HBPM ne sont pas équivalentes d’un point de vue thérapeutique.

C’est pour cela qu’il est primordial de connaître la structure de l’héparine (homologies et différences) ainsi que le mécanisme d’action de l’héparine sur la cascade de la coagulation.

2.3 STRUCTURE DES CHAINES D'HEPARINES

2.3.1. HEPARINE, UNE MOLECULE DE LA FAMILLE DES GLYCOSAMINOGLYCANES

L'héparine appartient à la famille des glycosaminoglycanes (GAG). Les GAG sont parfois également appelés mucopolysaccharides en raison de leur texture visqueuse, identique à celle des sécrétions muqueuses [28].

Il s'agit de molécules saccharidiques complexes de grande taille, retrouvées au niveau de la matrice extracellulaire de toutes les cellules animales. Certaines d'entre elles sont connues pour réguler un certains nombre de protéines (ex : cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, enzymes et molécules d'adhérence) impliquées dans une multitude de processus physiologiques et pathologiques.

D'un point de vue chimique, les GAG sont des polysaccharides linéaires, chargés négativement, de masse moléculaire comprise entre 10 000 et 100 000 Da. En solution aqueuse, les GAG s'entourent d'une couronne de molécules d'eau occupant ainsi un énorme volume hydrodynamique. Il existe deux types de GAG :

- des GAG non sulfatés tel que l'acide hyaluronique.
- des GAG sulfatés tels que la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le kératane sulfate, les héparanes sulfates et les héparines.

Les chaines glycosaminoglycanes sont constituées d'une unité disaccharidique répétitive. Cette unité disaccharidique se compose :

- d'un acide uronique (acide L-iduronique ou l'acide D-glucuronique).
- d'un sucre aminé (D-glucosamine ou D-galactosamine).

Les GAG diffèrent par les types d'unité hexosamine, hexose ou acide hexuronique formant le disaccharide, ainsi que par le type de liaison glycoside qui les relie. Nous allons maintenant décrire plus particulièrement la structure du disaccharide de base des héparines.

2.3.2. STRUCTURE DE BASE : LE DISACCHARIDE

L'unité de base disaccharidique composant les chaines polysaccharidiques linéaires de l'héparine consiste en (Figure 5) :

- une unité d'acide pyranosyluronique (acide uronique).
- et une unité 2-amino-2-déoxyglucopyranose (glucosamine).

Ces unités sont reliées par une liaison 1-4.

L'unité acide uronique est constituée de 90% d'acide L-idopyranosyluronique (ou acide L-iduronique) et de 10% d'acide D-glucopyranosyluronique (ou acide D-glucuronique) [29].
L'acide uronique et la glucosamine peuvent ou non être substitués par des groupements fonctionnels, notamment sulfate, parfois acétyle. Ainsi, le disaccharide de base est le plus fréquemment trisulfaté (Figure 5 (B.1.)) mais on observe également (Figure 5 (B.2.)) d'autres modifications telles que la substitution :

- du groupe amine de la glucosamine par un groupement acétyle ou sulfate.
- des positions 3 et 6 de la glucosamine par un groupement O-sulfate.
- de la position 2 de l'acide uronique par un groupement O-sulfate.

Ainsi, le nombre important de variations structurales de l'unité disaccharidique et leur enchainement aléatoire conduit à une très grande micro-hétérogénéité des chaines d'héparine. Cette diversité chimique est la cause de la diversité de l'activité biologique. En effet, l'activité anticoagulante des héparines n'est pas due au disaccharide de base mais à une structure très spécifique de 5 sucres, appelée pentasaccharide.

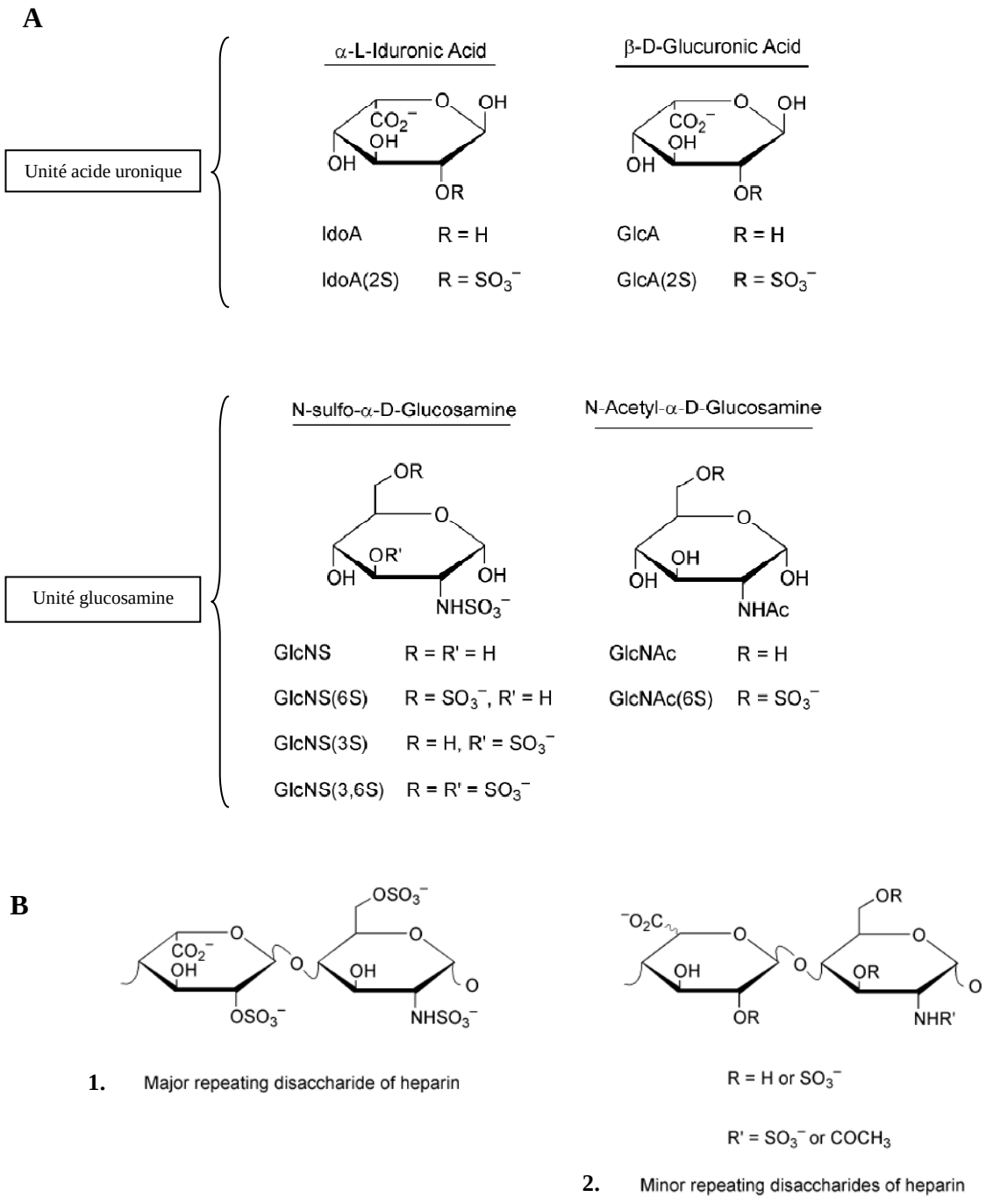


FIGURE 5 : CONSTITUANTS DES CHAINES D'HEPARINE.

(A) MONOSACCHARIDES

(B)1. DISACCHARIDE DE BASE TRISULFATE DES HEPARINES.

(B)2. MODIFICATIONS DU DISACCHARIDE DE BASE PAR SULFATATION ET ACETYLATION [25].

2.3.4. DOMAINE T ET DOMAINE C

L'inhibition du facteur IIa de la cascade de la coagulation nécessite, en plus du pentasaccharide, un site de liaison à la thrombine appelé « domaine T ». Ce site de liaison additionnel est d'une longueur de 13 sucres, sans particularités structurales. Il doit juste se trouver lié à l'extrémité non réductrice du pentasaccharide [30]. Cette association domaine A et domaine T est appelée domaine C (C pour Choay). Ainsi les chaines d'héparines capables d'inhiber la thrombine possèdent donc une longueur minimale de 5 + 13 soit 18 sucres [31], ce qui correspond à une masse moléculaire de 5 400 Da.

Cependant, comme la distribution du pentasaccharide est aléatoire, il existe une proportion importante de chaines d'héparines avec une longueur moyenne (de l'ordre d'une vingtaine de saccharides) qui possèdent le pentasaccharide en leur milieu de chaine [32] ce qui fait que les sucres présents de chaque côté du pentasaccharide ne sont pas assez nombreux pour former un domaine T. Ainsi, bien que supérieure à 18 saccharides, la longueur de ces chaines n'est pas suffisante pour pouvoir entrer en liaison avec la thrombine.

Cependant, le pentasaccharide n'est pas retrouvé sur toutes les chaines d'héparines permettant ainsi de différencier des chaines actives et des chaines non actives sur la coagulation.

2.4 MECANISME D'ACTION DES HEPARINES SUR LA CASCADE DE LA COAGULATION

L'héparine n'a pas d'action directe sur les facteurs de la cascade de la coagulation : elle est en fait un cofacteur de l'AT, un des principaux inhibiteurs plasmatiques naturels de la coagulation. Grâce à la présence de l'héparine, l'inhibition médiée par l'AT est 1 000 à 10 000 fois supérieure à celle obtenue en présence d'AT seule [33].

L'AT, en présence d'héparine, inhibe les facteurs Xa et IIa de la cascade de la coagulation par des mécanismes différents. Cependant, ces deux mécanismes ont un point en commun : la liaison de l'AT sur l'héparine au moyen de la séquence pentasaccharide.

2.4.1. INHIBITION DU FACTEUR Xa

Cette fixation permet une modification de la boucle réactive de l'AT (Figure 6c). Cette activation allostérique constitue une modification suffisante pour permettre la fixation du

facteur Xa sur l'AT (Figure 6d) [2, 18]. L'AT passe ensuite dans une conformation très stable d'un point de vue énergétique permettant un emprisonnement irréversible du facteur Xa et, en parallèle, une libération de l'héparine qui peut alors de nouveau agir avec une autre molécule d'AT (Figure 6f).

2.4.2. INHIBITION DU FACTEUR IIa

En revanche, la fixation du pentasaccharide sur l'AT n'est pas suffisante pour affecter le taux d'inhibition du facteur IIa. En effet, l'inhibition du facteur IIa se fait selon un mécanisme de pontage dans lequel la chaine d'héparine constitue un support privilégié pour l'AT et la thrombine qui peuvent ainsi interagir plus facilement l'une avec l'autre (Figure 6e). Dans ce cas, seules les chaines d'héparine de plus de 18 sucres contenant à la fois un domaine T (pour la liaison de la thrombine) et un domaine A (pour la fixation de l'AT) permettent la formation de ce complexe ternaire [AT-thrombine-héparine]. A la différence de l'AT qui se lie très spécifiquement avec l'héparine, la liaison héparine-thrombine, est non spécifique et réalisée avec toute chaine d'héparine d'une longueur supérieure à 6 saccharides [18] par un mécanisme dépendant des charges [27]. Il y a interaction entre des charges positives portées par la thrombine et les charges négatives du domaine T.

Enfin, un changement de conformation de l'AT permet un emprisonnement irréversible du facteur IIa et une libération de la chaine d'héparine pouvant de nouveau agir avec une molécule d'AT et de thrombine (Figure 6f).

Ainsi, par l'intermédiaire de l'AT, les chaines actives d'héparines de longueur inférieure à 18 saccharides, permettent uniquement une inhibition du facteur Xa alors que les chaines actives d'une longueur supérieure à 18 saccharides peuvent inhiber le facteur Xa et le facteur IIa.

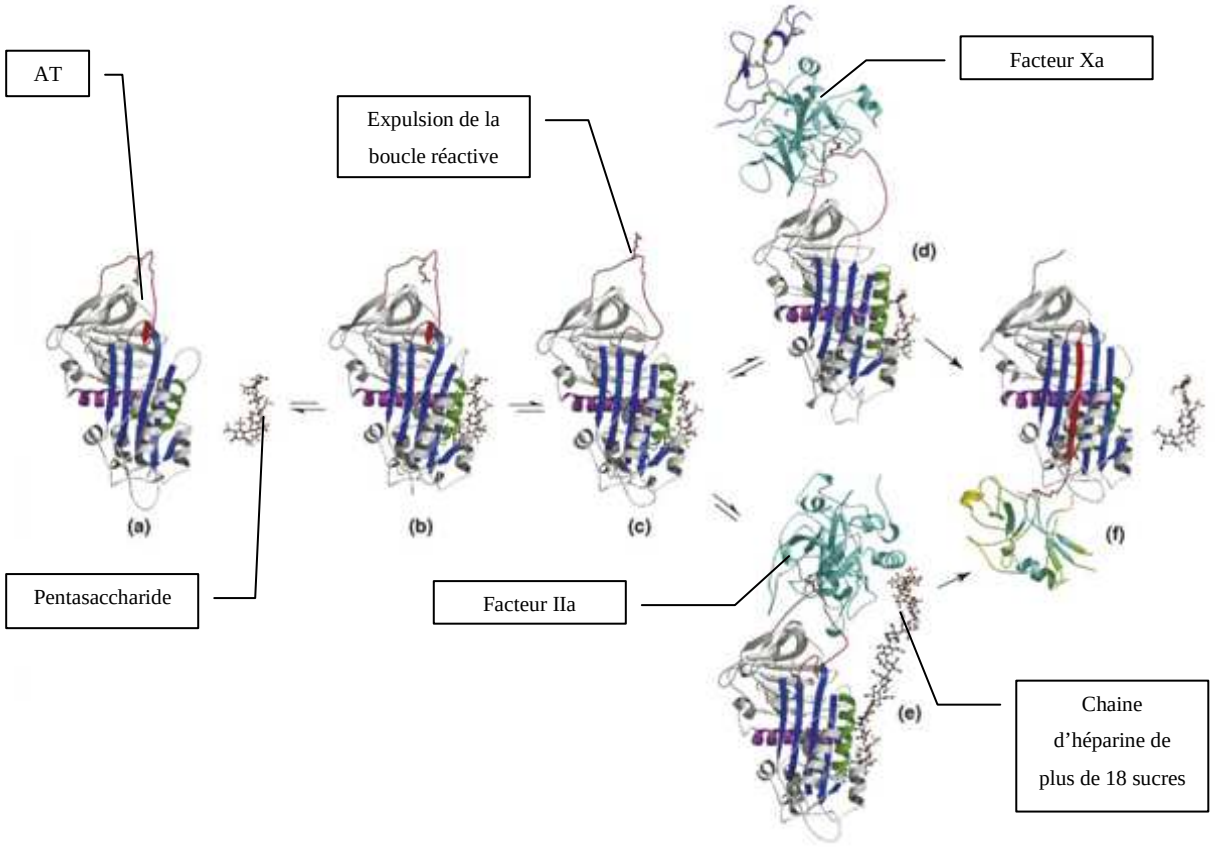


FIGURE 6 : MECANISME DE L'INHIBITION DES FACTEURS Xa ET IIa PAR L'AT ET L'HEPARINE [18].

(a) AT sous forme native et pentasaccharide. Ils entrent en interaction selon un processus en deux étapes, décrites en (b) et (c).

(b) Etablissement de liaisons faibles entre la séquence pentasaccharide et l'AT.

(c) Changement conformationnel de l'AT qui aboutit à l'expulsion de la boucle réactive : l'AT est ainsi activée par les chaines d'héparine et peut reconnaitre la protéase cible (facteur Xa ou facteur IIa) par deux mécanismes distincts.

(d) Cas 1 : inhibition du facteur Xa (ou IXa)

L'extension de la boucle réactive de l'AT permet l'établissement de contacts avec le facteur Xa (ou IXa) conduisant ainsi à l'inhibition définitive (f).

(e) Cas 2 : inhibition du facteur IIa

Le facteur IIa établit des contacts avec l'AT mais cette liaison, contrairement au cas de l'inhibition du facteur Xa, est indépendante de l'expulsion de la boucle réactive. L'accélération de l'inhibition de la thrombine nécessite des chaines d'héparines de longueur supérieure à 18 sucres, capables de servir de support pour la fixation de l'AT et de la thrombine.

(f) Inhibition définitive des protéases par formation d'un complexe irréversible AT-protéase entrainant une libération de l'héparine.

2.5. CLASSIFICATION DES CHAINES D'HEPARINE EN FONCTION DE LEUR ACTIVITE BIOLOGIQUE

La présence ou non le long d'une chaine d'héparine de la séquence pentasaccharidique permet de la classer [16] soit dans le groupe du :

- « Low Affinity Material» (LAM) pour les chaines qui ne contiennent pas cette séquence et dont l'action biologique est non-spécifique de l'antithrombine.
- « High Affinity Material» (HAM) pour les chaines qui contiennent cette séquence et dont l'action biologique est spécifique de l'antithrombine.

2.5.1. « LOW AFFINITY MATERIAL » (LAM)

Il s'agit de chaines d'héparines constituées par la répétition du disaccharide de base trisulfaté formant ainsi des régions dites « régulières ». Elles représentent environ deux tiers des chaines constituant l'héparine. Etant donné qu'elles ne contiennent pas la séquence pentasaccharide, leur action biologique est non-spécifique de l'AT. Ainsi, elles n'ont pas d'action anticoagulante. En revanche, cela ne veut pas dire qu'elles ne sont pas actives sur d'autres phénomènes biologiques. En effet, ces zones possèdent la structure des héparines (et donc les nombreuses propriétés des molécules de type GAG) mais sans les effets anticoagulants. Ainsi ces fractions ont notamment démontré des propriétés anticancéreuses sans apporter d'effets secondaires [34].

2.5.2. « HIGH AFFINITY MATERIAL » (HAM)

Il s'agit des chaines qui contiennent le pentasaccharide et dont l'action biologique est spécifique de l'antithrombine [35]. Elles représentent environ un tiers des chaines constituant l'héparine [36].

D'un point de vue structurel, elles sont composées, en plus de la région irrégulière contenant le pentasaccharide, d'autres régions, principalement régulières (c'est-à-dire avec répétition du disaccharide de base). La longueur de ces autres régions conditionne la longueur totale de la chaine d'héparine et par conséquent sa masse moléculaire. Or la longueur des chaines d'héparine contenant le pentasaccharide est un paramètre critique pour l'action biologique des héparines. En effet, l'AT peut interagir principalement avec deux des facteurs de la cascade de la coagulation, le facteur Xa et le facteur IIa et cette action est très dépendante de la

longueur des chaines. Ainsi, on peut subdiviser les chaines constituant le HAM (Figure 7), en deux sous-groupes en fonction de leur longueur critique.

2.5.3. « BELOW CRITICAL CHAIN LENGTH MATERIAL » (BCLM)

Si les chaines contenant le pentasaccharide ont une longueur inférieure à 17 sucres (correspondant à une masse moléculaire inférieure à 5 400 Da), il y a inhibition uniquement du facteur Xa.

2.5.4. « ABOVE CRITICAL CHAIN LENGTH MATERIAL » (ACLM)

Si les chaines contenant le pentasaccharide ont une longueur supérieure à 17 sucres (correspondant à une masse moléculaire supérieure à 5 400 Da), il y a inhibition du facteur Xa et IIa.

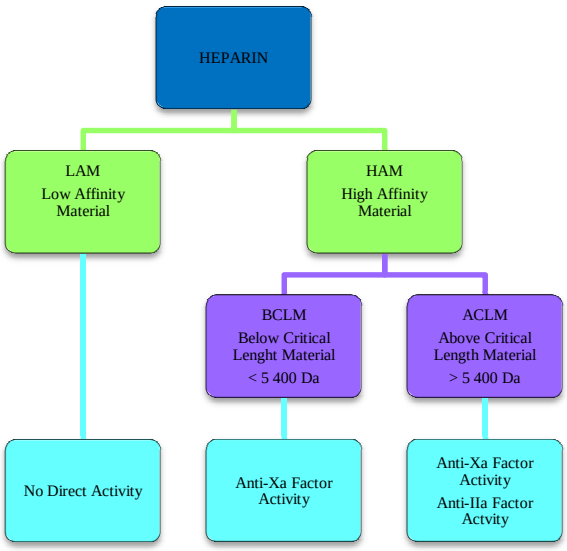


FIGURE 7 : DIVISION DES CHAINES D'HEPARINE EN « LOW AFFINITY MATERIAL » ET « HIGH AFFINITY MATERIAL » [16].

2.5.5. LES HEPARINES : UN MELANGE DE LAM, ACLM ET BCLM

Les différentes préparations d'héparines, très hétérogènes, peuvent être considérées comme un mélange en différentes proportions de LAM, ACLM et BCLM. Ainsi les HNF et les HBPM contiennent toutes les deux du LAM, en revanche c'est la proportion relative de ACLM / BCLM qui permet de les différencier.

Les Héparines Non Fractionnées (HNF), qui possèdent une masse moléculaire importante, sont majoritairement composées de longues chaines (d'un masse supérieure à 5 400 Da) d'où une activité ACLM très marquée par rapport à l'activité BCLM. Cela explique le fait que ces molécules inhibent surtout le facteur IIa de la cascade de la coagulation et dans une moindre mesure le facteur Xa. Ces héparines agissant fortement sur le facteur IIa, en aval de la cascade de la coagulation, sont des molécules dites anticoagulantes.

Les Héparines de Bas Poids Moléculaire (HBPM), qui ont une masse moléculaire plus faible due à la forte proportion de chaines courtes, présentent une activité BCLM très importante par rapport à l'activité ACLM. Cela explique le fait qu'elles inhibent préférentiellement le facteur Xa de la cascade de la coagulation. Elles sont donc dites anti-thrombotiques.

2.5.6. CONFORMATION DES CHAINES D'HEPARINES

En tant que polysaccharide linéaire, sans chaines, l'héparine à tendance à avoir en solution une conformation allongée, de type hélicoïdale (Figure 8), du fait de sa nature hautement hydrophile relative à son important degré de sulfatation [29]. Par opposition aux protéines, l'héparine n'adopte pas de conformation tertiaire. La spécificité de ses interactions avec une grande variété de protéines provient plutôt de l'exposition des groupements sulfates et carboxyliques dans des orientations spécifiques, reliée avec la grande flexibilité conformationnelle de l'acide L-iduronique.

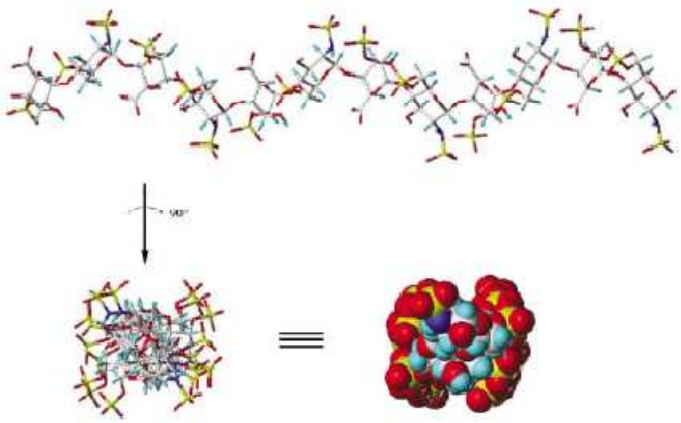


FIGURE 8 : CONFORMATION EN HELICE D'UNE SEQUENCE DODESACCHARIDIQUE D'HEPARINE CONTENANT UNE REPETITION DU DISACCHARIDE DE BASE [29].

En haut, vue latérale et en bas, vue après une rotation de 90°.

En jaune = atome de soufre, en rouge = atome d'oxygène, en bleu foncé = atome d'azote et en bleu cyan = atome d'hydrogène.

2.6. CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES CHAINES D'HEPARINE

Par opposition aux molécules d'un composé pur qui possèdent toutes la même masse moléculaire, les héparines en tant que molécules polymériques polydisperses sont composées de chaines de masses moléculaires différentes. Les propriétés physicochimiques résultantes (telles que le pKa, la solubilité, le degré de sulfatation de l'unité disaccharidique) sont également dépendantes de cette hétérogénéité de composition.

2.6.1. METHODES DE DEPOLYMERISATION ET FRACTIONS DE MASSE MOLECULAIRE

La méthode de dépolymérisation employée pour préparer les HBPM va conditionner la longueur des chaines obtenues ainsi qu'une modification des saccharides présents en bout de chaines.

Ainsi, d'une part, il est possible de différencier les HBPM les unes des autres par détermination des sucres caractéristiques présents au niveau des extrémités réductrices et non réductrices de chaque chaine. Par exemple, la tinzaparine, obtenue par une méthode de dépolymérisation enzymatique, présente un acide uronique 4,5 insaturé à son extrémité non réductrice alors que la nadroparine porte un 2,5-anhydro-D-mannose à son extrémité réductrice (Tableau 2) [37].

D'autre part, en fonction de la méthode utilisée (chimique, enzymatique), les chaines obtenues ne possèdent pas la même taille. Il est ainsi possible de définir quelle est la proportion de chaines de très faible masse moléculaire (c'est-à-dire inférieure 2 000 Da) et quelle est la fraction de chaine de masse moléculaire élevée (c'est-à-dire supérieure à 8 000 Da). Les HBPM possédant une proportion élevée de chaines de grande taille (cas de la tinzaparine et de la daltéparine), c'est-à-dire supérieure à 5 400 Da, ont tendance à présenter une activité anti-IIa assez marquée conduisant à un rapport anti-Xa/anti-IIa faible (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). A l'opposé, les HBPM composées principalement de chaines courtes (cas de la nadroparine), vont présenter une activité anti-IIa basse alors que l'activité anti-Xa est importante : leur rapport anti-Xa/anti-IIa est donc assez élevé. Le fait que les chaines d'héparine soient de longueur hétérogène conduit à la détermination d'une masse moléculaire moyenne, permettant de les caractériser de façon plus simple et pratique.

2.6.2. MASSE MOLECULAIRE MOYENNE ET INDICE DE POLYDISPERSITE

2.6.2. MASSE MOLECULAIRE MOYENNE ET INDICE DE POLYDISPERSITE

Les héparines, en tant que molécules polymériques linéaires polydispersées ne peuvent pas être décrites par une masse moléculaire fixe comme pour les molécules traditionnelles. On utilise donc une masse moléculaire moyenne.

Cependant, il existe différentes méthodes de calcul qui accordent une importance égale à la contribution de masse de chaque chaine (masse moléculaire en nombre) ou qui prennent plutôt en compte le fait que les chaines de masse moléculaire élevée apportent une contribution plus importante à la masse moléculaire totale que les chaines de faible masse moléculaire (masse moléculaire en masse). Ces deux types de masses moléculaires moyennes se calculent suivant les formules suivantes [32] :

- masse moléculaire moyenne en nombre : $Mn = \frac{\sum NiMi}{\sum Ni} = \sum XiMi$
- masse moléculaire moyenne en masse : $Mw = \frac{\sum NiMi^2}{\sum Ni} = \frac{\sum XiMi^2}{\sum Xi} = \sum wiMi$

  Ni : nombre de molécules de masse moléculaire *(Mw)* égale à *Mi*

  Xi : fraction en nombre de molécules de masse moléculaire *Mw*

  Wi : fraction en masse de molécules de masse moléculaire *Mw*

Différentes techniques analytiques permettent de mesurer soit la masse moléculaire moyenne en nombre (osmométrie) soit la masse moléculaire moyenne en masse (viscosimétrie, diffraction) soit les deux (chromatographie liquide haute performance d'exclusion de taille et électrophorèse « fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis ») [38].

Afin de définir plus précisément le profil de masse moléculaire, il est possible de calculer un indice de polydispersité. La polydispersité exprime l'étendue des masses moléculaires qui composent l'échantillon et se calcule par la formule suivante [32] :

$$I = Mw\ /Mn$$

Les masses moléculaires moyennes en masse sont plus utilisées que celles en nombre car elles s'approchent plus de la réalité et relatent mieux l'existence d'une proportion de chaines d'une masse moléculaire importante. Ainsi, il est aisé de se rendre compte que la tinzaparine, qui possède la masse moléculaire moyenne en masse la plus importante (6 500 Da), est également

l'HBPM qui contient la plus forte proportion de chaines très longues, de masse supérieure à 8 000 Da (Tableau 2). A l'opposé, la nadroparine et l'énoxaparine, dont les masses moléculaires moyennes en masse sont plus petites (4 500 et 4 300, respectivement) contiennent une proportion plus faible de chaines longues.

En pratique, l'indice de polydispersité qui décrit la dispersion par rapport à la moyenne n'est pas une donnée accessible facilement dans la littérature et n'est pas utilisé en pratique dans le cas des héparines.

2.6.3. pKa

L'héparine est une des molécules naturelles les plus acides. En effet, elle contient de nombreux groupements fonctionnels acides, de trois types différents (acide carboxylique, monoester de sulfate et sulphamide).

Les deux derniers possèdent un pKa très faible, compris entre 0,5 et 1,5, alors que les groupements carboxyles sont moins acides, de pKa entre 2 et 4. Ces différents groupements apportent leur contribution au pKa global de la molécule qui dépend notamment de la composition en saccharide et également de la charge globale. En ce qui concerne la molécule d'héparine, le pKa est d'environ 3 [39].

2.6.4. CHARGE, SOLUBILITE, ET DEGRE DE SULFATATION

En solution aqueuse, le pH étant supérieur au pKa des héparines, les groupements carboxyles et sulfates des héparines sont déprotonés, conférant ainsi à l'héparine le statut de molécule la plus fortement chargée parmi toutes les macromolécules biologiques connues. Ainsi, une chaine d'HNF de 15 000 Da, constituée par une unité disaccharide de base contenant en moyenne 2,7 groupements sulfate, possède une charge globale de – 75 [29]. Les HBPM, possèdent un disaccharide de base légèrement moins sulfaté (1,8 à 2,6, **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Cependant, que ce soit pour les HNF ou les HBPM, la forte charge de ces molécules leur confère une bonne solubilité dans l'eau (1g d'HNF pour 20 mL d'eau / 1 g d'HBPM pour 10 mL d'eau). En revanche, elles sont pratiquement insolubles dans les solvants organiques.

Les héparines étant chargées négativement, elles se présentent commercialement sous forme de sels de calcium, de sodium ou de magnésium.

TABLEAU 2 : CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES ET CARACTERISTIQUES D'ACTIVITE DES HEPARINES.

Héparine	Méthode de dépolymérisation	Sucre composant les extrémités réductrices et non réductrices Degré de sulfatation de l'unité disaccharide de base	% en masse de chaines de masse moléculaire				Mw pharmacopée (valeur moyenne)	Mw expérimentale	Mn expérimentale	I	Rapport anti-Xa/anti-IIa (pharmacopée) expérimental	A. a-Xa (U anti-Xa/mg) A a-IIa (U anti-IIa / mg)
			< 2 000 Da	(2 000-4 000) Da	(2 000-8 000) Da	> 8 000 Da						
HNF calcique	Pas de dépolymérisation	NR	NR	NR	NR	NR	NR	16 890 [38]	10 620 [38]	1,590 [38]	NR	A a-Xa (NR) A a-IIa (NR)
Enoxaparine sodique	Dépolymérisation alcaline du dérivé ester benzylique de l'héparine	ER : NR ENR : 4-énopyranose DS = 2	12 - 20%	NR	68 - 88%	NR	3 500 – 5 500 (4 500)	4 000 [38]	3 240 [38]	1,235 [38]	(3,3 – 5,3) 3,9 [32]	A a-Xa (90-125) A a-IIa (NR)
Dalteparine sodique	Dépolymérisation chimique (acide nitreux)	ER : Acide 2-O-sulfo-α-L-idopyranosuronique ENR : 6-O-sulfo-2,5-anhydro-D-mannitol DS = 2,0 à 2,5	(< 3 000) < 13%	NR	NR	15-25%	5 600 – 6 400 (6 000)	6 110 [38]	5 565 [38]	1,098 [38]	(1,9 – 3,2) 2,5 [32]	A a-Xa (110-210) A a-IIa (35-100)
Tinzaparine sodique	Dépolymérisation enzymatique (Flavobacterium heparinum)	ER : Acide 2-O-sulfo-4-ènepyranosuronique ENR : 2-N, 6-O-disulfo-D-glucosamine DS = 1,8 à 2,5	< 10%	NR	60 - 70%	22 - 36%	5 500 – 7 500 (6 500)	6 500 [32]	NR	NR	(1,5 – 2,5) 1,6 [32]	A a-Xa (70-120) A a-IIa (NR)
Parnaparine sodique	Catalyse radicalaire par peroxyde d'hydrogène	ER : 2-N,6-O-disulfo-D-glucosamine ENR : acide 2-O-sulfo-α-L-idopyranosuronique DS = 2,0 à 2,6	(< 3 000) < 30%	NR	(3 000-8 000) 50 – 60 %	NR	4 000 – 6 000 (5 000)	NR	NR	NR	(1,5 – 3,0) 2,3 [32]	A a-Xa (75-110) A a-IIa (NR)
Nadroparine calcique	Dépolymérisation chimique (acide nitrique) puis fractionnement	ER : 6-O-sulfo-2,5-anhydro-D-mannitol ENR : acide 2-O-sulfo-α-L-idopyranosuronique DS ≈ 2	< 15%	35 - 55%	75 - 95%	-	3 600 – 5 000 (4 300)	NR	NR	NR	(2,5 – 4,0) 3,3 [32]	A a-Xa (95-130) A a-IIa (NR)
Bemiparine	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	3 600 [32]	NR	NR	(NR) 9,7 [32]	A a-Xa (NR) A a-IIa (NR)
Reviparine	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	4 455 [38]	4 920 [38]	1,098 [38]	(NR) 4,2 [32]	A a-Xa (NR) A a-IIa (NR)

Pour des raisons de lisibilité du tableau, quand la source n'est pas indiquée entre crochet, cela signifie que les informations ont été extraites de la Pharmacopée Européenne, 4ème édition.

NR = Non renseigné
ER = Extrémité réductrice
ENR = Extrémité non réductrice
Mw = masse moléculaire moyenne en masse
Mn = masse moléculaire moyenne en nombre
I = indice de polydispersité
A. a-Xa = activité anti-Xa
A a-IIa = activité anti-IIa

2.7. EVALUATION DE L'ACTIVITE DES HEPARINES

L'héparine, agissant par un mécanisme de catalyse médié par l'antithrombine, la simple détermination de la concentration plasmatique en héparine ne peut pas être mise en relation avec l'activité biologique.

Comme une mesure directe de l'activité physiologique des héparines n'est pas possible (évaluation de la taille du thrombus), des méthodes secondaires, reflétant la capacité de l'héparine à inhiber ses cibles doivent être utilisées. On trouve ainsi :

- des tests de coagulation qui détermine l'action des héparines sur plusieurs facteurs de la coagulation en même temps.
- des tests mesurant spécifiquement l'inhibition des facteurs Xa et IIa.

2.7.1. MESURE DES TEMPS DE COAGULATION

Les temps de coagulation mesurent le temps de latence avant l'explosion de la génération de thrombine [40].

2.7.1.1. TEMPS DE CEPHALINE AVEC ACTIVATEUR (TCA)

En anglais ce test est appelé « activated partial thromboplastin time » (aPTT). Il explore la voie intrinsèque (facteurs I, II, V, IX, X, XI et XII) de la coagulation en mesurant le temps de coagulation d'un plasma citraté décalcifié, déplaquetté en présence d'un équivalent plaquettaire (la céphaline), d'un activateur des facteurs contacts et de calcium [41]. L'inhibition du facteur IIa suite à l'action de l'héparine, entraîne un défaut d'activation des facteurs V et VIII. Cela retarde alors la génération de thrombine allongeant ainsi le temps de céphaline activée.

Les HBPM qui inhibent peu la thrombine comparé aux HNF provoquent un moindre allongement du TCA. Ainsi cette méthode est utilisée en routine pour la surveillance journalière des traitements par HNF [42].

2.7.1.2. TEMPS DE QUICK

Ce test explore la voie extrinsèque de la coagulation (facteurs I, II, V, VII, X). Cette méthode utilise du plasma sanguin citraté, déplaquetté et recalcifié mis en présence de thromboplastine tissulaire. Les résultats s'expriment souvent en ratio par rapport à un plasma témoin, sous forme soit de taux de prothrombine ou soit d'INR (International Normalized Ratio) dans le cas de la surveillance des traitements par antivitamine K [1]. Les kits commerciaux contiennent une molécule qui neutralise l'héparine afin de ne pas prendre en compte l'héparine présente dans le plasma dans le cas de traitement antivitamine K instauré en relais d'héparines.

2.7.1.3. TEMPS DE THROMBINE

Le temps de thrombine est le temps de coagulation d'un plasma après apport d'une quantité fixe et diluée de thrombine. Il est déterminé pour être normalement compris entre 16 et 20 secondes. Le temps de thrombine explore spécifiquement la fibrinoformation et est allongé en cas d'anomalie quantitative ou qualitative du fibrinogène ou en présence d'inhibiteur de la thrombine tel que l'héparine [1].

2.7.2. MESURE D'ACTIVITE DES FACTEURS Xa ET IIa

2.7.2.1. INHIBITION DES FACTEURS Xa ET IIa

La mesure de l'inhibition du facteur Xa est très utilisée pour la surveillance des traitements par HBPM et HNF. La mesure de l'activité anti-IIa n'est pas utilisée en routine.

Cependant, dans les deux cas, le principe du dosage est le même et utilise une méthode amidolytique sur substrat chromogène [43]. Cette méthode se fonde sur la capacité d'inhibition *in vitro* du facteur Xa (ou IIa) par des complexes [AT III-héparine-Xa (ou IIa)] :

$$\text{AT III} + \text{héparine} \rightarrow [\text{AT III - héparine}]$$

$$[\text{AT III - héparine}] + \text{Xa (ou IIa) en excès connu} \rightarrow [\text{AT III – héparine - Xa inactif}] + \text{Xa (ou IIa) résiduel}$$

$$\text{Xa (ou IIa) résiduel} + \text{substrat chromogène} \rightarrow \text{paranitroaniline}$$

Comme le facteur Xa (ou IIa) est apporté en excès, une partie ne va pas être inhibée au sein des complexes [AT III-héparine-Xa (ou IIa)]. Elle va alors pouvoir réagir avec le substrat chromogène afin de libérer de la paranitroaniline, dont la quantité est mesurable au spectrophotomètre et inversement proportionnelle à la quantité d'héparine présente dans le milieu initial.

2.7.2.2. RAPPORT ANTI-Xa/ANTI-IIa

Chaque héparine se caractérise par son rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa (Tableau 2).

Ce rapport est de 1 par convention pour les HNF. En effet, les héparines non fractionnées ne sont composées que de chaines d'une longueur supérieure à 5 400 Da. Or, ces chaines possèdent à la fois la capacité d'inhiber le facteur Xa et le facteur IIa (Figure 7).

En revanche pour les HBPM, le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa est toujours supérieur à 1 (Tableau 2). En effet, les HBPM possèdent à la fois :

- des chaines courtes qui ont la possibilité d'inhiber uniquement le facteur Xa.
- des chaines longues qui ont la possibilité d'inhiber le facteur Xa et le facteur IIa.

L'activité anti-Xa des HBPM provient pour une partie des chaines courtes et pour une partie des chaines longues, alors que l'activité anti-IIa provient uniquement des chaines longues. Ainsi si on écrit de façon détaillée le rapport d'activité, on a :

$$\text{Rapport anti-Xa/anti-IIa} = \frac{\text{activité anti-Xa}}{\text{activité anti-IIa}}$$

$$= \frac{\text{activité anti-Xa chaines longues} + \text{activité anti-Xa chaines courtes}}{\text{activité anti-IIa chaines longues}}$$

$$= \frac{\text{activité anti-Xa chaines longues}}{\text{activité anti-IIa chaines longues}} + \frac{\text{activité anti-Xa chaines courtes}}{\text{activité anti-IIa chaines longues}}$$

$$= \text{constante} + \frac{\text{activité anti-Xa chaines courtes}}{\text{activité anti-IIa chaines longues}}$$

Le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa peut donc être considéré comme proportionnel à la fraction de chaines courtes actives par rapport aux chaines longues actives.

Ainsi, le rapport anti-Xa/anti-IIa de la nadroparine de 3,3 indique que son activité anti-Xa est 3,3 fois plus importante que son activité anti-IIa. Ce rapport assez élevé par rapport à celui des HNF, démontre que la nadroparine se compose plutôt d'une population importante de chaines courtes actives. A l'opposé, le rapport de la tinzaparine (valeur 1,6) tend vers celui des HNF. Cela démontre que la tinzaparine possède une activité anti-IIa relativement importante pour une HBPM, résultant d'une forte proportion en chaines longues actives.

2.8. PHARMACOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE DES HEPARINES

Les héparines, de par leurs chaines de tailles hétérogènes, présentent des caractéristiques pharmacocinétiques différentes aussi bien entre HBPM et HNF qu'entre deux HBPM.

2.8.1. LIAISON AUX PROTEINES PLASMATIQUES

Une fois dans le sang, les chaines d'héparine peuvent se lier à différentes protéines plasmatiques, dont l'AT, qui est celle qui permet leur action (Figure 9). Ainsi, plus il y a de molécules d'héparines qui se lient à l'AT, plus l'héparine sera active. Cependant, l'héparine s'associe également à :

- d'autres types de protéines plasmatiques (facteur 4 plaquettaire, fibronectine, vitronectine, fibrinogène, glycoprotéines riches en histidine, …)
- aux cellules endothéliales.
- aux macrophages.
- au facteur von Willebrand [44].

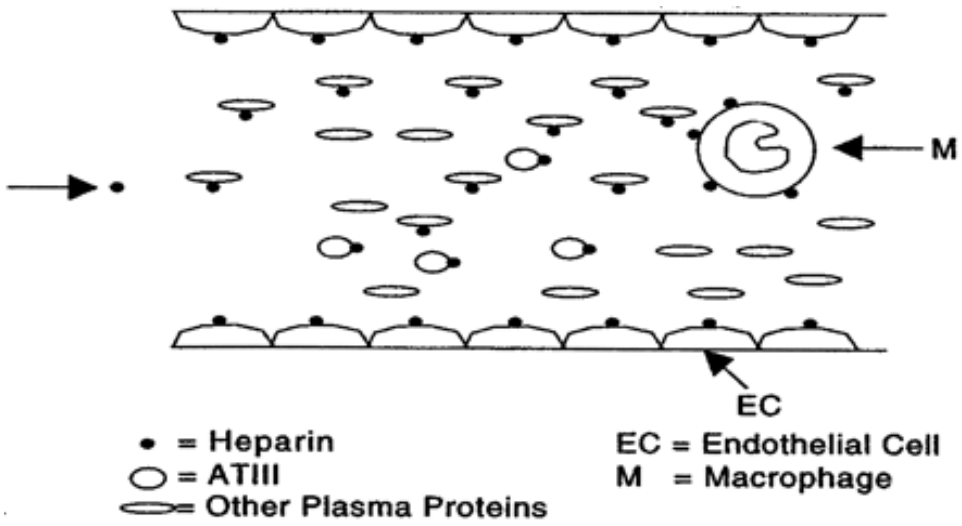


FIGURE 9 : LIAISON DE L'HEPARINE AVEC LES PROTEINES SANGUINES, LES CELLULES ENDOTHELIALES, LES MACROPHAGES ET L'AT [27].

Seules les chaines d'héparine possédant le pentasaccharide ont la possibilité de se lier avec l'AT tandis que la liaison avec les autres protéines et cellules est non spécifique.

Plus les liaisons non spécifiques des chaines d'héparines avec ces structures protéiques ou cellulaires seront nombreuses, moins il y aura de chaines disponibles pour se fixer avec l'AT. Cela diminue l'activité anticoagulante des héparines et conduit à une très grande variabilité de la réponse anticoagulante en fonction des patients.

De plus ces liaisons non spécifiques sont d'autant plus importantes et fortes que les molécules d'héparines sont de grande taille et fortement chargées.

Ceci explique à la fois la meilleure biodisponibilité :

- des HBPM par rapport aux HNF.
- de l'activité anti-Xa, portée principalement par les chaines courtes, par rapport à l'activité anti-IIa, portée par les chaines longues.

2.8.2. CLAIRANCE ET DEMI-VIE

La clairance des héparines est médiée par deux mécanismes d'action [27, 45] :

- un mécanisme rapide et saturable correspondant à la dépolymérisation des chaines d'héparines. Ce mécanisme est assuré par le système réticulo-endothélial (suite à l'internalisation et la captation des chaines par les cellules endothéliales, les macrophages) et les cellules hépatiques. L'étape de fixation des héparines sur l'endothélium et aux macrophages dépend de la longueur des chaines d'héparines et de leur richesse en charges négatives. Les chaines longues, fortement fixées à ces structures, sont ainsi beaucoup plus éliminées par ce mécanisme que les chaines courtes.
- un mécanisme lent et non saturable au niveau rénal, de cinétique d'ordre 1 qui permet l'élimination rénale des métabolites inactifs, ou sous forme native en cas d'excès. Ce mécanisme d'élimination concerne les chaines courtes, peu fixées aux cellules endothéliales et aux macrophages.

L'importance relative de ces deux mécanismes dépend de la dose d'héparine administrée ainsi que de la nature des chaines d'héparine [45] :

- dans le cas des chaines courtes d'héparines, peu fixées aux macrophages et aux cellules endothéliales, la clairance se fait principalement par le mécanisme rénal, indépendamment de la dose administrée.

- dans le cas des chaines longues, le mécanisme de clairance est dépendant de la dose administrée. Dans le cas de doses faibles, la disparition de l'activité des héparines est d'aspect pseudo-exponentiel et la demi-vie s'allonge de façon dose dépendante (Figure 10), la clairance s'effectue par le mécanisme rapide et saturable. En revanche, à forte doses, ce mécanisme saturable atteint ses limites de fonctionnement et ne peut alors plus prendre en charge la dégradation des chaines d'héparines, le mécanisme de clairance rénal devient prépondérant. Aux doses thérapeutiques, la clairance se fait selon les deux mécanismes.

Ainsi, les HBPM, composées majoritairement de chaines courtes, possèdent une clairance lente, basé sur un mécanisme unique non saturable : leur demi-vie plasmatique est donc plus longue et plus prévisible que celle des HNF, dont la clairance des chaines longues repose sur une combinaison de deux mécanismes de cinétiques différentes [46]. Cela explique que les HBPM s'administrent sous forme d'une injection par jour [27], alors que les HNF en nécessitent plusieurs. D'autre part, chez l'insuffisant rénal, il existe une accumulation des HBPM en raison de leur élimination rénale préférentielle : dans ce cas, les HNF sont préférées pour le traitement.

Si on observe le Tableau 3, on remarquera que la clairance ainsi que le temps de demi-vie de l'activité anti-Xa sont supérieurs, pour une même HBPM, aux valeurs obtenues pour l'activité anti-IIa.

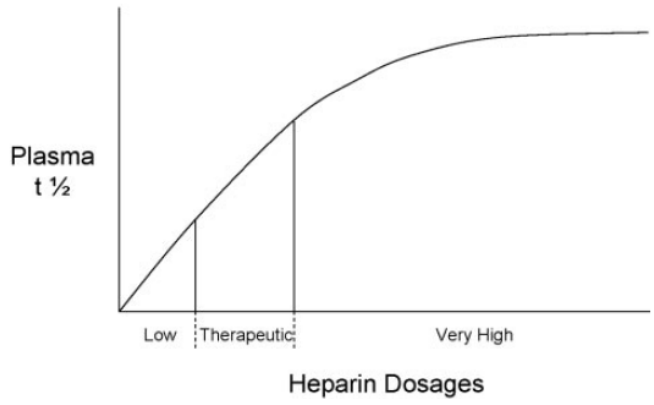


FIGURE 10 : DEMI-VIE PLASMATIQUE DES HNF EN FONCTION DE LA DOSE ADMINISTREE [27].

Les faibles doses d'héparines sont éliminées rapidement du plasma grâce à un mécanisme saturable (cellulaire) et un mécanisme lent et non saturable. Les fortes doses sont éliminées principalement par le mécanisme non saturable. ($T_{1/2}$ = demi-vie)

2.8.3. VOLUME DE DISTRIBUTION

Suite à une injection sous-cutanée, le volume de distribution apparent de l'activité anti-Xa des HBPM (compris entre 3,9 et 7,7 L, Tableau 3), est proche du volume sanguin et du volume plasmatique [46], ce qui signifie que les chaines portant l'activité anti-Xa ont tendance à rester principalement dans le compartiment intravasculaire.

En ce qui concerne le volume de distribution de l'activité anti-IIa peu d'informations sont disponibles, excepté pour la tinzaparine. Dans ce cas la valeur est de 10,1 L (Tableau 3), signant ainsi la tendance des chaines longues à rester dans le compartiment intravasculaire.

2.8.4. C_{max}, T_{max}, AIRE SOUS COURBE ET BIODISPONIBILITE

La valeur du T_{max} pour les héparines injectées par voie intraveineuse (IV) est faible (de 3 à 10 minutes) alors qu'elle atteint 2 à 4 heures suite à une injection sous-cutanée, aussi bien pour l'activité anti-Xa que pour l'activité anti-IIa (Tableau 3).

Les valeurs d'activités trouvées au T_{max} sont beaucoup plus élevées en ce qui concerne l'activité anti-Xa (comprises de 0,18 à 0,49 unité anti-Xa/mL, Tableau 3) qu'en ce qui concerne l'activité anti-IIa (comprises entre 0,04 et 0,12 unité anti-IIa/mL, Tableau 3). De la même façon, les aires sous courbes (en anglais « area under the curve » (AUC)) des activités anti-Xa sont toutes supérieures à celles des activités anti-IIa (Tableau 3).

Enfin, bien que les biodisponibilités de l'activité anti-IIa des HBPM aient peu été évaluées, à part pour la tinzaparine (67%, Tableau 3), il est connu que la biodisponibilité des HNF, composés exclusivement de chaines longues, est faible, de l'ordre de 20 et 30%. En revanche, la biodisponibilité de l'activité anti-Xa des HBPM est très élevée, comprise entre 85 à 98% (Tableau 3).

Ainsi, cela montre que les chaines courtes passent plus fortement dans le compartiment sanguin et qu'elles y restent plus longtemps que les chaines longues.

Cela s'explique [47] tout d'abord par le fait que les chaines longues, portant spécifiquement l'activité anti-IIa, sont difficilement résorbables au niveau sous-cutané, de par leur taille importante et leur charge élevée. De plus, une fois dans le sang, elles établissent plus de liaisons avec les protéines plasmatiques que les chaines courtes. Enfin comme leur vitesse de clairance est beaucoup plus élevée, elles résident beaucoup moins longtemps dans le compartiment sanguin que les chaines courtes. Tout cela contribue à l'obtention d'une activité

anti-Xa plasmatique supérieure à l'activité anti-IIa : ainsi le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa plasmatique est par conséquent augmenté (compris entre 3,8 à 18, Tableau 3) par comparaison au rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa de la solution commerciale d'HBPM injectée.

TABLEAU 3: CARACTERISTIQUES PHARMACOCINETIQUES DES HEPARINES.

Activité anti-Xa									
Héparine (U a.-Xa administrées)	C_{max}	T_{max}	Aire sous courbe	Volume de distribution	Temps moyen de résidence	Temps de demi-vie	Clairance	Biodisponibilité	R. anti-Xa/anti-IIa
	(U a.-Xa/mL)	(h)	(U a.-Xa/mL/h)	(L)	(h)	(h)	(mL/min)	(%)	Adimensionnel
HNF (5000 UI)	0,09 ± 0,05 [47]	2,50 ± 0,90 [47]	1,33 ± 0,70 [47]	NR	NR	NR	NR	23,8 [48]	NR
Enoxaparine sodique (2000)	0,28 ± 0,06 [49]	2,35 ± 0,56 [49]	1,96 ± 0,55 [49]	5,50 ± 1,18 [49]	6,68 ± 0,94 [49]	3,95 ± 0,65 [49]	16,67 ± 5,50 [49]	NR	NR
Enoxaparine sodique (4000)	0,42 ± 0,11 [47]	3,17 ± 0,58 [47]	3,47 ± 0,69 [47]	5,3 [37]	NR	4,28 ± 0,47 [47]	13,8 ± 3,17 [49]	91 [48]	NR
Enoxaparine sodique (4000)	0,45 ± 0,05 [50]	3,1 ± 0,4 [50]	3,00 ± 0,68 [50]	NR	6,7 ± 0,8 [50]	2,8 ± 0,4 [51]	1,6 ± 0,5 (h^{-1}) [51]	NR	12,0 ± 6,0 [51]
Nadroparine calcique (3075)	0,32 ± 0,09 [49]	3,62 ± 0,73 [49]	2,35 ± 0,63 [49]	6,77 ± 1,87 [49]	7,10 ± 0,99 [49]	3,74 ± 0,68 [49]	21,50 ± 7,00 [49]	89-98 [46]	7,7 ± 2,2 [51]
Dalteparine sodique (2500)	0,22 ± 0,07 [49]	2,82 ± 0,92 [49]	1,26 ± 0,40 [49]	7,74 ± 2,50 [49]	5,26 ± 1,15 [49]	2,81 ± 0,84 [49]	33,33 ± 11,83 [49]	86 [46]	NR
Dalteparine sodique (5000)	0,49 ± 0,13 [47]	3,08± 0,90 [47]	3,23 ± 0,85 [47]	7,7 [37]	NR	2,45± 0,66 [47]	2,0 ± 0,5 (h^{-1}) [51]	87 [48]	3,9 ± 0,9 [51]
Reviparine sodique (4250)	0,42 ± 0,06 [50]	3,1 ± 0,6 [50]	2,44 ± 0,59 [50]	NR	6,4 ± 1,0 [50]	3,3 ± 1 [50]	19 [50]	NR	NR
Tinzaparine sodique (4500)	0,18 ± 0,04 [47]	3,08 ± 0,79 [47]	1,35 ± 0,9 [47]	3,9 [52]	6 ± 7,6 [46]	2,97 ± 1,01 [47]	22 [46]	85 [46]	NR
Tinzaparine sodique (4500)	NR	4-6h	NR	3,91	NR	NR	NR	90%	NR
Bémiparine (3500)	0,34 ± 0,02 [53]	2,47 ± 0,14 [53]	2,80 ± 0,30 [53]	NR	NR	4,41 ± 0,58 [53]	21,52 ± 2,22 [53]	NR	18,42 ± 2,63 [53]
Activité anti-IIa									
Héparine (U a.-IIa administrées)	C_{max}	T_{max}	Aire sous courbe	Volume de distribution	Temps moyen de résidence	Temps de demi-vie	Clairance	Biodisponibilité	R. anti-Xa / anti-IIa
	(U a.-IIa/mL)	(h)	(U a.-IIa/mL/h)	(L)	(h)	(h)	(mL/min)	(%)	Adimensionnel
HNF (5 000 UI)	0,05 ± 0,03 [47]	2,64 ± 0,67 [47]	0,30 ± 0,24 [47]	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Enoxaparine sodique (2000)	0,068 ± 0,025 [49]	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Enoxaparine sodique (4000)	0,04 ± 0,01 [47]	3,00 ± 0,63 [47]	0,25 ± 0,07 [47]	NR	NR	2,30 ± 0,75 [47]	NR	NR	NR
Enoxaparine sodique (4000)	0,14 ± 0,02 [50]	3,3 ± 0,8 [50]	0,66 ± 0,25 [50]	NR	7,3 ± 1,0 [50]	1,3 ± 0,2 [51]	4,1 ± 0,1 (h^{-1}) [51]	NR	12,0 ± 6,0 [51]
Nadroparine calcique (3075)	0,048 ± 0,008 [49]	NR	NR	NR	NR	1,5 ± 0,2 [51]	2,9 ± 0,9 (h^{-1}) [51]	NR	7,7 ± 2,2 [51]
Dalteparine sodique (2500)	0,052 ± 0,011 [49]	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Dalteparine sodique (5000)	0,09 ± 0,03 [47]	3,14 ± 0,78 [47]	0,56 ± 0,18 [47]	NR	1,67 ± 0,45 [47]	1,4 ± 0,3 [51]	3,1 ± 0,9 (h^{-1}) [51]	NR	3,9 ± 0,9 [51]
Reviparine sodique (4250)	0,12 ± 0,03 [50]	2,8 ± 0,55 [50]	0,69 ± 0,49 [50]	NR	7,2 ± 2,4 [50]	NR	NR	NR	NR
Tinzaparine sodique (4500)	0,05 ± 0,02 [47]	3,09 ± 0,54 [47]	0,30 ± 0,12 [47]	NR	1,76 ± 0,44 [47]	NR	NR	NR	NR
Tinzaparine sodique (4500)	0,10 ± 0,02 [53]	2,97 ± 0,13 [53]	0,81 ± 0,14 [53]	10,1 [52]	NR	NR	NR	67% [52]	NR
Bémiparine (3500)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	18,42 ± 2,63 [53]

NR = Non Renseigné
R. anti-Xa/anti-IIa : Rapport anti-Xa/anti-II
U. a.-Xa (anti-IIa) : unités anti-Xa (anti-IIa)

3. ADMINISTRATION DE L'HEPARINE PAR VOIE ORALE

L'administration par voie orale des médicaments constitue le mode d'administration le plus simple et le plus largement employé. Afin d'atteindre leur cible, les principes actifs doivent être absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal et entrer en quantité suffisante au niveau de la circulation systémique.

Cependant, cette phase d'absorption est un processus complexe qui dépend à la fois de variables physiologiques (pH, présence d'enzymes, motilité intestinale) et de propriétés physicochimiques de la substance active (solubilité, perméabilité et facteurs de formulation).

En ce qui concerne les substances actives utilisées en pharmacie, une classification en fonction des paramètres clefs que sont la solubilité et la perméabilité est apparue dans le but de pouvoir prédire dans une certaine mesure le comportement de la substance, au sein d'une forme pharmaceutique, face au passage de la barrière intestinale : il s'agit du système de classification biopharmaceutique (BCS) établit par G. Amidon [54]. Dans ce système l'héparine appartient à la classe III. Cette classe est composée par les molécules présentant à la fois une solubilité élevée et une faible perméabilité. Il s'agit donc de molécules difficilement administrables par voie orale sous forme de simple solution.

En effet, pour être absorbées par voie orale, les molécules doivent, dans un premier temps, être solubilisées dans le liquide gastro-intestinal. L'héparine, qui présente une charge globale importante, liée à la présence de nombreux groupements fonctionnels chargés négativement (groupes carboxyles et groupes sulfates) est très soluble dans l'eau. Ce paramètre n'est donc pas limitant pour l'absorption par voie orale des héparines.

En revanche, une fois solubilisées, les molécules doivent, dans un second temps, franchir la barrière épithéliale soit en traversant les cellules (passage transcellulaire) soit en passant entre les cellules (passage paracellulaire). Ainsi, des molécules de petite taille passent plus aisément que des molécules de grande taille. De plus, les cellules se composant d'un cytoplasme aqueux et d'une membrane lipidique, les molécules non chargées ne possédant pas un caractère hydrophile ou hydrophobe trop marqué ont possibilité de passer facilement la barrière intestinale.

Ainsi pour les héparines, macromolécules hydrophiles à la charge négative importante, la perméation de l'épithélium digestif apparait comme particulièrement difficile : il s'agit, en théorie, du facteur limitant l'absorption selon la classification BCS.

Ainsi, la perméation de la barrière intestinale *in vivo* par l'héparine sous forme de simple solution apparait d'un point de vue théorique comme médiocre voir nulle ce qui a été vérifié par différentes équipes de recherche [55-57]. Depuis cette observation, de nombreux essais destinés à rendre possible l'administration de ces molécules par voie orale ont été tentés.

3.1. LES PREMIERS TRAVAUX : MISE EN EVIDENCE DU PASSAGE INTESTINAL DE L'HEPARINE

Les premiers travaux visant à évaluer un éventuel passage de l'héparine dans le plasma suite à une administration intragastrique de solutions d'héparine ont été décevants.

En effet, bien que des doses importantes d'HNF aient été administrées chez le lapin (de l'ordre de 15 000 unités internationale (UI)/kg), l'activité anti-Xa maximale obtenue fut de 0,042 ± 0,046 unités anti-Xa/mL [55]. A titre de comparaison, l'activité anti-Xa efficace entraînant une action anti-thrombotique protectrice de 50% est d'environ 0,09 unités anti-Xa/mL [58].

L'équipe de Hiebert L.M., qui étudie l'absorption par voie orale des héparines sous forme de solution depuis de nombreuses années, a démontré qu'il existait une localisation préférentielle de l'héparine au niveau endothélial suite à l'administration intra-gastrique de solutions d'HNF chez le rat [59-61]. En revanche, la quantité d'héparine retrouvée au niveau du plasma est quasi-nulle. Des observations similaires ont été faites suite à l'administration orale d'HBPM [62].

L'effet antithrombotique produit par ces solutions a été étudié sur le rat présentant une thrombose induite au niveau jugulaire. Une diminution du thrombus dose dépendante à été observée suite à l'administration unique [61] ou répétée d'HNF [63]. Des observations similaires ont également eu lieu suite à l'utilisation d'une dose unique d'HBPM [64, 65].

Enfin, il a été démontré que le passage de l'héparine en solution dépend du pH du milieu où se déroule l'absorption et de la mase moléculaire de l'héparine testée [66] . Ainsi les HNF sont absorbées au niveau de l'estomac [67] alors que la résorption des HBPM est plus facile

au niveau de l'intestin. Toutefois, ces études ont démontré qu'un passage faible des héparines administrées sous forme de solution existait chez l'animal.

De plus rares études ont été conduites chez l'homme. La plus récente a consisté en l'administration de 1 000 UI/kg d'HNF chez 6 volontaires : deux heures après administration, une élévation légère de l'activité anti-Xa a été observée sans que cela soit corrélé avec une augmentation significative du temps de coagulation mesuré par le temps de céphaline activée [68]. Les études précédentes chez l'homme n'avaient pas donné de résultats beaucoup plus encourageants : ainsi aucune activité anticoagulante n'a pu être détectée dans le plasma d'individus sains suite à l'administration de 5000 unités anti-Xa d'HBPM [57]. De plus, l'administration orale de 40 000 UI d'HNF chez 17 volontaires sains n'a entrainé qu'un très faible allongement du temps de céphaline activée (de l'ordre de 5%) [56].

Ces résultats mitigés ont amené les chercheurs à utiliser des systèmes susceptibles d'augmenter l'absorption de l'héparine administrée par voie orale.

3.2. SYSTEMES PERMETTANT D'AUGMENTER L'ABSORPTION DES HEPARINES

Les différentes stratégies employées cherchent à augmenter la perméabilité de l'héparine soit en :

- atténuant les paramètres physicochimiques responsables de la faible perméabilité de l'héparine, par masquage des charges négatives et/ou greffage de groupements hydrophobes.
- jouant directement sur la perméabilité de l'épithélium digestif par perméabilisation de la membrane cellulaire ou ouverture des jonctions serrées.

Cependant les adjuvants utilisés présentent des propriétés multiples et ils agissent souvent à la fois sur les propriétés physico-chimiques de l'héparine et sur l'épithélium digestif. Ainsi une classification est difficile à définir. Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux promoteurs d'absorption et dans un second temps aux systèmes polymériques (particules et granulés). Une synthèse des résultats *in vivo* de ces travaux est présentée dans le tableau 5 : de plus, les dates des différentes études sont précisées ce qui permet de les situer dans le temps les unes par rapport aux autres.

3.2.1. PROMOTEURS D'ABSORPTION

Des promoteurs d'absorption de différentes natures (surfactants sulfatés et sulfonés, acide diaminetétraacétique, acides aminés) ont été testés depuis le début des années 60 [69-71]. Cependant, malgré des doses administrées importantes, ces systèmes n'ont montré que des augmentations très faibles de l'absorption orale de l'héparine, souvent associées avec des altérations de la muqueuse digestive.

Ainsi, dès le début des expériences à ce sujet, s'est posé le problème récurrent de la toxicité des promoteurs d'absorption vis-à-vis de la membrane intestinale : en effet, il est nécessaire de trouver un composé capable d'agir à des doses provoquant un effet réversible et transitoire sur les cellules.

Plus récemment, divers autres composés ont donc été évalués afin de trouver celui qui induit un passage important de l'héparine sans toxicité.

3.2.1.1. Composés dérivés d'acides gras

3.2.1.1.1. LABRASOL®

Il s'agit d'un surfactant qui contient des glycérides saturés et polyglycolysés en C6-C14. C'est en fait un mélange contenant une proportion de:

- 30% de mono-/di- et triglycérides d'acides gras en C8 et C10.
- 50% de mono- et di-esters de polyéthylène glycol (PEG).
- 20% de PEG 400 libre.

Différents tensio-actifs ont démontré des propriétés de promoteur d'absorption [72]. Dans le cas du Labrasol®, la taille moyenne de ces chaines alkyles lui permet de pénétrer dans la bicouche phospholipidique des membranes facilitant ainsi l'absorption des molécules à travers la paroi intestinale. De plus, il présente une haute tolérance, une faible toxicité et est inscrit à la Pharmacopée Européenne [73].

Son effet a été testé chez le rat, suite à une co-administration intraduodénale de doses de 50, 100 ou 200 mg/kg de Labrasol® et de 200 unités anti-Xa/kg d'HBPM [74]. C'est avec des doses de 50 mg/kg de Labrasol® au niveau du jéjunum, que l'absorption de l'HBPM est la meilleure : l'activité anti-Xa maximale obtenue est de 0,50 +/- 0,03 unité anti-Xa/mL. Une activité anti-Xa supérieure à 0,12 unités/mL est maintenue pendant environ trois heures et

demi : cette activité est celle nécessaire afin d'obtenir 50% d'action protectrice contre la thrombose chez le rat [58].

Le Labrasol® a également été utilisé par la même équipe comme constituant principal de systèmes auto-émulsionnables de délivrance de principes actifs ou SMEDDS (Self-MicroEmulsifying Drug Delivery System). Le principe de ce système repose sur son auto-émulsification rapide dans la lumière de l'intestin grêle, présentant alors le principe actif sous forme de petites gouttes d'huile. La faible agitation nécessaire à l'émulsification du système est générée par la motilité digestive de l'intestin grêle.

Dans cette étude, ce système est réalisé en mettant en suspension une HBPM dans du Labrasol® en présence d'un des trois adsorbants suivant : Florite® RE (silicate de calcium poreux), Neusilin® US2 (aluminometasilicates de magnésium), Sylysia® 320 (dioxyde de silicone poreux) [75]. Les microparticules composées de Sylysia® 320 possèdent les diamètres les plus petits (3,2μm) mais aussi les taux de libération d'HBPM les plus importants. Les taux de dissolution *in vitro* diminuèrent avec l'augmentation de la taille des particules du fait d'un contact moins important avec le milieu de dissolution. L'administration *in situ* chez le rat a démontré que la formulation contenant de la Florite RE fournit l'activité plasmatique anti-Xa la plus importante (0,42 ± 0,01 unité anti-Xa/mL), et ce, 30 minutes après l'administration (Figure 11 (A)). La biodisponibilité absolue correspondante est de 18,8%.

Cette formulation a donc été retenue pour une administration *per os* chez le chien. Une concentration maximale de 0,48 ± 0,11 unité anti-Xa/mL dans les 3 heures suivant l'administration orale a été obtenue (Figure 11 (B)).

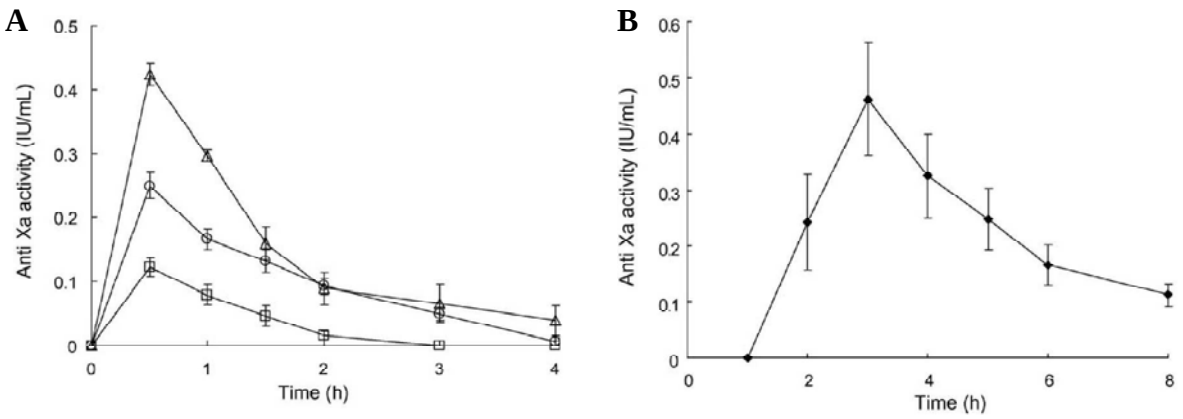


FIGURE 11 : ACTIVITE PLASMATIQUE ANTI-Xa SUITE A L'ADMINISTRATION ORALE DE PREPARATIONS SOLIDES DE PARNAPARINE [75].

(A) Activité plasmatique anti-Xa après administration intrajéjunale de préparations solides de parnaparine (200 unités anti-Xa/kg) chez le rat contenant : Δ Florite® RE, □ Neusilin® US2, ○ Sylysia® 320.
(B) Activité plasmatique anti-Xa après administration orale de la forme solide de parnaparine (200 unités anti-Xa/kg) préparée à base de Florite® RE, chez le chien.

Le Labrasol® semble donc être un excipient prometteur pour favoriser le passage par voie orale des héparines. En effet, en plus d'une bonne tolérance, il présente une faible toxicité chez l'animal (DL50 de 22 g/kg chez le rat). Son mécanisme d'action reste non entièrement élucidé même si il a été démontré que cet excipient augmente le passage paracellulaire du mannitol sur des cellules Caco-2 par un mécanisme modifiant le cytosquelette d'actine associé à une redistribution de la protéine ZO-1 [76].

3.2.1.1.2. CAPRATE DE SODIUM

Il s'agit d'un acide gras contenant une chaine carbonée saturée de longueur moyenne (C_{10}) qui permet de faciliter le passage paracellulaire de substances hydrophiles.

La co-administration d'une dose de 2 400 unités anti-Xa/kg d'HBPM et de 100 mg/kg de caprate de sodium à des rats conduit à une biodisponibilité relative de 30% par rapport à l'injection sous-cutanée de la même HBPM en solution. Un pic d'activité plasmatique à 30 minutes de 0,35 unité anti-Xa/mL est observé (Figure 12) [77].

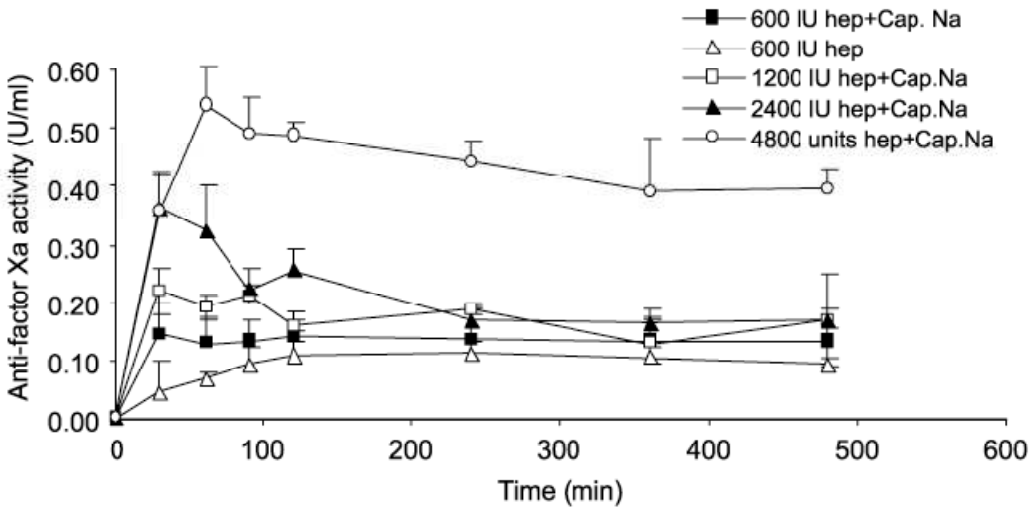


FIGURE 12 : ACTIVITE ANTI-Xa PLASMATIQUE SUITE A L'ADMINISTRATION ORALE D'HEPARINE ET DE CAPRATE DE SODIUM [77].

Les différentes formulations testées contenaient de l'héparine en solution ou de l'héparine en solution et du caprate de sodium.

L'étude histologique n'a pas montré de lésions du tube digestif pour une dose de 100 mg/kg de caprate de sodium. Cependant, une cytotoxicité de ce composé à partir d'une concentration de 0,125% à été trouvée sur des cellules Caco-2.

3.2.1.2. ACIDES NON ALPHA-AMINO ACYLES ET COMPOSES SNAC ET SNAD

3.2.1.2.1. GENERALITES

Il s'agit d'une nouvelle famille de composés synthétiques préparés par N-acétylation d'un acide aminé aromatique commercial : l'acide 4-(4-aminophenyl) butyrique [78]. Ces composés sont hydrosolubles [79] et possèdent la propriété de s'assembler de façon non covalente avec l'héparine permettant ainsi de masquer les charges de celle-ci et de diminuer son hydrophilie. Après absorption au niveau sanguin, l'héparine se dissocie et peut alors exercer son activité anticoagulante [80, 81].

3.2.1.2.2. PREMIERS TESTS SUR LES ANIMAUX

Un screening chez le rat a permis de choisir les dérivés les plus actifs sur la promotion de l'absorption de l'héparine par voie orale. Ces dérivés ont ensuite été testés chez le singe : des augmentations importantes du TCA ont été observées pouvant conduire à une biodisponibilité relative de 39% [82] par comparaison avec l'injection sous-cutanée.

Ces premiers résultats encourageants ont servi de base au développement du N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate de sodium (SNAC, Figure 13) et du N-[10-(2-hydroxybenzoyl)amino]decanoate de sodium (SNAD). Le SNAC est utilisé pour promouvoir l'absorption des HNF et le SNAD pour promouvoir celle des HBPM.

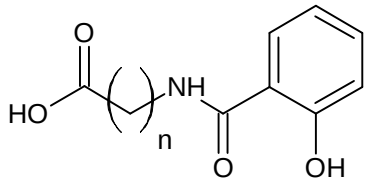


FIGURE 13 : STRUCTURE CHIMIQUE GENERALE DES COMPOSES SNAC [79].

3.2.1.2.3. COMPOSE SNAC

3.2.1.2.3.1. ETUDES CHEZ L'ANIMAL

La première étude, utilisant une formulation contenant 150 mg/kg de SNAC et 100 mg/kg d'HNF [83] a permis d'induire, chez le rat et chez le singe, des augmentations importantes du TCA et du taux plasmatique d'activité anti-Xa jusqu'à environ 1,1 unité/mL (Figure 14).

Cette étude a été complétée par une évaluation de la toxicité suite à des prélèvements de tissu intestinal de rat ayant reçu une dose unique de 300 mg/kg de SNAC ou suite à l'administration répétée pendant 28 jours d'une dose de 1200 mg/kg/jour de SNAC. Dans les deux cas, l'observation des tissus a montré l'absence de dommages.

Cela a été confirmé chez une autre espèce, le singe mais aussi dans une autre étude [84] qui a également permis d'établir que le mécanisme de passage de l'héparine en présence de SNAC sur culture de cellules Caco-2 se faisait selon un mécanisme transcellulaire passif.

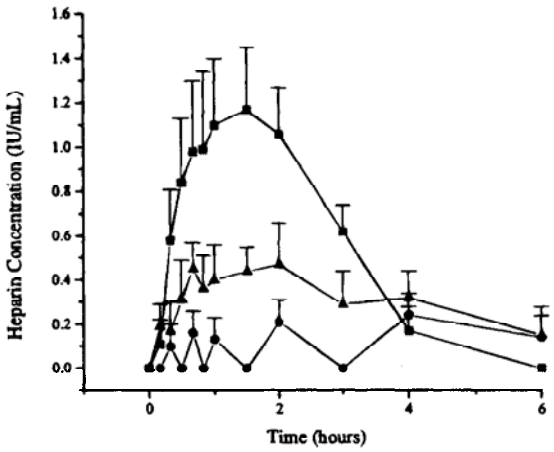


FIGURE 14 : PROFIL PHARMACOCINETIQUE DE L'HEPARINE OBTENU SUITE A LA CO-ADMINISTRATION DE SNAC ET DE DIFFERENTES DOSES D'HNF CHEZ LE SINGE [83].

Légende : pour une dose de SNAC de 150 mg/kg, les doses d'HNF utilisées étaient de ▲15 mg/kg (2486 UI/kg), ■ 30 mg/kg (4971 UI/kg) et ● 100 mg/kg (16570 UI/kg).

Enfin, l'efficacité du SNAC a également été explorée sur un modèle de thrombose veineuse profonde chez le rat. L'administration conjointe de SNAC et d'héparine permet d'induire une diminution significative de la taille des thrombi montrant une action effective de l'héparine [81].

Suite à ces résultats prometteurs obtenus chez l'animal, des études de phase I ont été menées chez le volontaire sain.

3.2.1.2.3.2. ETUDES CLINIQUES

3.2.1.2.3.2.1. ETUDES DE PHASE I

Ces études ont eu pour objectifs de démontrer i) la tolérance et l'innocuité de solutions contenant le SNAC et l'héparine ii) que l'héparine sans SNAC n'est pas absorbée par voie orale iii) que le SNAC seul n'a pas d'effet sur la coagulation et iv) d'établir quelle dose minimale d'héparine est nécessaire à l'obtention d'un effet pharmacologique par combinaison à la dose maximale non-toxique de SNAC.

Ainsi, dans une première étude [85], des doses de 10 000 à 30 000 UI d'HNF ont été testées avec 1,4 ou 10,5 g de SNAC. Il y a eu confirmation des tendances déjà observées chez l'animal à savoir une augmentation nette du TCA (jusqu'à environ 40 secondes) et des activités anti-Xa et anti-IIa (jusqu'à 0,2 unités anti-Xa ou anti-IIa/mL), surtout dans le cas des formulations contenant 30 000 UI d'héparine pour 10,5 g de SNAC (Figure 15 (A) et (B)). Cependant, avec les doses de SNAC importantes, des effets secondaires digestifs importants à type de nausées et vomissements ont été observés.

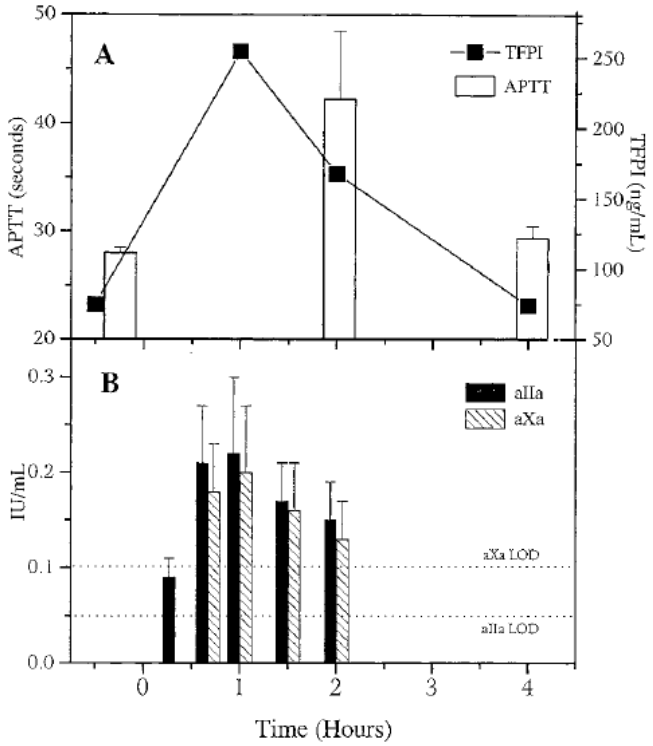


FIGURE 15 : TCA ET ACTIVITES ANTI-Xa ET ANTI-IIa PLASMATIQUES OBTENUES LORS DES ETUDES CLINIQUES DE PHASE I DU SNAC [85].

(A) Valeur du TCA (secondes) et concentration en TFPI (ng/mL) après administration orale de 10,5 g de SNAC et 30 000 UI d'héparine chez des volontaires humains.

(B) Activité anti-Xa et anti-IIa (UI/mL) après administration orale de 10,5 g de SNAC et 30 000 UI d'héparine chez des volontaires sains.

Les lignes pointillées représentent les limites de détection (LOD) pour les activités anti-Xa et anti-IIa.

C’est pourquoi une formulation contenant une dose plus faible de SNAC (1,5g ou 2,25g) et masquant le goût amer de ce composé a été développée.

L’administration de cette nouvelle formulation contenant des doses croissantes d’HNF (30 000 à 150 000 UI) a permis d’obtenir une augmentation de l’activité anti-Xa jusqu’à 0,30 unités anti-Xa/mL dans les 40 minutes suivant l’administration d’une dose de 90 000 UI d’HNF (Figure 16) [86]. La tolérance et l’innocuité de cette nouvelle formulation ont été démontrées et les paramètres pharmacocinétiques ont été établis.

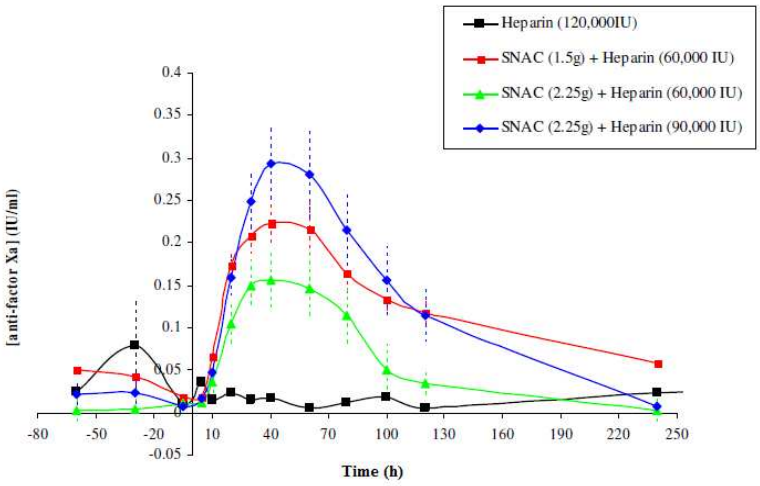


FIGURE 16 : ACTIVITES ANTI-Xa PLASMATIQUES SUITE A L’ADMINISTRATION ORALE DE SOLUTIONS D’HEPARINE/SNAC CHEZ LE VOLONTAIRE SAIN LORS DES ETUDES CLINIQUES DE PHASE I [86].

Un effet dose-réponse est observé, l’héparine seule n’est pas absorbée.

3.2.1.2.3.2.2. ETUDES DE PHASE II

Cette étude a inclus 123 patients nécessitant un remplacement de hanche total recevant soit :

- un mélange SNAC/HNF *per os* (1,5g de SNAC/60 000 UI d’HNF ou 2,25g de SNAC/90 000 UI d’HNF).
- des injections sous cutanée contenant 5 000 UI d’HNF [87].

Le traitement a été administré pendant 5 jours et les patients ont été suivis pendant 35 jours au total. Les proportions d’hémorragies sévères (total de 3,3%) et de thromboses veineuses (total

de 4,9%) ne sont pas différentes entre groupe contrôle et groupes SNAC ce qui a permis de débuter des études de phase III.

3.2.1.2.3.2.3. ETUDES DE PHASE III ET PERSPECTIVES

Une étude internationale a été menée en double aveugle et double placebo sur 2264 patients devant subir un remplacement partiel de hanche [86]. Le but de cette étude était de démontrer la supériorité de l'héparine administrée par voie orale en terme d'efficacité et d'innocuité par rapport au traitement de référence c'est-à-dire l'injection sous cutanée d'HBPM. Cependant, cet objectif n'a pas été atteint principalement à cause d'un problème de compliance des patients sujets à des vomissements et nausées engendrés par le mauvais goût des formulations orales.

Afin de pallier à cela, une forme orale (capsules de SNAC) a été réalisée et testée chez le volontaire sain permettant ainsi de déterminer les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques [88]. Ainsi, suite à l'administration d'une dose de 75000 UI d'HNF en combinaison avec du SNAC, des élévations des activités anti-Xa et anti-IIa jusqu'à environ 0,5 unités/mL ont été observées (Tableau 4, Figure 17).

TABLEAU 4 : CARACTERISTIQUES PHARMACODYNAMIQUES D'UNE HNF ADMINISTREE A L'HOMME PAR VOIE ORALE EN PRESENCE DE SNAC [88].

L'héparine est administrée par voie intraveineuse ou par voie orale en combinaison avec le SNAC chez l'homme

		E_{max} (U/mL)	T_{max} (h)	Biodisponibilité (%)
SNAC-HNF *per os* (75 000 UI)	Activité anti-Xa	0,547 ± 0,261	0,666	2,19 ± 1,29
	Activité anti-IIa	0494 ± 0,288	0,679	1,33 ± 0,81
HNF SC (5 000 UI)	Activité anti-Xa	1,914 ± 0,464	0,0841	-
	Activité anti-IIa	2,156 ± 0,235	0,0883	-

E max : effet maximum

Cependant, les valeurs des biodisponibilités correspondantes sont faibles (inférieures à 2%) et peuvent s'expliquer par le fait que la dose administrée par voie orale (75 000 UI) est beaucoup plus importante que celle administrée par voie IV (5000 UI).

Le rapport anti-Xa/anti-IIa à été étudié suite à l'administration de la formulation contenant l'HNF et le SNAC *per os* et suite à l'administration parentérale d'HNF. Dans tous les cas, ce rapport est maintenu à environ 1, ce qui correspond au rapport théorique caractéristique des HNF.

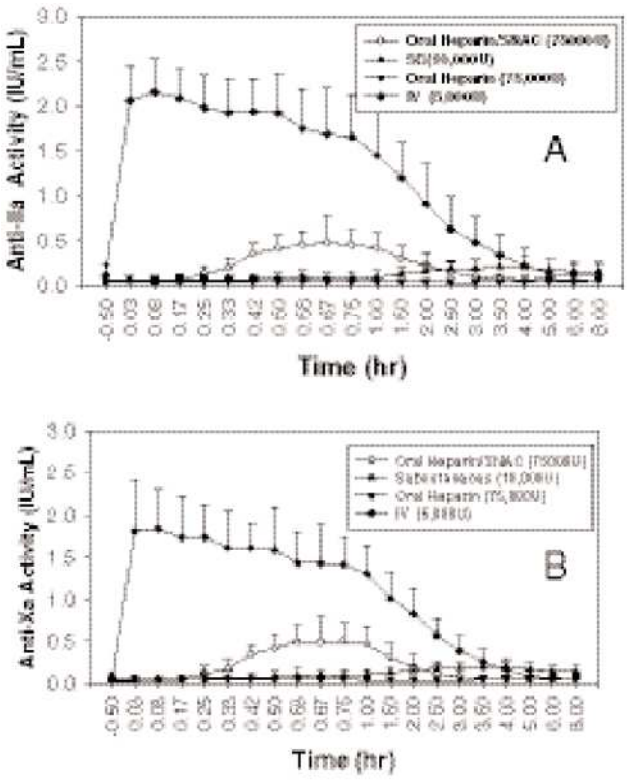


FIGURE 17 : ACTIVITES ANTI-Xa ET ANTI-IIa PLASMATIQUES OBTENUES LORS DES ETUDES CLINIQUES DE PHASE III DU SNAC [88].

Activités plasmatiques anti-Xa et anti-IIa après administration d'héparine par voie parentérale ou par voie *per os* en présence de SNAC.

Légende : ◆ HNF en IV (5 000 UI), ◇ HNF *per os* (75 000 UI) + SNAC, ◓ HNF en S.C. (10 000 UI), ◒ HNF *per os* (75 000 UI).

3.2.1.2.4. COMPOSE SNAD

Les études concernant le SNAD sont beaucoup moins nombreuses que celles utilisant le SNAC. Le SNAD a seulement été testé en association avec des HBPM, chez le rat [80] et le porc présentant des thromboses induites [89], à des doses respectives de 15 mg/kg (pour 300 mg/kg de SNAD) et 2 000UI/kg (pour 50 mg/kg de SNAD). Il a été observé une augmentation significative de l'activité anti-Xa ainsi qu'une diminution de la taille du thrombus.

Une troisième étude [90] a comparé l'effet du SNAC et du SNAD sur l'absorption d'une HBPM, chez trois modèles animaux différents (rat, chien et singe) ainsi que sur un modèle de cellules Caco-2.

Des doses de 1 000 à 3 000 unités anti-Xa/kg d'HBPM ont été administrées avec le SNAC (ou le SNAD) à des doses atteignant jusqu'à 300 mg/kg. Dans tous les cas, des activités anti-Xa plasmatique importantes (> 1 unités/mL) ont été observées. Les biodisponibilités relatives obtenues chez le chien et le rat ne sont pas très importantes (comprises entre 3% et 9%) mais cependant toujours en faveur du SNAD. La supériorité du SNAD est particulièrement claire chez le singe où la biodisponibilité relative du SNAD atteint 38,2% contre 3,1% avec le SNAC : c'est pour cela que le SNAD est considéré comme le composé de choix pour le passage des HBPM. L'étude sur culture cellulaire a permis de montrer que le SNAC et le SNAD ne sont pas toxiques et qu'ils augmentent le passage de l'héparine par un mécanisme n'impliquant pas l'ouverture des jonctions serrées. Malgré ces résultats plutôt positifs, aucune autre étude utilisant le SNAD n'a été publiée depuis 2001.

3.2.1.3. AGENT MUCOLYTIQUES : LA PAPAINE ET LA BROMELAINE

Il s'agit d'agents protéolytiques qui agissent par rupture des ponts entre les acides aminés des glycoprotéines constitutives du mucus intestinal. Ils favorisent également le passage transcellulaire par altération des protéines constituant les jonctions serrées.

3.2.1.3.1. PAPAÏNE

Suite à des tests *in vitro* sur chambre d'Ussing, d'une solution contenant de la papaïne et de l'héparine en différentes proportions, une augmentation de la perméabilité de l'HBPM de 7,9 fois a été obtenue dans le cas d'un rapport molaire 1:1 [91].

Ces proportions entre papaïne et HBPM ont été conservées pour la réalisation de comprimés contenant, en plus, de l'hydroxyéthylcellulose (HEC). Une dose de 778 unités anti-Xa/kg d'HBPM a été administrée chez le rat conduisant à une activité maximale à 2 heures de 0,35 unités anti-Xa/mL et à une biodisponibilité relative de 9,1% (Figure 18). De plus, une activité supérieure à 0,12 unités anti-Xa/mL est obtenue pendant environ 7 heures.

Les charges positives portées par la papaïne lui permettent d'interagir avec les charges négatives de l'héparine. Cette interaction modifie les fonctions enzymatiques de la protéine en augmentant l'affinité pour son substrat.

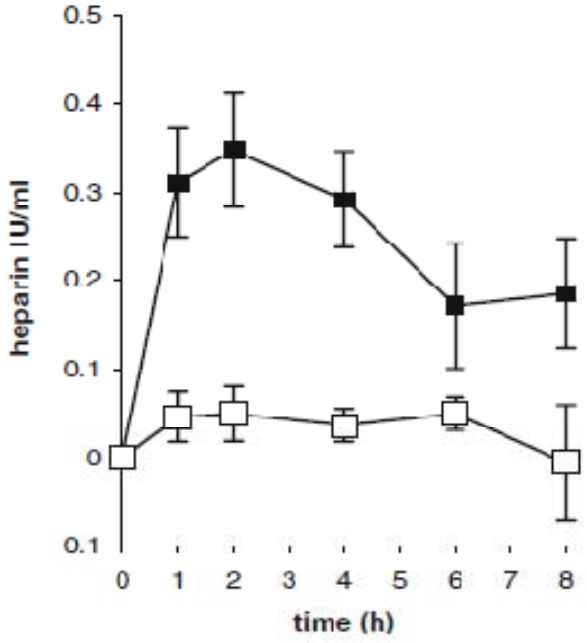


FIGURE 18 : EFFET DE LA PAPAÏNE SUR L'ABSORPTION ORALE D'HEPARINE [91].

Comparaison des profils plasmatiques en héparine après administration orale à des rats de 210 unités anti-Xa d'héparine présente dans des comprimés contenant de la papaïne (carrés pleins) et dans des comprimés contrôle sans papaïne (carrés vides).

3.2.1.3.2. BROMELAÏNE

Cette protéine possède des charges positives qui permettent une complexation avec les charges négatives des héparines sans perte de l'activité protéolytique de la bromélaïne. Ce complexe est stable à différents pH.

Une étude a démontré une augmentation de la perméabilité apparente d'une HBPM aussi bien *in vitro* sur un épithélium de cellules Caco-2 que sur une cellule d'Ussing contenant de l'intestin grêle de rat [92].

Ainsi, suite à un dépôt de 10 unités anti-Xa/mL d'héparine et de bromélaïne (dans un rapport molaire 1:2, respectivement) au pôle apical de Transwell®, 47% de la concentration initiale à été transportée, correspondant à une augmentation de la perméabilité apparente de 6,7 fois par rapport au contrôle.

Pour les études sur chambres d'Ussing la concentration en héparine employée est de 10 unités anti-Xa/mL pour un rapport molaire entre bromélaïne et héparine de 1:1. Après 150 minutes, la concentration maximale obtenue dans le compartiment basolatéral est de 1,81 unité anti-Xa/mL ce qui correspond à une augmentation de la perméabilité apparente de 4,5 par rapport au contrôle.

Si ces résultats sont plutôt positifs, une étude *in vivo* complémentaire serait la bienvenue afin de démontrer clairement l'effet de ce composé.

Même si les mécanismes d'action de la bromélaïne et de la papaïne restent inconnus, les propriétés de promoteur d'absorption de ces molécules en font de bons candidats pour le passage des héparines par voie orale que ce soit seules ou en complément d'autres systèmes.

3.2.1.4. POLYMERES MUCOADHESIFS

3.2.1.4.1. CARBOPOL® C 934 P

Le carbopol® C 934 P est un dérivé poly(acrylate) aux propriétés mucoadhésives qui agit par chélation des ions calcium, permettant une ouverture des jonctions serrées et donc une augmentation de la perméabilité paracellulaire.

In vivo, la co-administration de Carbopol® C 934 P (1% (m/v)) et d'HBPM à dose de 5 000 unités anti-Xa /kg chez le cochon a conduit à une activité plasmatique d'environ 0,20 unités anti-Xa/mL, maintenue pendant environ 6 heures (Figure 19). Le rapport d'augmentation de l'effet promoteur est alors de 2,8 [93].

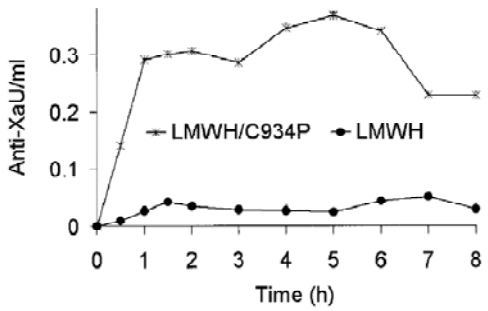


FIGURE 19 : ACTIVITE ANTI-Xa PLASMATIQUE APRES ADMINISTRATION INTRADUODENALE D'HBPM A LA DOSE DE 5 000 UNITES ANTI-XA/KG AVEC OU SANS CARBOPOL® C 934 P CHEZ LE COCHON [93].

L’équipe de Thanou, qui a employé ce polymère, a également travaillé sur une autre famille de composés mucoadhésifs et promoteurs d’absorption : les dérivés du chitosane.

3.2.1.4.2. CHITOSANE ET DERIVES DE CHITOSANE

3.2.1.4.2.1. GENERALITES

Le chitosane est un polysaccharide biocompatible et non toxique ayant des applications dans de nombreux domaines, notamment pharmaceutiques. En effet, il possède à la fois des propriétés mucoadhésives et promotrices d’absorption (au niveau de la voie paracellulaire) très intéressantes pour la délivrance par voie orale de substance actives [94]. Ces propriétés sont dues aux charges positives portées par le chitosane. Des interactions chitosane/membrane cellulaire permettent une réorganisation structurale des protéines associées aux jonctions serrées (F-actine et protéine ZO-1) conduisant ainsi à leur ouverture [95].

Il existe de nombreux types de chitosane qui diffèrent par leur viscosité (et donc masse moléculaire) et leur degré d’acétylation. Les propriétés d’absorption mais également de toxicité sont dépendantes de ces deux paramètres. Cependant comme les chitosanes qui permettent d’obtenir un maximum d’absorption ne sont pas nécessairement ceux qui produisent un maximum de toxicité, il est possible de sélectionner des chitosanes avec un maximum d’efficacité et une toxicité minimale. Cette condition est remplie par les chitosanes possédant un degré d’acétylation élevé et un poids moléculaire important [96].

Cependant, le chitosane ne possède pas des propriétés physico-chimiques favorables à l’administration par voie orale des héparines. En effet, pour être actif, il doit porter des charges positives. Or son pKa est de 6,5 : lorsqu’il se trouve dans un milieu au pH inférieur à cette valeur il est protoné et donc soluble alors qu’à pH supérieur à cette valeur il n’est plus soluble. Afin d’augmenter la solubilité tout en conservant le bénéfice de la présence de charges positives à des pH physiologiques, des dérivés de chitosane ont été synthétisés.

3.2.1.4.2.2. DERIVE CATIONIQUE DU CHITOSANE : MONO-N-CARBOXYMETHYL CHITOSANE (MCC)

Le premier dérivé synthétisé fût le mono-N-carboxyméthyl chitosane [97]. Ce composé est issu de la substitution de l’amine primaire du chitosane par des groupements alkyles ce qui permet d’augmenter la solubilité aqueuse sans affecter le caractère cationique de la molécule. Le MCC ne se complexe pas avec l’héparine sous forme d’agrégats mais forme plutôt un gel.

Une étude utilisant du MCC de différentes viscosités et une HBPM a été menée *in vitro* sur des cellules Caco 2 et *in vivo* sur des rats. Le MCC de basse viscosité induit *in vitro* une diminution importante de la résistance électrique transépithéliale (TEER). Cela démontre que ce composé agit sur le passage paracellulaire de l'héparine. *In* vivo, une activité anti-Xa plasmatique maximale de 0,38 unité anti-Xa/mL a été observée. Ainsi, l'effet promoteur d'absorption de l'héparine se retrouve également *in vivo*. Cependant, au vu de la très importante dose administrée (7 200 unités anti-Xa/kg), l'effet reste assez modéré. D'autres dérivés ont donc été testés.

3.2.1.4.2.3. DERIVE ANIONIQUE DU CHITOSANE : *N*-SULFONATE-*N,O*-CARBOXYMETHYLCHITOSANE (SNOCC)

Ce dérivé est préparé à partir du N,O-carboxyméthyl chitosane par ajout de groupes sulfonates (SO_3^-, Na^+) (Figure 20 (A)). Des SNOCC de trois viscosités différentes (20, 40 et 60 cps) ont été préparés et d'abord testés *in vitro* sur des cultures de cellules Caco-2 [98]. Les SNOCC de viscosité élevé (40 et 60 cps) permettent, *in vitro*, une ouverture des jonctions serrées (diminution du TEER) corrélée à une augmentation de la perméabilité apparente de l'héparine.

A **B**

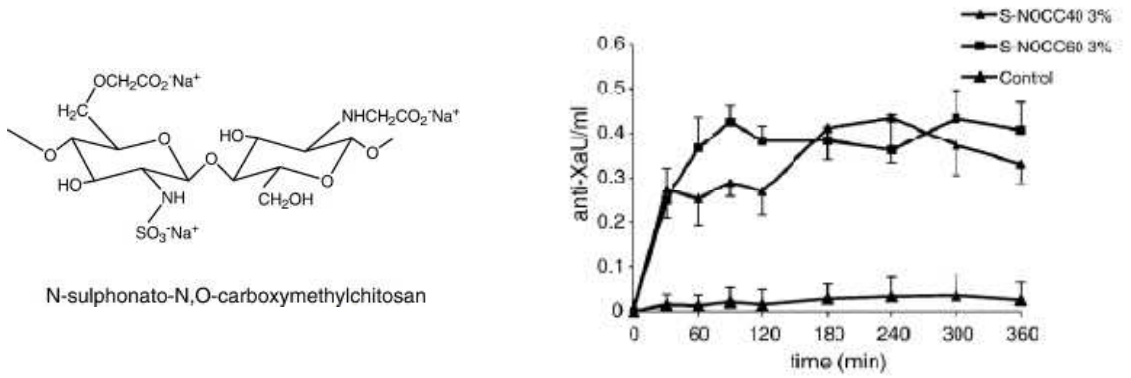


FIGURE 20 : (A) STRUCTURE CHIMIQUE DU SNOCC, (B) ACTIVITE ANTI-Xa PLASMATIQUE APRES ADMINISTRATION INTRADUODENALE DE 5000 UNITES ANTI-Xa/kg DE REVIPARINE AVEC OU SANS SNOCC (3% M/V) [98].

Les tests *in vivo* ont consisté en l'administration intraduodénale chez le rat de 5 000 unités anti-Xa/kg de reviparine et de SNOCC à la concentration de 3% (m/v) (Figure 20 (B)). Une activité anti-Xa plasmatique prolongée comprise entre 0,3 et 0,5 unité anti-Xa/mL est obtenue

jusqu'à 6 heures après l'administration. Un rapport d'effet promoteur (rapport de l'AUC de la forme testée par rapport à l'AUC du témoin) de 18 a été calculé dans le cas du SNOCC 60. L'étude ne présente pas de calcul de la biodisponibilité. Ainsi, si le SNOCC promeut l'absorption de l'héparine, le mécanisme d'action de ce dérivé anionique du chitosane reste à explorer.

3.2.1.4.3. POLYMERES THIOLES OU THIOMERES

Les thiomères sont des polymères mucoadhésifs qui ont la capacité d'ouvrir les jonctions serrées par l'intermédiaire du glutathion réduit.

En effet, ces polymères ont la capacité de réduire le glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). Après avoir servi dans cette réaction de réduction, les groupements thiols du polymère sont oxydés et se retrouvent liés deux à deux par l'intermédiaire d'une liaison thiol.

Cette propriété permet aux polymères thiolés présents à la surface de la membrane cellulaire de retourner la balance entre GSH et GSSG en faveur du GSH [99]. Or le GSH inhibe à 100% une phosphatase qui permet la diminution de la perméabilité des jonctions serrées, conférant ainsi la capacité d'ouvrir les jonctions serrées aux polymères thiolés.

Cette capacité d'action sur les jonctions serrées à la surface de la membrane plasmique couplée aux propriétés mucoadhésives de ce polymère en font un excellent candidat pour la délivrance *per os* des héparines.

Une première étude a utilisé des mini-comprimés contenant une HBPM à la dose de 797 UI/kg, un polymère thiolé et du GSH [100]. Un enrobage à base d'Eudragit L 100-55 a été réalisé afin de faciliter le gonflement et l'adhésion des comprimés à la membrane intestinale. Sur chambre d'Ussing un doublement de la perméabilité de l'héparine a été mis en évidence, accompagné d'une diminution de TEER importante confirmant ainsi l'action de ces polymères sur les jonctions serrées. L'administration *per os* des mini-comprimés chez le rat à permis l'obtention d'une biodisponibilité absolue de l'ordre de 19,9%. Un pic d'activité anti-Xa de 0,40 UI/mL a été obtenu à 12 heures et une activité supérieure à 0,12 unités anti-Xa/mL est maintenue pendant quasiment 24 heures.

Une étude proche, utilisant des mini-comprimés de formulation très similaire contenant soit une HBPM de 3 kDa ou 6 kDa a été menée chez le rat [101]. Par rapport à l'étude précédente, les quantités en thiomère et en GSH ont été réajustées alors que la quantité d'HBPM reste la même. Un très fort pic d'activité plasmatique à 2 heures (0,90 unités anti-Xa/mL, Figure 21) a

été observé dans le cas de l'HBPM de 3 kDa. Une activité de plus de 0,3 unité anti-Xa/mL est obtenue pendant 10 heures conduisant à une biodisponibilité relative de 19,1%. L'HBPM de 6 kDa en présence du thiomère induit une biodisponibilité (10,7%) et des taux d'activité anti-Xa plus faible.

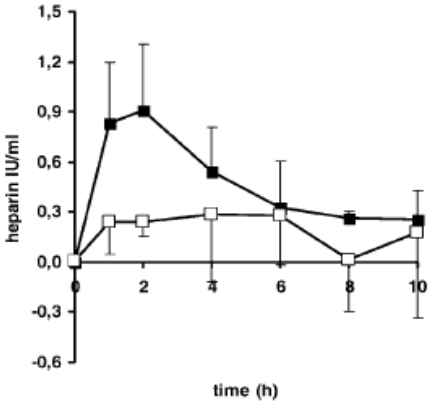


FIGURE 21 : EFFET DES THIOMERES EN PRESENCE DE GSH SUR L'ABSORPTION ORALE D'HEPARINE [101].

Activité anti-Xa plasmatique obtenue suite à l'administration orale chez le rat de 279 unités anti-Xa d'une HBPM de 3 kDa incorporée dans des mini comprimés contenant un polymère thiolé et du GSH (carrés pleins) ou un polymère non mucoadhésif, l'hydroxyéthylcellullose, servant de contrôle (carrés vides).

3.2.1.5. ADDITION DE NOUVEAUX GROUPEMENTS FONCTIONNELS : COUPLAGE AVEC DES ACIDES BILIAIRES

Des dérivés résultant de la conjugaison entre l'acide déoxycholique (DOCA) et l'héparine ont été synthétisés. L'acide déoxycholique est un acide biliaire d'origine naturelle, il ne pose donc, *a priori*, pas le problème limitant de la toxicité vis-à-vis de la membrane intestinale. Les propriétés hydrophobes de l'acide déoxycholique permettent d'atténuer le caractère hydrophile très marqué des héparines [102, 103].

Initialement, le premier dérivé a été obtenu par la conjugaison entre la fonction carboxyle de l'acide déoxycholique et la fonction amine de l'héparine [102, 104]. Différents types d'héparines ont été testées (HNF et HBPM de différentes masses moléculaires). D'une façon générale, l'activité anticoagulante de l'héparine présente dans le conjugué est toujours

légèrement diminuée [102, 105]. Des résultats *in vivo* prometteurs chez le rat (biodisponibilité absolue de 7,8%) ont étés obtenus suite à l'administration de 20mg/kg de conjugué (correspondant à une dose de 2686 UI/kg d'héparine) [102]. L'augmentation de l'absorption s'explique [103] par : i) les propriétés hydrophobes conférées par le conjugué et ii) l'interaction entre le conjugué et les récepteurs aux acides biliaires présents au niveau de la membrane intestinale permettant une internalisation du conjugué. En revanche, une étude similaire menée chez la souris a montré qu'il n'y a pas d'absorption des conjugués.

Ces résultats contrastés s'expliquent par l'existence de différences anatomiques au niveau du tractus gastro-intestinal. En effet, l'intestin du rat ne possède pas de glandes biliaires et produit donc en permanence des acides biliaires qui, de par leur propriétés tensioactives, permettent de bien disperser les conjugués. En revanche, l'intestin de la souris possède des glandes biliaires qui à jeun ne libèrent pas les acides biliaires. Cette absence d'acides biliaires libres conduit à l'agrégation des conjugués hydrophobes qui forment alors des nanoparticules auto-assemblées. Comme le tube digestif humain possède lui aussi un système de glandes biliaires, des systèmes ont été proposés afin d'éviter la formation de nanoparticules, tels qu'une microémulsion à base de tricapryline et de tensio-actifs non ioniques [106], l'utilisation de diméthyl sulfoxide (DMSO) afin d'aider à la mise en solution [107].

Dans le cas de la microémulsion, un pic d'activité plasmatique anti-Xa a été observé chez la souris (0,69 unités anti-Xa/mL) seulement 20 minutes après l'administration d'une dose de 50 mg/kg de conjugués (Figure 22 (A)).

Une activité anti-Xa supérieure à 0,12 unités anti-Xa/mL est maintenue pendant moins d'une heure et la biodisponibilité absolue observée est faible (1,5%). Le doublement de la dose (100 mg/kg) conduit chez le singe à l'obtention d'un pic d'activité plus faible (0,43 unité anti-Xa/mL) mais l'action est beaucoup plus prolongée dans le temps (Figure 22 (B)).

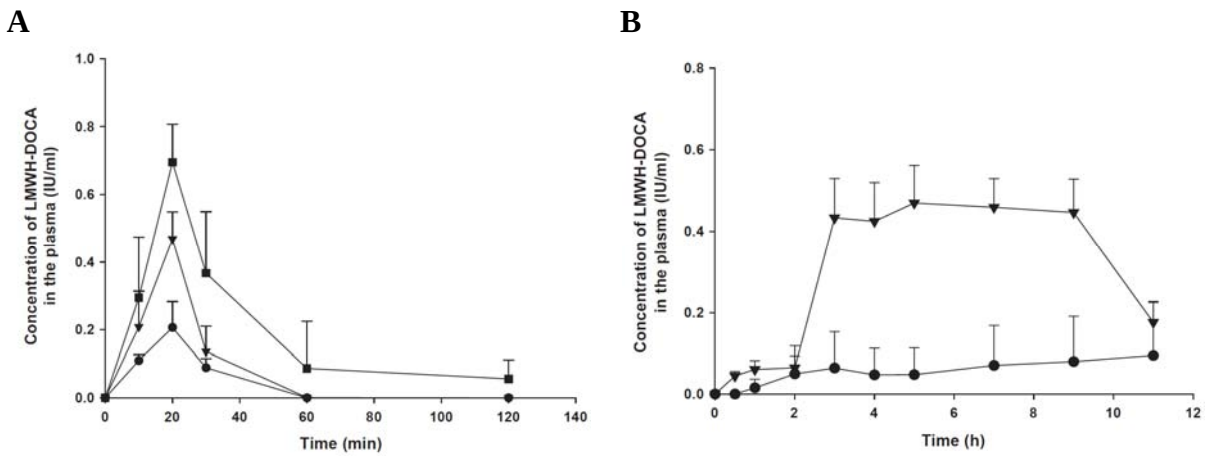


FIGURE 22 : ETUDES *IN VIVO* DE L'EFFET DES CONJUGUES HBPM-DOCA ADMINISTRES *PER OS*, SOUS FORME D'UNE MICROEMULSION, CHEZ LE SINGE ET LA SOURIS [106].

(A) Concentration plasmatique en HBPM-DOCA après administration orale d'une microémulsion de tricapryline chez la souris, ● 10 mg/kg, ▼ 20 mg/kg, ■ 50 mg/kg.

(B) Concentration plasmatique en HBPM-DOCA après administration orale chez le singe, ● d'une solution de conjugués HBPM-DOCA (100 mg/kg), ▼ de la microémulsion de tricapryline contenant le conjugué HBPM-DOCA (100mg/kg).

L'utilisation du DMSO pour la solubilisation des conjugués a été évaluée dans de nombreuses études [105, 107, 108], là encore chez la souris et le singe. Une biodisponibilité absolue relativement importante a été obtenue chez la souris (17,6%) suite à l'administration de doses assez faibles (10 mg/kg, Figure 23 (A)) [108]. Le profil d'activité présente une forme assez similaire a celui obtenu avec la microémulsion (T_{max} à 20 minutes) mais l'effet est plus prolongé (jusqu'à 2 heures). Les études chez le singe ont confirmé cette prolongation de l'effet jusqu'à 6 heures (Figure 23 (B)). La biodisponibilité correspondante est de 9,1% avec un C_{max} à 0,49 unités anti-Xa/mL [105]. Les études de toxicité menées en parallèle [109] ont montré une absence d'effet nocif de ces composés chez le singe. Enfin, l'hypothèse d'une internalisation des conjugués au niveau des récepteurs aux acides biliaires présents au niveau de l'intestin a été confirmée [105].

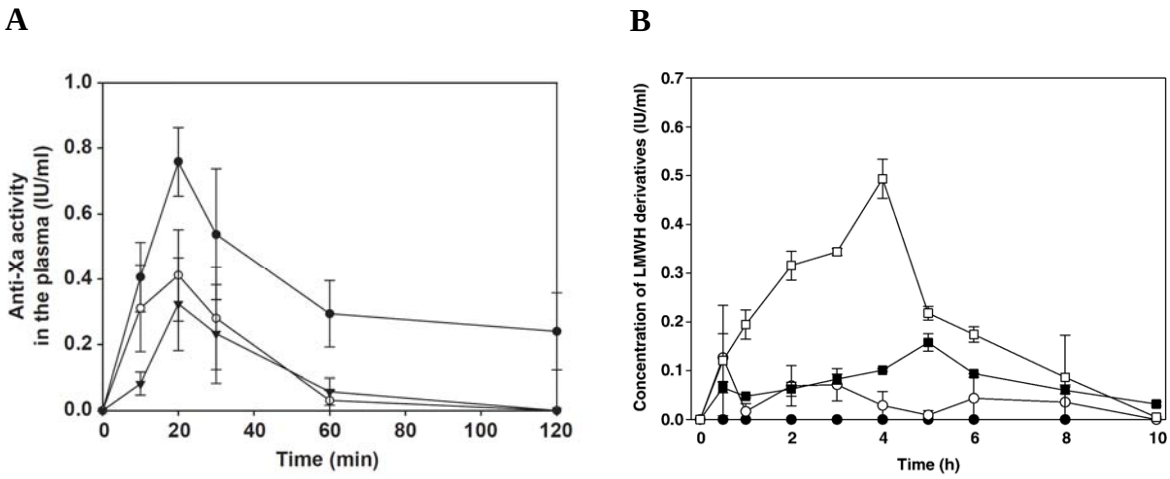


FIGURE 23 : ETUDES *IN VIVO* DE L'EFFET DES CONJUGUES HBPM-DOCA ADMINISTRES *PER OS*, SOUS FORME DE SOLUTION, CHEZ LE SINGE ET LA SOURIS [107, 108].

(A) Activité anti-Xa plasmatique obtenue après administration orale chez la souris d'une solution contenant 10% de DMSO et des conjugués HBPM-DOCA aux doses de : ● 10 mg/kg, ○ 5 mg/kg, ▼ 3 mg/kg [108].

(B) Profils d'absorption orale chez le singe obtenus suite à l'administration orale : ● d'HBPM, ○ d'HBPM dans une solution contenant 10% de DMSO, ■ de conjugués HBPM-DOCA (10 mg/kg), □ de conjugués HBPM-DOCA (10 mg/kg) dans une solution contenant 10% de DMSO [107].

Enfin, afin d'éviter l'attachement par liaisons covalentes de l'héparine avec le sel biliaire, qui a pour conséquence de modifier la structure des héparines et donc de diminuer leur activité biologique, des complexes ont été formés par interactions électrostatiques (appariement d'ions) [110]. Pour cela un sel biliaire à charges positives, la déoxycholyléthylamine (DCEA), a été utilisé. Comparés aux conjugués HBPM-DOCA, ces nouveaux composés suite à l'administration orale chez le rat d'une même dose (50 mg/kg), montrent un effet promoteur d'absorption supérieur (C_{max} = 0,80 ± 0,12 unités anti-Xa/mL contre 0,34 ± 0,06 unité anti-Xa/mL, Figure 24). Cependant la biodisponibilité absolue reste faible (3,08%).

Ce système reste donc encore à améliorer bien que des résultats intéressants aient été obtenus grâce à l'association acide biliaire / héparine.

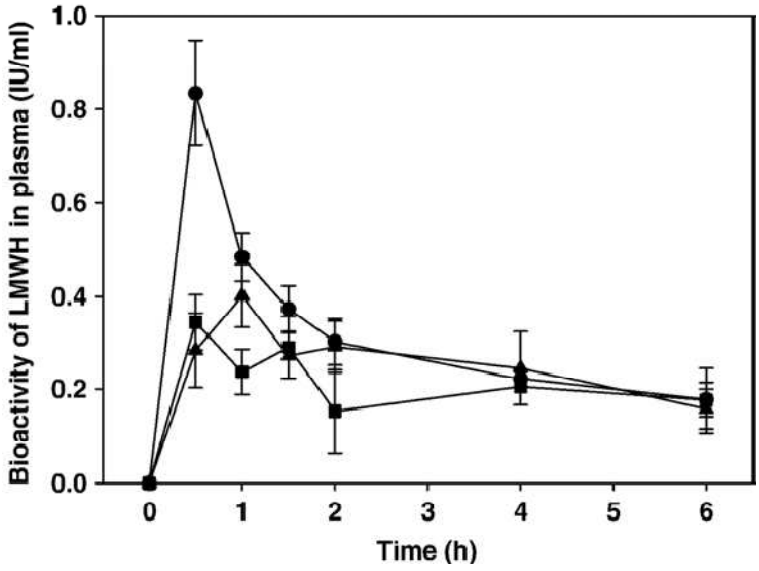


FIGURE 24 : ACTIVITE ANTI-Xa PLASMATIQUE APRES ADMINISTRATION ORALE DE DIFFERENTS COMPLEXES ACIDES BILIAIRES-HBPM CHEZ LE RAT [110].

Les complexes suivants ont été administrés à la dose de 50 mg/kg : ● HBPM-DCEA, ■ HBPM-DOCA, ▲HBPM-EDTA (témoin).

3.2.1.6. FORMATION DE PAIRES D'IONS AMINES

3.2.1.6.1. SELS DIAMINE D'HEPARINE

Dans ce cas, l'idée est de diminuer la charge importante des héparines en réalisant une combinaison avec des mono ou des diamines lipophiles jouant le rôle de contre-ions. Il y a ainsi formation de structures à type d'agrégats micellaires, stables en solution [111]. Ces composés couplés avec des HNF ou avec des HBPM ont été testés respectivement chez le chien beagle [112] et le lapin [113]. Il a été montré qu'ils facilitaient l'absorption orale de l'héparine. Cependant, un frein très important à leur utilisation est, là encore, leur toxicité vis-à-vis de l'appareil digestif. Ce système a, par conséquent, été abandonné.

3.2.1.6.2. UTILISATION DE LA L-ARGININE

Une co-administration d'héparine et de L-arginine, un acide aminé non essentiel chargé positivement, a été étudiée. La L-arginine est le principal précurseur physiologique du monoxyde d'azote (NO). Or le monoxyde d'azote est responsable d'une augmentation de la

perméabilité cellulaire par action sur les jonctions serrées, sans toutefois causer de lésions cellulaires irréversibles.

L'administration par gavage à des rats d'une dose de 1 200 unités anti-Xa/kg d'HBPM et de 250 mg/kg de L-arginine a conduit à l'obtention d'un pic d'activité plasmatique de 0,26 unité anti-Xa/mL après 90 minutes. La biodisponibilité absolue n'est cependant pas très élevée (4,1%) [114].

D'autres systèmes ont également utilisé l'arginine tels que les dendrons.

3.2.1.6.3. DENDRONS

3.2.1.6.3.1. GENERALITES

Un dendron est une molécule comportant, d'une part, un site branché muni d'extrémités réactives et, d'autre part, un site apte à se fixer sur un support moléculaire ou solide (Figure 25 (A)). Les dendrons sont utilisés comme des briques pour construire les dendrimères.

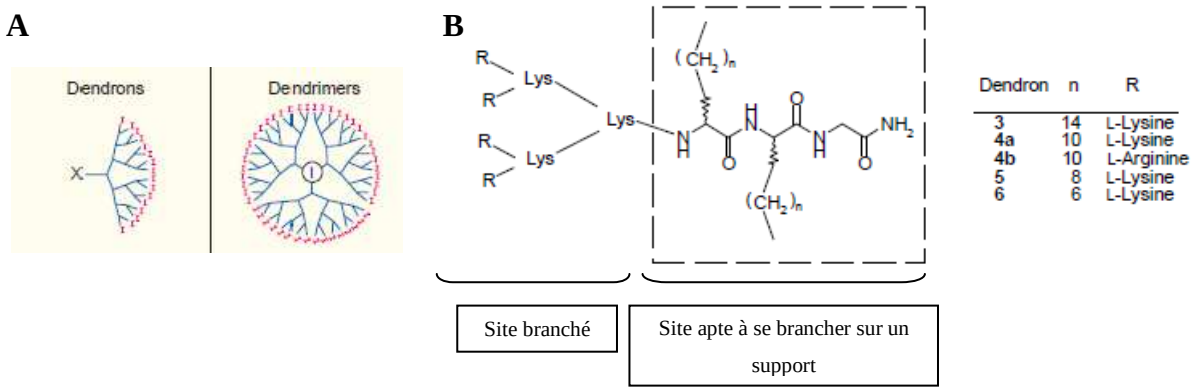


FIGURE 25 : STRUCTURE DE DENDRONS [115, 116].

(A) Structure générale des dendrons et dendrimères [115].

(B) Structure de dendron à cœur polycationique lipophile 3 à 6 utilisés pour l'administration d'héparine par voie orale [116].

Cadre pointillé = partie lipophile, Lys : L-lysine

Un dendrimère est une macromolécule sphérique obtenue par polymérisation. Leur structure chimique est parfaitement définie : ils comprennent un cœur duquel part un grand nombre de branches (ou fuseaux) toutes identiques, se terminant à leur extrémité par des groupements actifs similaires. Ce sont donc des molécules hautement fonctionnalisées et organisées : ainsi la masse moléculaire est contrôlée et l'indice de polydispersité faible.

Les dendrons et les dendrimères n'ont été synthétisés que récemment mais les domaines d'application de ces molécules apparaissent d'ores et déjà comme très larges.

3.2.4.6.3.2. UTILISATION POUR L'ADMINISTRATION ORALE D'HEPARINE

Des dendrons ont été synthétisés, leurs branches sont constituées par des acides aminés chargés positivement (lysine ou arginine) (Figure 25 (B)). Les charges négatives portées par les héparines forment alors des paires d'ions avec les charges positives des acides aminés présents en bout de branche. La partie lipophile du dendron est conservée intacte et peut alors agir comme promoteur d'absorption.

Il a été observé que les dendrons à résidus lysine sont plus actifs que ceux à résidus arginine. Ainsi, 30 minutes après l'administration de dendrons à branches lysine à des rats (dose de 7 500 unités anti-Xa/kg) une activité anti-Xa de 0,24 unité anti-Xa/mL a été obtenue (Figure 26). L'aire sous courbe correspondante est doublée par rapport au témoin [116].

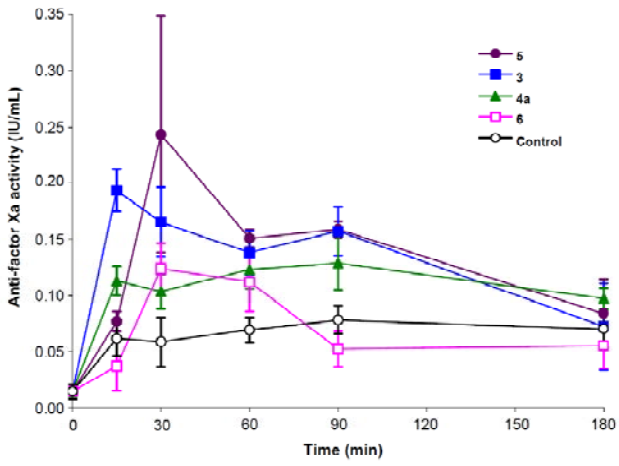


FIGURE 26 : ACTIVITE ANTI-Xa PLASMATIQUE SUITE A L'ADMINISTRATION ORALE CHEZ LE RAT D'HBPM (7 500 UNITES ANTI-XA/kg) AVEC OU SANS DENDRONS (3, 4A, 5 ET 6 ; 7 MOL.) [116].

3.2.1.7. PEPTIDE SYNTHETIQUE AT 1002

Il s'agit d'un hexapeptide synthétique, dérivé d'une toxine des zonula occludens. Cette toxine peut ouvrir les jonctions serrées de façon réversible et non toxique.

Une étude chez le rat a permis d'obtenir une activité maximale plasmatique de 0,47 unité anti-Xa/mL suite à la co-administration de 1 200 unités anti-Xa/kg d'HBPM avec de l'AT 1002 (Figure 27). La biodisponibilité absolue correspondante est plutôt faible (6,1%) alors que la biodisponibilité relative est meilleure (20,5%) [117].

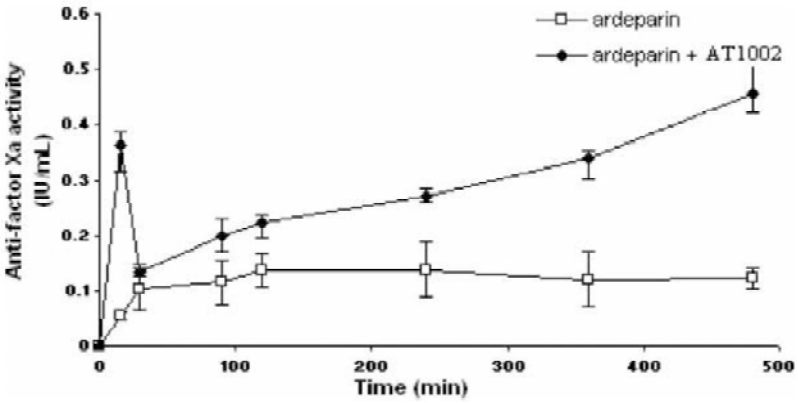


FIGURE 27 : EFFET DE L'AT 1002 SUR L'ABSORPTION DE L'ARDEPARINE ADMINISTREE PAR VOIE ORALE CHEZ LE RAT[117].

Activité anti-Xa plasmatique suite à l'administration *per os* chez le rat de solutions contenant de l'ardeparine seule (1 200 unités anti-Xa/kg) ou avec de l'AT 1002 (100 µg/kg).

De plus, une étude histologique a démontré que l'intégrité de la barrière épithéliale était préservée. Enfin, le composé AT 1002 ne s'est pas révélé cytotoxique aux concentrations utilisées.

3.2.2.1. FORMES INNOVANTES : MICRO- ET NANOPARTICULES

L'avantage des formes particulaires réside dans le fait qu'elles permettent de :

- protéger les substances actives, évitant notamment leur dégradation prématurée au niveau de l'estomac,
- libérer de façon contrôlée les substances actives,
- augmenter l'absorption intestinale des substances actives.

Des particules encapsulant de l'héparine ont été préparées par une méthode de double émulsion (w/o/w) suivie d'une évaporation (ou d'une extraction) du solvant organique [118] (Figure 28) Les premières études *in vivo*, menées chez le lapin, ont montré de très bons résultats principalement dans le cas de mélanges en proportions égales entre un polymère biodégradable (acide polylactique et polyglycolique (PLGA 50/50) ou poly-ε-caprolactone (PCL)) et un polymère non biodégradable chargé positivement (Eudragit® RL ou Eudragit® RS).

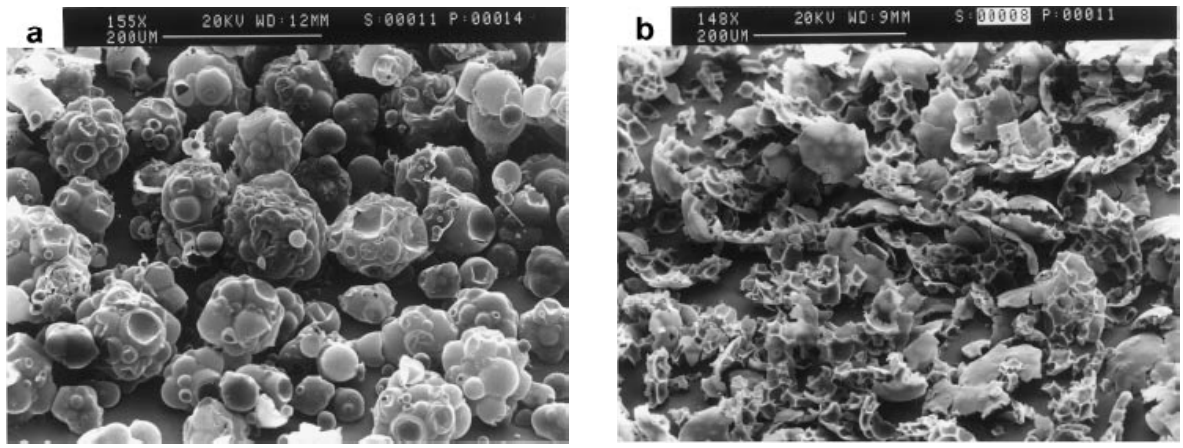


FIGURE 28 : PHOTOGRAPHIES DE MICROPARTICULES D'HEPARINE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE [119].

Microparticules préparées à partir d'un mélange Eudragit® RS/PLGA avant (a) et après (b) libération de l'héparine dans un tampon phosphate à 37°C et à pH 7,4 pendant 24 heures

Ainsi, il a été montré que le TCA est doublé durant 3 heures (Figure 29 (A)) suite à l'administration orale de microparticules d'Eudragit® RS/PLGA contenant une HNF à la dose de 600 UI/kg. La biodisponibilité absolue correspondante est de 48 % [120].

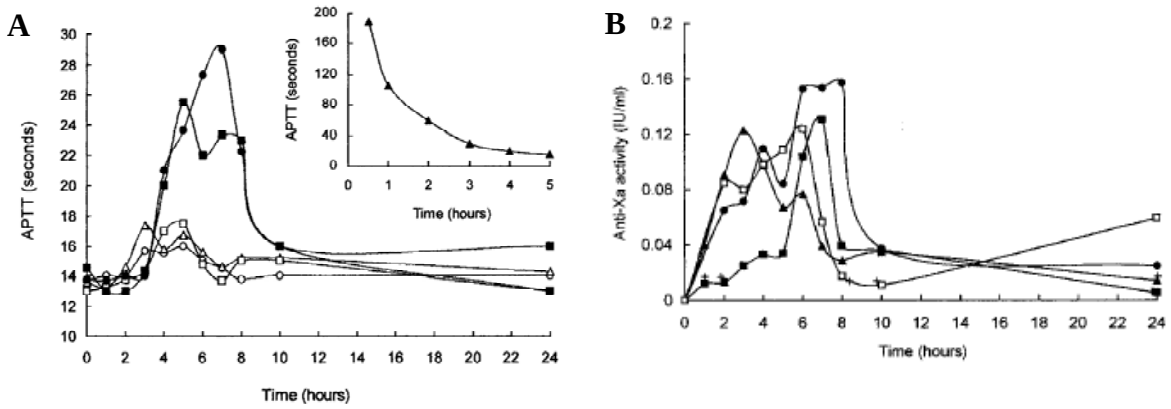


FIGURE 29 : TCA ET ACTIVITE ANTI-Xa PLASMATIQUE OBTENUS SUITE A L'ADMINISTRATION ORALE D'HEPARINE MICROENCAPSULEE A DES LAPINS [120, 121].

(A) Valeurs du TCA (en secondes) en fonction du temps suivant l'administration orale chez le lapin de microparticules d'HNF (600 UI/kg) préparées à partir des formulations suivantes : ■ RS/PLGA, ● RS/RL/PLGA, ○ PCL/gélatine A, □ PLGA/gélatine A, Δ RS/gélatine A et dans l'insert administration I.V. d'une solution d'héparine à la même dose [120].

(B) Activité anti-Xa plasmatique suite à l'administration orale de nanoparticules d'HNF préparées à partir des formulations suivantes : ● RL/PCL, ■ RS/PLGA, ▲RS/RL/PLGA, □ RS [121].

Une expérience similaire a été menée avec des nanoparticules d'HNF. Des résultats voisins ont été obtenus notamment avec les formulations d'Eudragit® RS/PLGA et d'Eudragit RL/PCL : un doublement du TCA est observé. Une activité anti-Xa significative (jusqu'à 0,16 unité anti-Xa/mL) est également détectée (Figure 29 (B)). Cependant, la biodisponibilité relative la plus élevée n'est dans ce cas que de 23 % [121].

De meilleurs résultats ont été trouvés avec des nanoparticules d'HBPM formulées à partir d'Eudragit® RS/PCL. A la dose de 600 unités anti-Xa/kg, un pic de concentration à 1,8 unité anti-Xa/mL est atteint 5 heures après l'administration (Figure 30). Une biodisponibilité absolue de 51,3% est ainsi obtenue [122].

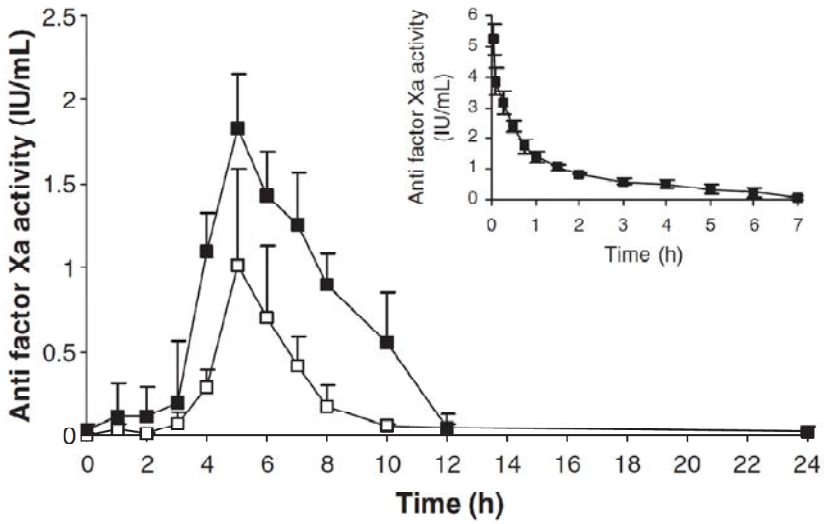


FIGURE 30 : ACTIVITE ANTI-Xa PLASMATIQUE OBTENUE SUITE A L'ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE A DES LAPINS DE TINZAPARINE ENCAPSULEE AU SEIN DE NANOPARTICULES POLYMERIQUES [122].

Activité anti-Xa suite à l'administration orale chez le lapin de nanoparticules de tinzaparine à la dose de 600 unités anti-Xa/kg ■ et 200 unités anti-Xa/kg □. Insert : activité anti-Xa moyenne en fonction du temps suite à une administration intraveineuse de tinzaparine en solution à la dose de 200 unités anti-Xa/kg.

Ces résultats s'expliquent principalement par le fait que l'Eudragit® RS (ou RL), de charge positive, permet la formation de nombreuses interactions avec les charges négatives des héparines : ces forces permettent d'obtenir des taux d'encapsulation élevés mais elles limitent en contrepartie la libération de la substance active.

Le couplage avec le polymère biodégradable permet de compenser l'effet de l'Eudragit®. En effet, ce polymère est hydrophobe, contrairement aux héparines : les liaisons polymère biodégradable/héparines sont donc faibles. Le taux d'encapsulation de la substance active est par conséquent limité mais sa libération est facile. Ainsi, le mélange des deux polymères permet d'obtenir un compromis entre une bonne encapsulation et une libération convenable de la substance active.

De plus, il a été démontré que les nanoparticules cationiques formulées à partir de ce mélange possèdent des propriétés mucoadhésives [123], permettant ainsi d'expliquer en partie les résultats *in vivo*.

3.2.2.2. GRANULES

Afin de s'affranchir de l'utilisation de solvants, des granulés d'héparines destinés à l'administration par voie orale ont été réalisés à base de cellulose microcristalline et d'Eudragit® RS 30D. Des granulés contenant une dose de 600 ou 1 200 unités anti-Xa/kg de bémiparine ont été administrés. La présence d'Eudragit® RS 30D est nécessaire à l'obtention d'activité anti-Xa supérieures au seuil thérapeutique de 0,2 unité anti-Xa/mL. Le pic d'activité le plus élevé (0,54 unité anti-Xa/mL) est obtenu 4 heures après l'administration des granulés contenant l'Eudragit® RS 30D à la dose de 600 unités anti-Xa/kg (Figure 31). Une biodisponibilité relative de 29% a été ainsi obtenue [124].

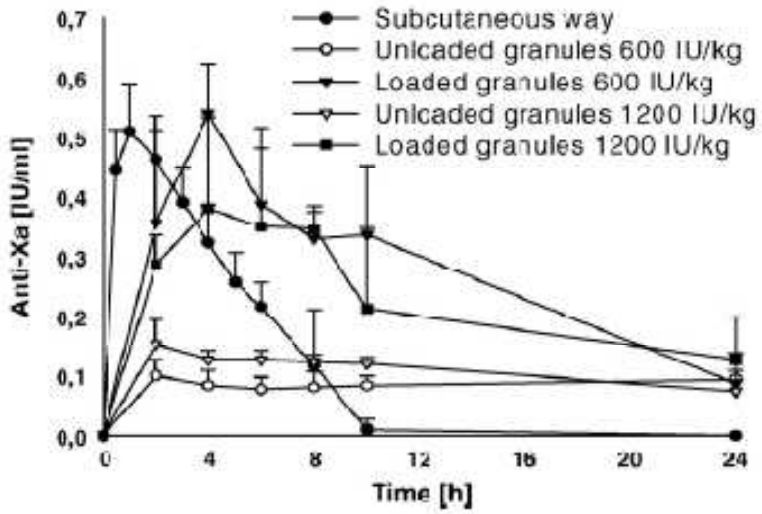


FIGURE 31 : ACTIVITE ANTI-Xa PLASMATIQUE OBTENUE SUITE A L'ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE A DES LAPINS DE GRANULES DE BEMIPARINE [124].

Activité anti-Xa en fonction du temps suite à l'administration orale chez le lapin d'une dose unique de granulés de bémiparine contenant (=loaded) ou non (=unloaded) de l'Eudragit® RS 30D. La dose de bémiparine administrée est de 600 ou de 1 200 unités anti-Xa/kg.

De plus, les granulés constituent une nouvelle forme solide d'héparine de fabrication simple, facilement transposable à l'échelle industrielle.

D'une façon plus générale, les travaux menés à partir de systèmes galéniques utilisant de l'Eudragit® RS sont prometteurs en ce qui concerne l'absorption par voie orale des héparines. En effet, comparés aux autres systèmes (récapitulatif complet présenté dans le Tableau 5), ils permettent l'obtention de biodisponibilités très élevées pour des doses administrées

relativement faibles, comparables aux doses parentérales. En effet, ce tableau montre que les doses administrées, jusqu'à présent testées par voie orale chez l'animal, s'échelonnent de 600 unités anti-Xa/kg (cas des microparticules et nanoparticules [122, 125]) à 12 680 unités anti-Xa/kg (cas de l'étude utilisant des conjugués DOCA-HBPM [126]). Si certaines études ne présentent pas de valeurs de biodisponibilité, les autres montrent des biodisponibilités (absolues ou relatives par rapport à l'injection de la solution commerciale en IV ou en SC) variant de quelques pourcents [106, 110, 114] jusqu'à 42 et 51 pourcents (valeurs obtenues suite à l'administration de microparticules et de nanoparticules polymériques à la dose de 600 unités anti-Xa/kg [120, 122]).

Suite aux résultats encourageants utilisant des particules polymériques pour la délivrance des héparines par voie orale, il est nécessaire de déterminer les mécanismes qui régissent le passage de cette macromolécule à travers la barrière intestinale.

Nous allons donc voir dans la section suivante quelles sont les caractéristiques de la barrière intestinale, comment des particules et des molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, peuvent la franchir, quelles sont les méthodes qui permettent d'étudier ce passage aussi bien au niveau tissulaire que cellulaire et enfin, nous nous focaliserons sur les études ayant permis de déterminer la voie de passage de l'héparine au niveau tissulaire ou cellulaire, suite à une administration orale.

TABLEAU 5 : RECAPITULATIF DES RESULTATS *IN VIVO* DES PRINCIPAUX SYSTEMES D'ADMINISTRATION ORALE DES HEPARINES.

Auteur	Système	Héparine	Modèle animal Mode d'administration	Dose héparine [Dose de promoteur]	C_{max} (T_{max})	F (%) ou ER (adim.)	Effet > 0,12 U a-Xa/mL	Mécanisme de passage supposé	Toxicité
Lee D.Y. 2007	Complexe DCEA-HBPM	Ardeparine	*In vivo* / Rat Gavage / Sol°	50 mg/kg complexe [ratio 1:5, DCEA:HBPM]	0,83 U a-Xa /mL (38 min.)	F_{abs} = 3,08	6 h.		Tox. non observée
Kim S.K. 2007	Conjugué DOCA-HBPM + DMSO (10%)	Nadroparine	*In vivo* / Singe Gavage / Sol°	860 U a-Xa /kg [10 mg/kg]	0,49 U a-Xa /mL (4 h.)	F_{abs} = 9.1	8 h.		NR
Kim S.K. 2006	Conjugué DOCA-HBPM + DMSO (10%)	Nadroparine	*In vivo* / Souris Gavage / Sol°	860 U a-Xa /kg [10 mg/kg]	0,75 U a-Xa /mL (20 min.)	F_{abs} = 17,6	2 h.		Nulle (à long terme)
Lee Y.K. 2006	Conjugué DOCA-HBPM + acides biliaires (AB)	HBPM	*In vivo* / Rat Gavage / Sol°	12 680 U a-Xa/kg [100 mg/kg]	0,76 U a-Xa /mL (1h.)	NR	NR	↘ de l'hydrophilie des héparines	NR
			In vivo / Souris Gavage / Sol°	12 680 U a-Xa/kg [100 mg/kg]	Sans AB : 0,15 U a-Xa /mL (15 min.) Avec AB : 0,42 U a-Xa /mL (10 min.)	NR	NR	Interaction des conjugués avec récepteurs des acides biliaires suivie par diffusion simple	Tox. non observée
Kim S.K. 2005	Microémulsion de conjugué DOCA- HBPM	Nadroparine	*In vivo* / Souris Gavage / microémulsion	4850 U a-Xa/kg [50 mg/kg]	0,69 U a-Xa /mL (20 min.)	F_{abs} = 1,5	50 min.	Interaction des conjugués avec le mucus	Tox. non observée
			In vivo / Singe Per os / microémulsion	9700 U a-Xa/kg [100 mg/kg]	0,43 U a-Xa /mL (3 h.)	NR	6h.		NR
Lee Y.K. 2001	Conjugué DOCA-HBPM	HBPM	*In vivo* / Rat Ad. intragastrique / Sol°	2680 U a-Xa /kg [20 mg/kg]	TCA_{max} : 52,5 sec. (1 h.)	F_{abs} = 7,8 (1h)	NR		Tox. non observée
Lee Y.K. 2000	Conjugué DOCA-HNF	HNF 12 000 Da	*In vivo* / Rat Ad. Intragastrique / Sol°	NR [200 mg/kg]	TCA_{max} : 136 sec. (1h.)	NR	NR		Tox. non observée
Lamprecht A. 2007	MPs de gomme arabique/gélatine	Tinzaparine	In vivo / Lapin *Per Os* / Gelule	600 U a-Xa/kg [NR]	0,17 U a-Xa /mL (2 h.)	F_{rel} = 4,2	≈ 2 h.	Protection contre pH et enzymes	NR
Hoffart V. 2006	NPs PCL / ERS	Tinzaparine	In vivo / Lapin *Per Os* / Gelule	600 U a-Xa/kg	1,8 U a-Xa /mL (5 h.)	F_{abs} = 51,3	≈ 8 h.	Propriétés mucoadhésives de l'Eudragit® RS	NR
Jiao Y. 2002	NPs ERL / PCL	HNF	In vivo / Lapin *Per Os* / Gelule	600 U a-Xa/kg	0,16 UI/mL (6-8 h.)	F_{abs} = 22,8	≈ 24 h.	Voie para- ou intracellulaire, capture par les plaques de Peyer et/ou mucoadhésion	NR
Jiao Y. 2002	MPs ERS / PLGA	HNF	In vivo / Lapin *Per Os* / Gelule	600 U a-Xa/kg	TCA_{max} : 22-32 s (5-8 h.)	F_{abs} = 42,5	-	NR	NR
Motlekar N.A. 2005	Caprate de Na	Ardeparine	In vivo / Rat Gavage / Sol°	2 400 U a-Xa/kg [100 mg/kg]	0,36 U a-Xa /mL (30 min.)	F_{abs} = 9,2 F_{rel} = 30,3	≈ 7 h.	Ouverture des JS	Tox. non observée
Motlekar N.A. 2006	Peptide AT 1002	Ardeparine	In vivo / Rat Gavage / Sol°	1 200 U a-Xa/kg [100 µg/kg]	0,47 U a-Xa /mL (300 min.)	F_{abs} = 6,1 F_{rel} = 20,5	≈ 8 h.	Ouverture réversible des JS	Tox. non observée

Auteur	Système	Héparine	Modèle animal Mode d'administration	Dose héparine [Dose de promoteur]	C_{max} (T_{max})	F (%) ou ER (adim.)	Effet > 0,12 U a-Xa/mL	Mécanisme de passage supposé	Toxicité
Motlekar N.A. 2006	L-arginine	Ardeparine	In vivo / Rat Gavage / Sol°	1 200 U a-Xa/kg [250 mg/kg]	0,26 U a-Xa /mL (90 min.)	F_{abs} = 4,1 F_{rel} = 13,7	≈ 8 h.	Ouverture des JS médiée par le NO	Tox. non observée
Motlekar N.A. 2006	Acide 18β-glycyrrhétinique	Ardeparine	In vivo / Rat Gavage / Sol°	1 200 U aXa/kg [50 g/kg]	0,28 U a-Xa /ml (2 h.)	F_{abs} = 4,01 F_{rel} = 13,3	≈ 8 h.	Effet tensio-actif Ouverture des JS	Tox. non observée
Rama Prasad Y.V. 2004	Labrasol®	Parnaparine	*In vivo* / Rat Intrajéjunal	200 U anti-Xa/kg [50 g/kg]	0,50 U a-Xa /mL (30 min.)	NR	4h.	Transport actif	Tox. non observée
Hayes P.Y. 2006	Dendrons	HBPM	*In vivo* / Rat Gavage / Suspension	7 500 U a-Xa/kg 7 mol. équiv.	0,24 U a-Xa /mL (30 min.)	ER = 3,4	20 min.	Formation de complexes lipophiles et/ou effet tensio-actif	NR
Thanou M. 2007	SNOCC	Réviparine	*In vivo* / Rat Intraduodénale	5 000 U a-Xa/kg [3% m/v]	0,40 U a-Xa /ml (5h.)	ER = 18,5		Voie paracellulaire Ouverture des jonctions serrées	NR
Thanou M. 2001	MCC	Opocrin	*In vivo* / Rat Intraduoduodénale	7 200 U a-Xa/kg [3% m/v]	0,38 U a-Xa /mL (300 min.)	ER = 7,0	≈ 7 h.		NR
Thanou M. 2001	Carbopol® 934 P	Opocrin	*In vivo* / Rat Intraduodénale	10 800 U a-Xa /kg [1% (m/v)]	NR	ER = 10,5	≈ 7 h.	Mucoadhésion et/ou modification des JS	Tox. non observée
			In vivo / Cochon Intraduodénale	5 000 UI/kg [1% (m/v)]	NR	ER = 2,8	≈ 6 h.		
Schmitz 2004	Thiomère	HBPM	*In vivo* / Rat *Per os* / Mini-comprimés	797 U a-Xa /kg [36 mg/kg]	0,90 U a-Xa /mL (2 h.)	F_{rel} = 19,1	≈ 10 h.	Mucoadhésion	NR
Kast 2003	Thiomère	HBPM	*In vivo* / Rat *Per os* / Comprimés	797 U a-Xa/kg [20 mg/kg]	0,4 U a-Xa /mL (12 h.)	F_{abs} = 19,9	22 h.		NR
Grabovac 2007	Papaïne	HBPM	*In vivo* / rats *Per os* / Comprimés	778 U a-Xa/kg [9,7 mg]	0,35 U a-Xa/mL (2 h.)	F_{rel} = 9,1	7 h	Agent mucolytique Voie paracellulaire	NR
Gonze MD 2000	SNAC	HNF	*In vivo* / Rat Intragastrique / Sol°	30 mg/kg, 2x/jour [300 mg/kg], 2x/jour	↘ incidence de la TVP 90% ↘ taille clou de 86%	NR	NR	NR	NR
Gonze MD 1998	SNAC	HNF	*In vivo* / Rat Intragastrique / Sol°	300 UI/kg [300 mg/kg]	↘ incidence de thrombus de 72% ↘ taille de thrombus 86%	NR	NR	NR	NR
Rivera T.M. 1997	SNAC	HNF	*In vivo* / Rat Gavage / Sol°	16 564 UI/kg [300 mg/kg]	TCA_{max} : 102 sec. (30 min.)	NR	NR	Transport transcellulaire par ↗ de la lipophilie des héparines Transport facilité ?	Aucun effet observable à 28 jours
			In vivo / Singe Gavage / Sol°	4 971 UI/kg [150 mg/kg]	TCA_{max} : 200 sec. (2h.)	NR	NR		
Sarlatash K. 2000	SNAD	Enoxaparine	*In vivo* / Porc Intragastrique / Sol°	2 000 U a-Xa/kg [50 mg/kg]	↘ taille de thrombus 60%	NR	NR	Interactions non covalentes puis dissociation du complexe dans la circulation sanguine	NR
Sarlatash K. 1999	SNAD	Enoxaparine	*In vivo* / Rat Gavage / Sol°°	1 500 U a-Xa/kg [300 mg/kg]	Incidence TVP = 0% ↘ taille de thrombus 90%	NR	NR		NR
Mousa S.A. 2007	SNAC	HNF	Essai clinique	75 000 UI [500 mg]	0,55 U a-Xa/mL (40 min.)	F = 2,2	NR	Passage passif par voie transcellulaire	Effets indésirables légers (douleur thoracique, dyspepsie)
					0,49 U a-IIa/mL (40 min.)	F = 1,3	NR		

Auteur	Système	Héparine	Modèle animal Mode d'administration	Dose héparine [Dose de promoteur]	C_{max} (T_{max})	F (%) ou ER (adim.)	Effet > 0,12 U a-Xa/mL	Mécanisme de passage supposé	Toxicité
Berkowitz S.D. 2003	SNAC	HNF	Essai clinique phase 1	90 000 UI [2,25 g]	J1 :0,29 U a-Xa/mL (30 min.) J6 :0,14 U a-Xa/mL (30 min.)	NR	NR	NR	NR
			Essai clinique phase 2	60 000 UI [1,5g]	Pas de ≠ / SC d'HNF pour : -incidence de saignements et de l'embolie	NR	NR	NR	NR
				90 000 UI [2,25 g]		NR	NR	NR	NR
Baughman R.A. 1998	SNAC	HNF	Essai clinique	30 000 UI/kg [10,5 g/kg]	0,2 U a-Xa/mL 0,22 U a-IIa/mL (1h.)	NR	NR	NR	Nausée / vomissement (non observés si système administré sous forme de sirop)
				150 000 UI/kg [2,25 g/kg]	0,21 U a-Xa/mL (0,5h.) ↗ TCA (1,75x)	NR	NR		

A. a-Xa : Activité anti-Xa
A. a-IIa : Activité anti-IIa
Adim. : Adimensionnel
ER : Enhanced Ratio (aire sous courbe du composé testé / aire sous courbe du témoin)
$F_{rel/abs}$: biodisponibilité relative ou absolue NR : Non renseigné
HBPM : Héparines de bas poids moléculaire
HNF : Héparines non fractionnées
JS : jonctions serrées
SC : Sous-cutanée
Sol° : Solution
TCA : temps de céphaline activée
Tox. : Toxicité
TVP : Thrombose veineuse profonde
U : Unités
UI : Unités internationales

4. ETUDE DE L'ABSORPTION DES HEPARINES

Le tractus gastro-intestinal est conçu d'une part pour digérer et absorber sélectivement les nutriments, les vitamines et les cofacteurs essentiels alors que d'autre part il joue un rôle de barrière imperméable empêchant l'entrée des pathogènes, des toxines, des macromolécules non digérées et des particules présentes de façon naturelle dans l'environnement. De la même façon, cette barrière affecte de façon majeure la perméabilité des substances actives, empêchant l'absorption d'un grand nombre d'entres elles. C'est le cas de la molécule d'héparine. Cependant, nous avons observé de par les études *in vivo*, qu'il est possible de faciliter le passage intestinal de cette molécule au moyen de différents systèmes, tels que notamment des microparticules polymériques.

Toutefois, après avoir prouvé qu'un passage intestinal existe, il est nécessaire dans un second temps d'étudier à quel niveau de l'intestin cette absorption a lieu et par quels mécanismes cellulaires la molécule d'héparine arrive à franchir l'épithélium intestinal pour rejoindre le flux sanguin.

Ainsi, après un rappel sur la physiologie du tractus gastro-intestinal et sur les structures responsables de l'effet barrière, cette partie bibliographique va ensuite se focaliser sur les différents modèles tissulaires et cellulaires permettant d'évaluer la perméabilité et les mécanismes de passage d'une substance active. Il sera ensuite abordé certains aspects techniques des études de passage sur les épithéliums issus de la culture cellulaire. Enfin les principaux résultats des études de passage utilisant l'héparine seront évoqués.

4.1. GENERALITES SUR LES MECANISMES D'ABSORPTION

4.1.1. PHYSIOLOGIE DE L'INTESTIN

4.1.1.1. SEGMENTS DE L'INTESTIN

L'intestin humain se divise en deux grandes parties : l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle se subdivise lui-même en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon qui représentent respectivement 5%, 50% et 45% de la longueur totale de l'intestin grêle.

Le pH des différents segments de l'intestin varie entre des pH légèrement acides et des pH légèrement basiques (Tableau 6). Il existe une légère acidité au niveau de l'environnement proche des entérocytes. L'intestin grêle développe une surface très importante par rapport aux autres parties du tube digestif (Tableau 6) de par l'existence de structures spécifiques :

- les plis circulaires qui délimitent la lumière intestinale et qui augmentent la surface de contact de l'ordre de 3 fois.
- les villi, à peine visibles à l'œil nu et qui augmentent la surface de contact de l'ordre de 30 fois.
- les microvilli, projections de la membrane longs de 1 µm et qui augmentent la surface de contact de l'ordre de 600 fois.

Il est à noter que les plis circulaires et les villi sont absents du colon.

TABLEAU 6 : PRINCIPAUX PARAMETRES BIOLOGIQUES ET PHYSIQUES DU TRACTUS INTESTINAL HUMAIN [127].

Gastrointestinal segment	Approximate surface area	Approximate segment length	Approximate residence time	Approximate pH of segment	Prominent catabolic activities
Oral cavity	100 cm^2		Seconds to minutes	6.5	Polysaccharides
Esophagus	200 cm^2	23–25 cm	Seconds		
Stomach	3.5 m^2 (variable)	0.25 cm (variable)	1.5 h (variable)	1–2	Protease, lipases
Duodenum	1.9 m^2	0.35 m	0.5–0.75 h	4–5.5	Polysaccharides; oligosaccharides; proteases; peptidases; lipases; nucleases
Jejunum	184 m^2	2.8 m	1.5–2.0 h	5.5–7.0	Oligosaccharides; peptidases; lipases
Ileum	276 m^2	4.2 m	5–7 h	7.0–7.5	Oligosaccharides; peptidases; lipases; nucleases; nucleotidases
Colon and rectum	1.3 m^2	1.5 m	1–60 h (35 hours average)	7.0–7.5	Broad spectrum of bacterial enzymes

4.1.1.2. DIFFERENTS TYPES DE CELLULES EPITHELIALES

La muqueuse intestinale recouvre tout l'intestin. Elle est composée de 5 couches cellulaires (une séreuse, une musculeuse longitudinale et une musculeuse circulaire, une sous-muqueuse et une muqueuse). Dans les processus d'absorption, la couche muqueuse, en contact direct avec la lumière intestinale, joue un rôle essentiel. En effet, elle présente de nombreuses villosités développant une surface de contact importante. Ces villosités sont bien irriguées par des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Des cellules épithéliales de différentes natures constituent leur bordure. Quelque soit la zone intestinale considérée, on distingue ainsi systématiquement (Figure 32):

- des cellules responsables de l'absorption des nutriments et productrices d'enzymes digestives : les entérocytes. Elles constituent la majorité des cellules épithéliales (60 à 90%). Les microvillosités de ces cellules sont recouvertes par des filaments de glycoprotéines, des mucines principalement, [128] orientés vers la lumière intestinale formant le glycocalix, siège d'une intense activité enzymatique (amino-peptidases, phosphatases…).
- des cellules exocrines sécrétrices de mucus : les cellules caliciformes ou « goblet cells ». Elles représentent 10 à 40% du total des cellules épithéliales.
- des cellules endocrines sécrétrices d'hormones et d'enzymes : les cellules entéro-endocrines. Elles constituent 0,5% du total des cellules épithéliales totales.

La durée de vie de ces cellules est de 2 à 5 jours.

Il existe un 4ème type de cellule épithéliale intestinale appelée cellule de Paneth. Ces cellules sont absentes de l'épithélium colonique. Ce sont des cellules exocrines qui produisent des enzymes et protègent l'intestin contre les bactéries grâce à la production de défensines (antibiotiques peptidiques naturels). Ces cellules présentent une durée de vie plus longue (20 jours) [129].

Ces quatre types de cellules se retrouvent présents au niveau des cryptes de Lieberkühn. Les cellules caliciformes et les entérocytes migrent au sommet des villosités alors que les cellules de Paneth et les cellules endocrines sont situées dans les cryptes (Figure 32).

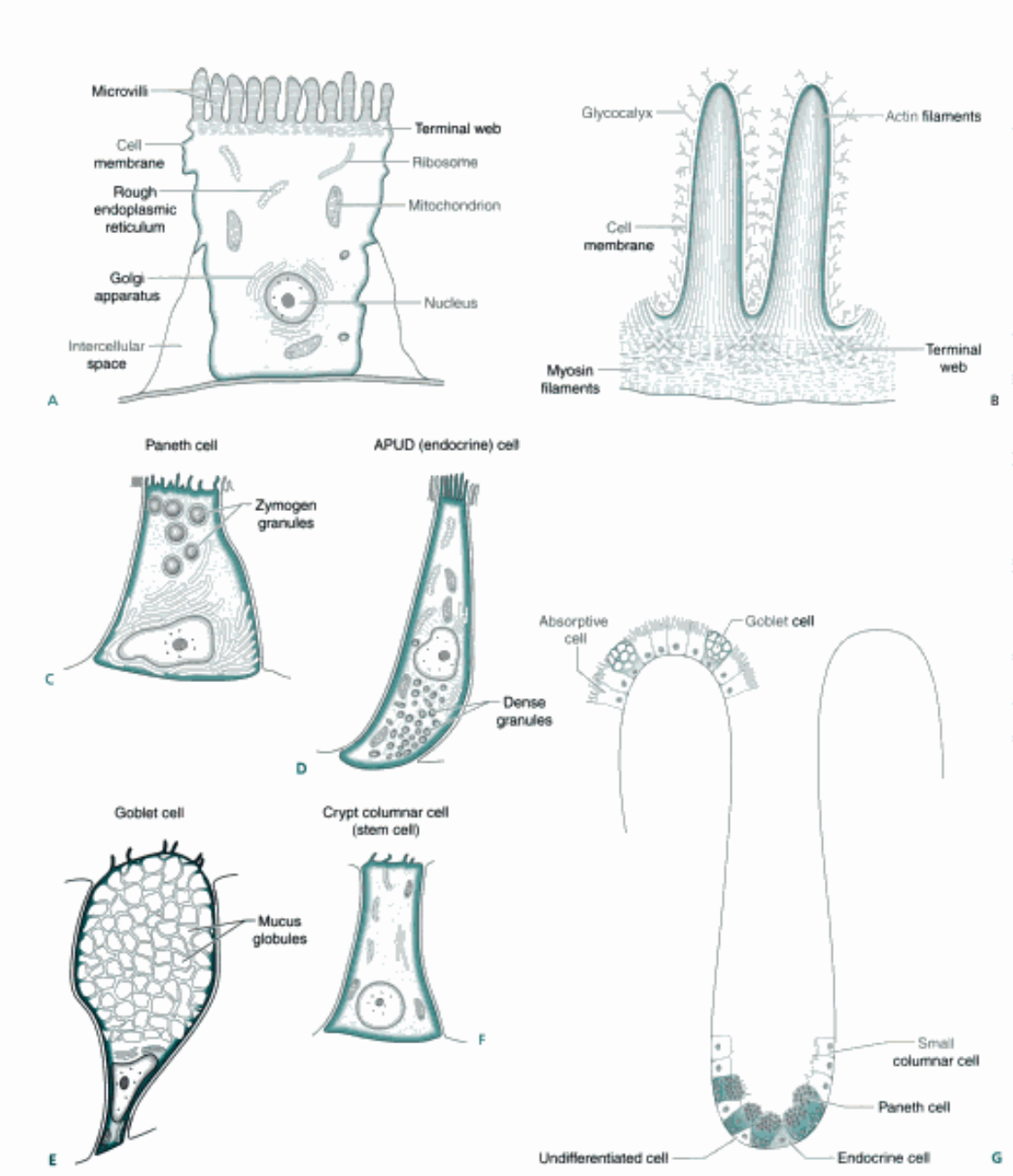


FIGURE 32 : DIFFERENTS TYPES DE CELLULES PRESENTS AU NIVEAU DE L'EPITHELIUM INTESTINAL [130].

(A) Entérocyte
(B) Structure d'une microvillosité
(C) Cellule de Paneth
(D) Cellule endocrine
(E) Cellule caliciforme
(F) Entérocyte non différencié
(G) Localisation des cellules au sein des cryptes et villosités

Enfin, il existe un autre type de cellules épithéliales, les cellules M [131], retrouvées uniquement au niveau de structures particulières appelées Plaques de Peyer.

Les plaques de Peyer se retrouvent le long de l'intestin grêle : il s'agit de structures arrondies, facilement observables à l'œil nu.

Ce sont les zones privilégiées de l'immunité intestinale. En effet, les plaques de Peyer font partie du tissu lymphoïde intestinal organisé qui est l'inducteur de la réponse immunitaire. Il existe également du tissu lymphoïde moins organisé (diffus) qui est l'effecteur de la réponse intestinale immunitaire (Figure 33).

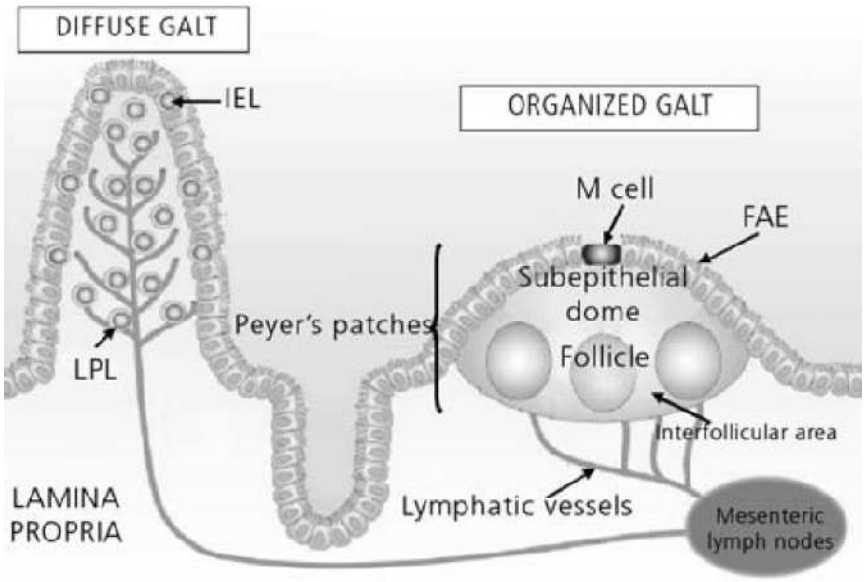


FIGURE 33 : SCHEMA DES ELEMENTS FORMANT LE TISSU LYMPHOÏDE INTESTINAL [132].

Le tissu lymphoïde intestinal (GALT) organisé est l'inducteur de la réponse immunitaire (plaques de Peyer et nœuds lymphatiques mésentériques) alors que le GALT diffus en est le site effecteur (lymphocytes intraépithéliaux (IELs) et lymphocytes de la lamina propria (LPLs).

Les plaques de Peyer sont séparées de la lumière intestinale par une couche de cellules appelée FAE (follicule-associated epithelium) contenant notamment des cellules M. Les cellules M jouent un rôle majeur dans la surveillance immunologique car elles permettent la capture et le transport des antigènes présents au niveau de la lumière intestinale. Leur

morphologie est adaptée à cette fonction : en effet, les cellules M sont des entérocytes ne présentant ni glycocalix ni microvillosités [132].

En dessous de l'épithélium contenant les cellules M, se trouve un dôme sous-épithélial contenant des cellules dendritiques et des macrophages. Des lymphocytes T sont trouvés au niveau des zones inter-folliculaires alors que les lymphocytes B sont présents au niveau des zones folliculaires (Figure 33).

Ainsi, de par l'existence des cellules M spécialisées dans le transport et la captation d'antigènes, les plaques de Peyer apparaissent comme un site potentiel stratégique pour la vectorisation de macromolécules. Cependant, les plaques de Peyer sont peu nombreuses au niveau intestinal et leur surface totale est faible [127], compromettant ainsi cette approche.

4.1.2. ROLE DE BARRIERE DE L'INTESTIN

Contrairement à la peau qui utilise la kératine comme barrière physique contre l'entrée des agents extérieurs, la muqueuse intestinale utilise, quant à elle, des mécanismes biochimiques et physiologiques en complément de sa barrière physique.

4.1.2.1. MUCUS

4.1.2.1.1. MUCUS : LA PREMIERE LIGNE DE PROTECTION

Le mucus constitue la première ligne de protection de l'intestin contre les agents pathogènes, les toxines ainsi que les particules se trouvant dans l'environnement. Le mucus permet également le transport du chyme de l'intestin grêle jusqu'au côlon de part ses propriétés lubrifiantes [133].

4.1.2.1.2. FIBRES DE MUCINES

Les fibres de mucines flexibles secrétées notamment par les cellules caliciformes sont le principal constituant du mucus. Il s'agit de glycoprotéines de grande taille (0,5-40 Mda) et de diamètre de 3 à 10 nm. Il en existe une grande variété mais il est possible des les classer en deux catégories [134, 135]:

- les « mucines solubles secrétées » d'une longueur de plusieurs microns. Ces mucines, de masse moléculaire élevée, forment des gels visqueux grâce à la formation de ponts disulfures intermoléculaires.

- les « mucines associées aux cellules », de longueur comprise entre 100 et 500 nm et composées d'un domaine transmembranaire. Elles diffèrent des mucines solubles par l'existence de domaines hydrophobes qui permettent un arrimage au niveau de la membrane plasmique des cellules de la paroi intestinale. Ces mucines forment le glycocalix, c'est-à-dire la dernière barrière qui protège la surface cellulaire.

Ces deux types de mucine sont retrouvés au niveau de la surface épithéliale.

D'un point de vue chimique, les mucines sont constituées par un squelette protéique flexible contenant une forte proportion de proline, thréonine et sérine. Sur ces acides aminés sont greffés par des liaisons O-glycosidiques (Figure 34 (C)) des oligosaccharides d'une longueur comprise entre 2 et 15 monosaccharides, pouvant présenter une structure branchée. Les 5 monosaccharides les plus fréquemment trouvés sont : la N-acétylgalactosamine, la N-acétylglucosamine, le galactose, le fructose et l'acide sialique. Le squelette des chaines oligosaccharidiques comprend un enchainement de Gal β(1-3) et de GlcNac β(1-4) qui se terminent par les résidus de sucres liés par liaison α-glycosidique [135]. Le greffage des sucres sur le squelette protéique est relativement dense : pour 100 acides aminés, on compte 25 à 30 chaines saccharidiques qui apportent une forte proportion de groupements sialiques et sulfates, conférant ainsi à la mucine une charge négative importante [133].

On trouve au niveau du monomère de mucine une alternance entre des zones protéiques glycosylées et des zones protéiques non glycosylées globulaires, de nature hydrophobe (Figure 34 (C)).

Les monomères s'associent les uns aux autres au niveau de leurs extrémités (Figure 34 (A)). L'association de trois monomères attachés par leur extrémité N-terminale permet l'établissement d'un réseau branché (Figure 34 (A)).

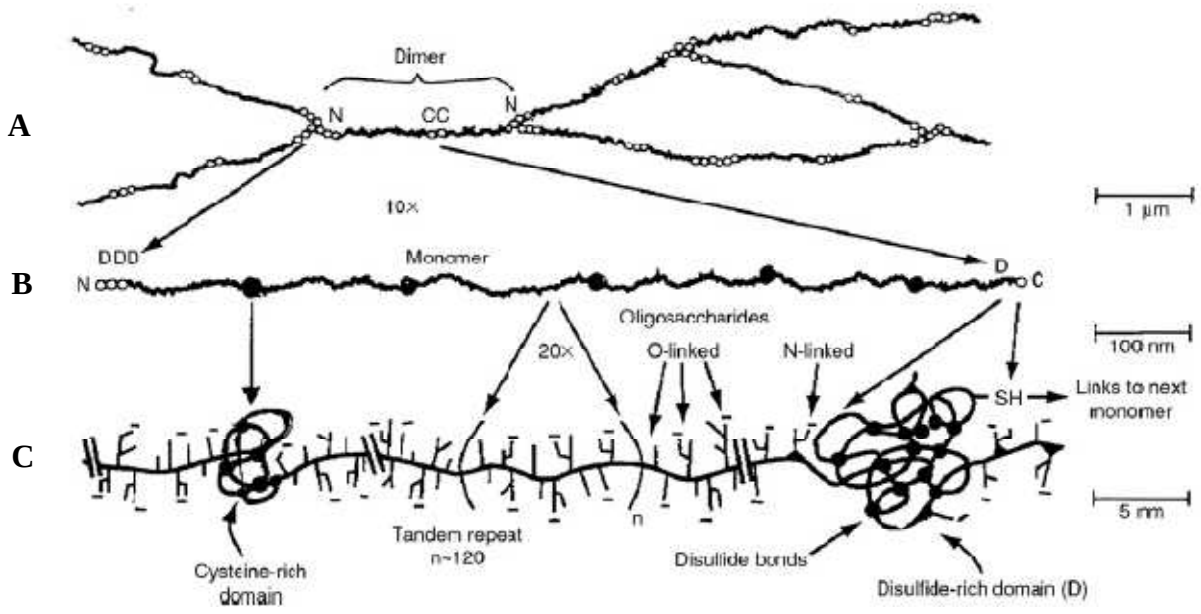


FIGURE 34 : STRUCTURE SCHEMATIQUE BIOCHIMIQUE DE LA MUCINE SECRETEE [136].

(A) Les monomères de mucines s'associent les uns avec les autres de par leur extrémités au moyen de ponts disulfures. Les extrémités C-terminales s'associent entre elles, tout comme les extrémités N-terminales. Trois extrémités N-terminales peuvent s'associer afin de former un trimère ce qui a pour conséquence l'établissement d'un réseau branché.

(B) Détail d'un monomère avec les zones protéiques nues (globulaires) et les zones glycosylées.

(C) Les chaines de mucines présentent des domaines fortement glycosylés séparés par des domaines nus, non glycosylés. Ces domaines nus sont très riches en cystéine et forment des zones globulaires de nature hydrophobe stabilisés par des ponts disulfures.

4.1.2.1.3. PROPRIETES DU MUCUS

En tant que gel, le mucus se compose principalement d'eau (plus de 90%). Il contient également des glycoprotéines (dont la mucine), des lipides (0,5 à 5%), des sels minéraux (0,5 à 1%) et des protéines libres (1%) [135].

D'un point de vue rhéologique, le mucus possède des propriétés viscoélastiques [133]. Cependant, vu l'hétérogénéité de sa composition, toute variation est susceptible de modifier le comportement rhéologique du gel de mucine.

Le mucus intestinal est d'une épaisseur comprise entre 15 et 450 µm [136, 137]. Cette épaisseur varie suivant les régions de l'intestin et également suivant l'activité digestive.

Le mucus intestinal est en permanence sécrété et recyclé, son temps de vie est donc relativement court. Le turn-over semble compris entre quelques heures [138] à un ou deux jours [135].

Afin d'être en mesure de réaliser un système mucoadhésif performant, il est nécessaire de connaitre les paramètres responsables de la mucoadhésion et de la diffusion des particules (ou si les particules ne peuvent pas diffuser, des molécules) au sein du mucus ainsi que les phénomènes régissant l'élimination de ces particules/molécules.

4.1.2.1.4. MECANISME DE TRANSPORT DE PARTICULES ET DES MOLECULES AU SEIN DU MUCUS

Le mucus permet de piéger et donc de retenir de nombreuses particules et agents pathogènes qui ne peuvent alors pas diffuser au sein de sa structure, protégeant ainsi la surface cellulaire. Ainsi il est primordial de connaitre les paramètres clefs contrôlant la diffusion d'une molécule ou d'une particule au sein du mucus. Ces paramètres sont les suivants :

- la taille des mailles formées par le réseau de fibrine.
- la taille des particules/molécules.
- l'existence d'interactions entre le mucus et la substance active (ou la particule).

La taille des pores présents au sein du mucus est comprise environ entre 100 nm et 1 000 nm. Une évaluation précise est difficile : en effet, le mucus est une structure dynamique [136]. De plus, l'évaluation de cette distance est fortement dépendante de la méthode utilisée.

Des expériences utilisant des particules de différentes tailles [139] ont démontré qu'il n'existait pas de corrélation directe entre taille des molécules/particules et diffusion au sein du gel, mettant ainsi en avant l'importance dans le processus d'immobilisation des interactions mucus/particules ou mucus/substance active. En effet, lors de leur arrivée au niveau du tractus gastro-intestinal, les particules sont piégées par la formation d'interactions adhésives polyvalentes qui peuvent être soit :

- des interactions faibles avec les zones hydrophobes des chaines flexibles de mucine.
- des interactions électrostatiques avec les charges négatives de la mucine.

La présence des domaines hydrophobes permet d'expliquer que certaines molécules diffusent plus lentement que des molécules de taille similaire ou supérieure et que des molécules

hydrophobes diffusent moins vite dans le mucus que dans l'eau [134]. Ainsi la diffusion est réduite quand le coefficient de partage octanol/eau de la molécule concernée augmente, signe de la possibilité d'interactions hydrophobes entre la molécule et la mucine.

Ainsi de nombreux auteurs ont montré une diminution de la diffusion de molécules de différentes tailles, probablement due à l'existence de ces interactions hydrophobes (amines tertiaires, albumine bovine, lysozyme et autres).

Ainsi en résumé, on observe dans le cas de [136] :

- petites molécules au coefficient de partage octanol/eau élevé : une diffusion dans le mucus inférieure à celle dans l'eau. Cette diffusion diminue proportionnellement à celle du coefficient de partage. Cependant, une diffusion lente est souvent possible car les interactions qui s'établissent sont monovalentes.
- petites molécules cationiques / cations polyvalents : l'existence de liaisons fortes et polyvalentes avec les charges négatives du mucus. Ainsi, des nanoparticules de chitosane se lient fortement avec le mucus.

4.1.2.2. BARRIERE PHYSIQUE : JONCTIONS ENTRE LES CELLULES

L'épithélium intestinal est polarisé : il présente un pôle apical et un pôle basolatéral. La barrière intestinale permet le maintien de cette polarité principalement grâce à l'établissement de nombreuses jonctions entre les cellules, empêchant ainsi la diffusion des solutés et microorganismes (Figure 35 (C)). Ces jonctions serrées sont de trois types différents (Figure 35 (A)) :

- les jonctions serrées.
- les jonctions adhérentes.
- les desmosomes ou jonctions d'ancrage.

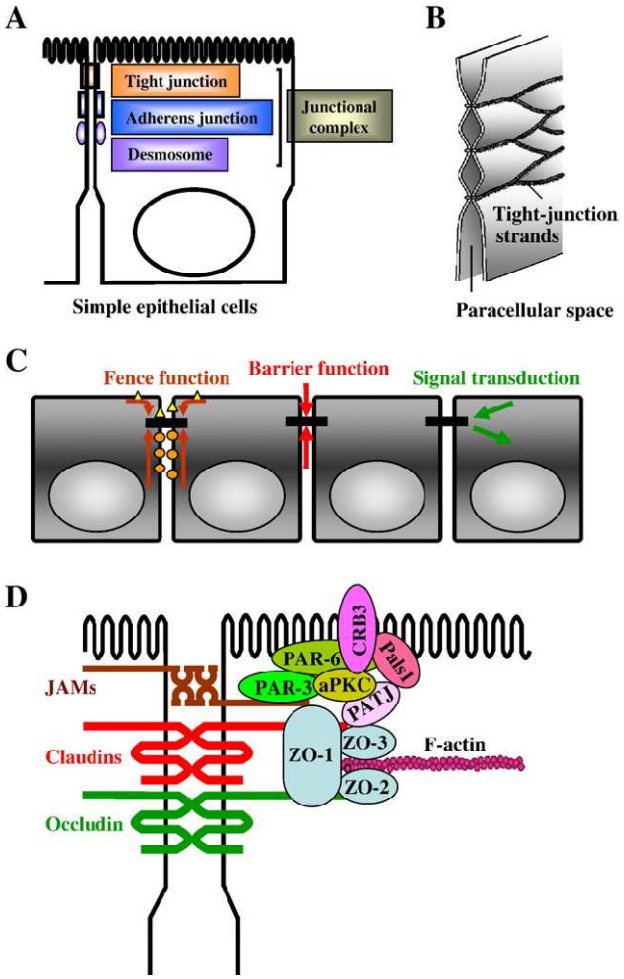


FIGURE 35 : COMPLEXE JONCTIONNEL APICAL ET JONCTIONS SEREES [140].

(A) Représentation schématique du complexe jonctionnel apical.

(B) Représentation schématique des cordons de jonctions serrées.

(C) Fonctions des jonctions serrées.

(D) Composants moléculaires des jonctions serrées. Trois familles de protéines transmembranaires sont présentées (occludines, claudines et molécules d'adhésion des jonctions (JAMs sur le schéma) ainsi que les protéines de la plaque cytoplasmique et les filaments d'actine du cytosquelette.

Les jonctions serrées sont situées à la frontière entre le pôle apical et la face latérale de la cellule (Figure 35 (A)). Elles permettent ainsi de limiter fortement le passage paracellulaire (Figure 35(B et C)). Les jonctions adhérentes et les desmosomes sont situés plus vers le pôle basal (Figure 35 (A)).

4.1.2.2.1. JONCTIONS SERREES

Les jonctions serrées sont des complexes multiprotéiques composés par des protéines transmembranaires associées à des protéines de la plaque cytoplasmique [141]. Elles participent aux contacts cellule/cellule existant entre les cellules épithéliales adjacentes (Figure 35 (C)).

4.1.2.2.1.1. PROTEINES TRANSMEMBRANAIRES

On distingue trois types de protéines transmembranaires différentes (Figure 35 (D))[142] :

- les claudines.
- les occludines.
- les molécules d'adhésion des jonctions.

Les claudines sont constituées de 4 domaines transmembranaires, de deux boucles extracellulaires ainsi que d'un domaine C-terminal cytoplasmique et d'un petit domaine N-terminal également cytoplasmique (Figure 35 (D)). Elles servent de point d'appui (ancrage) pour les jonctions serrées. La partie C-terminale est nécessaire à la stabilité des jonctions serrées. Elle contient également un motif spécifique permettant la liaison à certaines protéines cytoplasmiques, telles que les zonula occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) [140].

Les claudines exercent un rôle primordial dans la sélection des ions pouvant traverser les jonctions serrées. En effet, leur première boucle extracellulaire est responsable de la création de pores paracellulaires permettant de laisser passer les ions entre deux cellules voisines. Ainsi, la claudine-2 constitue des pores laissant passer les cations alors que la claudine-16 ne laisse passer que les ions Mg^{2+} [141].

L'occludine possède deux boucles extracellulaires ainsi qu'une petite boucle intracellulaire (Figure 35 (D)). Ses deux extrémités (N- et C-terminales) sont intra-cytoplasmiques. Le résidu C-terminal intra-cytoplasmique est long et il est fréquemment phosphorylé par différentes protéines kinases. Cette partie est liée avec la zonula occludens 1 (ZO-1) qui est elle-même en interaction avec le cytosquelette. Enfin cette partie, riche en résidus serine, thréonine, et tyrosine, peut être phosphorylée par différentes protéines kinases. Ainsi, les occludines semblent être impliquées dans la transmission de signaux cellulaires. Cependant, leur rôle précis reste encore non entièrement élucidé.

La molécule d'adhésion des jonctions est une protéine transmembranaire glycosylée appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Elle est constituée de 2 domaines Ig-like extracellulaires, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal cytoplasmique. La présence d'un motif de liaison à la séquence « PDZ » permet la liaison directe avec des protéines de la plaque cytoplasmique telles que ZO-1 et PAR-3.

4.1.2.2.1.2. PROTEINES DE LA PLAQUE CYTOPLASMIQUE

Les protéines de la plaque cytoplasmique sont impliquées dans la mise en place des jonctions serrées. Elles sont très nombreuses et on les classe en deux groupes en fonction de la présence ou non d'une séquence spécifique protéique, qui permet l'interaction avec d'autres protéines qui le contiennent mais aussi l'ancrage des protéines membranaires aux protéines cytoplasmiques). Ainsi on distingue les protéines :

- contenant la séquence « PDZ » (protéines ZO, MAGI, AF-6/afadine, MUPP1).
- ne contenant pas la séquence « PDZ » (cinguline, JACOP/paracinguline, angiomotines, protéines régulatrices des GTPases et symplexines) [143].

Les plus connues sont les ZO qui se trouvent au centre du réseau protéique de jonction des protéines membranaires du cytosquelette. Nous décrirons ici uniquement celles-ci.

Les zonula occludens sont des protéines de la famille MAGUK (membrane-associated guanylate kinase). Les ZO-1, ZO-2 et ZO-3 possèdent une organisation structurale similaire : à leur extrémité N-terminale on distingue la présence de trois domaines « PDZ », suivis d'un domaine SH-3 et d'un domaine GUK. Leur partie C-terminale contient un domaine acide.

La présence de ces domaines permet à la fois l'interaction de protéines les unes avec les autres et également l'amarrage des protéines membranaires (occludine, claudines et JAMs) au cytosquelette d'actine (Figure 35 (D)). Ces protéines sont également impliquées dans la transmission de signaux cellulaires ainsi que dans la régulation de gènes transcriptionnels [141].

Les jonctions serrées sont étroitement associées à d'autres systèmes impliqués dans le système de contact cellule/cellule tels que les jonctions adhérentes.

4.1.2.2.2. JONCTIONS ADHERENTES

Les jonctions adhérentes sont situées entre les jonctions serrées et les desmosomes (Figure 35 (A)). La fonction principale des jonctions adhérentes est la connexion des cellules afin de réguler la formation des tissus lors de la morphogénèse chez l'organisme en développement. Elles jouent également un rôle important dans le maintien des tissus chez l'organisme adulte. Les jonctions adhérentes permettent ainsi un rapprochement étroit mais non serré des cellules adjacentes.

La principale molécule d'adhésion constituant les jonctions adhérentes est la cadhérine qui permet de connecter deux cellules adjacentes au moyen d'interactions homophiliques [144]. Ces interactions sont Ca^{2+} dépendantes. La cadhérine possède une extrémité intra-cytoplasmique au niveau de laquelle s'associent des caténines. Le complexe cadhérine-caténine est relié au cytosquelette, cependant, le pont physique qui permet cette liaison n'est pas encore connu à l'heure actuelle.

4.1.2.2.3. DESMOSOMES

Les desmosomes se composent de deux plaques denses d'un point de vue électronique, présente dans chacune des cellules.

Les desmosomes contiennent des protéines issues de trois familles différentes, on distingue ainsi :

- la desmoplaquine qui joue le rôle de lien entre les filaments du cytosquelette et les plaques desmosomales.
- les cadhérines (desmogléine et desmocolline) qui traversent la membrane cellulaire ; leur partie C-terminale est localisée au niveau de la plaque alors que leur partie N-terminale s'associe dans l'espace intercellulaire avec les cadhérines de la cellule voisine (Figure 36) [145].
- des protéines de la famille des armadillo (plakoglobine et plakophiline) qui interviennent dans les interactions existantes au niveau de la plaque électroniquement dense. En effet, elles interagissent avec les résidus cytoplasmiques des cadhérines et également avec la desmoplaquine.

Les protéines citées précédemment sont des constituants retrouvés systématiquement au niveau des desmosomes. Il existe de plus un nombre important de protéines accessoires impliquées dans des fonctions d'adhésion où non (corneodesmosine, protéine Perp, protéine dite « armadillo »,…)

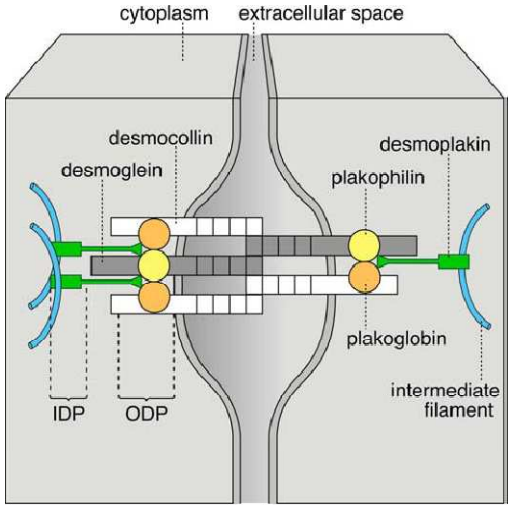


FIGURE 36 : MODELE MOLECULAIRE DES DESMOSOMES [146].

4.1.2.3. BARRIERE BIOCHIMIQUE : ENZYMES ET POMPES D'EFFLUX

En plus d'une dégradation par les fluides intestinaux et les bactéries de la microflore, les substances actives sont également dégradées par toute une série d'enzymes présentes au niveau de l'intestin.

4.1.2.3.1. ENZYMES DE PHASE I : CYTOCHROMES P450

On trouve des cytochromes P450 (CYP) au niveau de l'intestin, principalement ceux de la sous-famille CYP3A, exprimés en quantités très importantes au niveau des villosités des entérocytes [147] : ainsi cette sous-famille constitue près de 70% des cytochromes présents au niveau des entérocytes humain.

Le type CYP3A4 est celui qui est retrouvé de façon la plus commune au niveau de l'intestin grêle. Il est inductible et métabolise un grand nombre de substrats par des réactions d'hydroxylation et de N-déalkylation [148]. Il faut noter que ce cytochrome n'est pas exprimé par les cellules de côlon.

Les cellules intestinales expriment également un autre cytochrome de la même famille mais en quantités beaucoup moins importantes, le CYP3A5. Ce cytochrome est non inductible et ne catalyse pas les mêmes réactions que le CYP3A4 [148]. D'autres enzymes d'intérêt de familles différentes sont également retrouvées en quantités inférieures telles que : le CYP1A, les monoamines oxydases.

4.1.2.3.2. ENZYMES DE PHASE II

On trouve également au niveau de l'intestin une grande variété d'enzymes de phase II telles que des acétyltransférases, des gluthation S-transférases, des méthyltransférases, des sulfotransférases et des UDP-glucuronyltransférases [147].

4.1.2.3.3. POMPES D'EFFLUX

Ce sont des systèmes de détoxification qui permettent de rejeter des composés nocifs à l'extérieur des cellules par un mécanisme d'efflux, ATP-dépendant. Ainsi, les anticancéreux sont très souvent des substrats de ces pompes d'efflux.

La plus connue est la P-glycoprotéine (P-gp) qui est issue des gènes MDR (Multi-Drug–Resistance), il existe également la protéine 2 associée à la résistance multiple aux médicaments (MRP2, MultiDrug Resistance-associated protein 2) et les protéines de résistance au cancer du sein (BCRP et ABCG2). Tous ces systèmes sont présents au niveau du pôle apical des cellules épithéliales intestinales (Figure 37) [149].

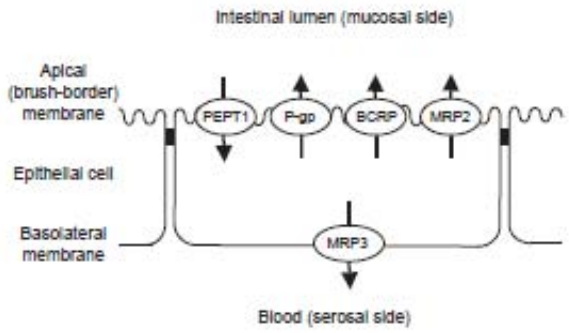


FIGURE 37 : LOCALISATION DES POMPES D'EFFLUX ET DU RECEPTEUR PEPT1 AU NIVEAU DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES [149].

La P-gp s'exprime aussi bien au niveau des tissus cancéreux que dans les tissus normaux [148]. Elle possède de nombreux substrats, en général des composés hydrophobes neutres ou chargés positivement [150]. Il est important de signaler que l'héparine non fractionnée constitue un excellent inhibiteur de la P-gp [151].

Pour ce qui est de la MRP2, elle transporte des composés plutôt hydrophiles (gluthation, glucuronides, et des conjugués sulfates de composés exogènes et endogènes) alors que la BCRP reconnait des anticancéreux plutôt hydrophiles [150].

Ces mécanismes d'efflux peuvent jouer un rôle considérable sur la biodisponibilité de certaines substances actives administrées par voie orale. Seules des substances actives ayant pénétré au niveau des cellules et donc présentes dans le cytoplasme peuvent subir un efflux.
Cependant, si on considère une substance active encapsulée dans un vecteur et administrée par voie orale, il important de définir dans un premier temps qui, du vecteur ou de la substance active, est à même de franchir la barrière intestinale. Cela permet dans un second temps de déterminer quelle est la localisation tissulaire et cellulaire préférentielle de ce passage.
Nous allons donc voir maintenant quels sont les critères de taille qui font qu'un vecteur passe ou non la paroi intestinale.

4.1.3. DIFFERENTES VOIES DE PASSAGE POSSIBLE

Etant donné que nos expériences se sont par la suite focalisées uniquement sur des microparticules de polymères, la bibliographie se limitera donc aux études ayant mis en évidence (ou non) le passage de ce type de particules au niveau intestinal.

4.1.3.1. PASSAGE DE MICROPARTICULES AU NIVEAU INTESTINAL

Les études de passage ont permis de définir 3 sites principaux de capture des particules au niveau intestinal, en fonction de la taille des particules utilisées. Ainsi, pour des particules de taille [152] :

- comprise entre 5 et 150 µm, un passage existe au niveau des extrémités des villosités par un mécanisme appelé persorption.
- inférieure à 10 µm, un passage au niveau de l'épithélium des plaques de Peyer peut avoir lieu.
- d'environ 1µm, la capture peut avoir lieu au niveau des macrophages intestinaux, par phagocytose.

En ce qui concerne les très grosses particules (entre 5 et 150 µm) telles que des pollens, des grains d'amidon ou des spores, le phénomène dit de « persorption » a été observée chez de nombreuses espèces dont l'homme [153, 154], au niveau des extrémités des villosités. Il semble s'agir d'un passage intervenant au niveau des cellules épithéliales des villosités en phase d'apoptose avancée [155]. Cependant, ce phénomène passif, qui n'intervient qu'à une fréquence très faible, ne peut pas être exploité pour la délivrance des substances actives [152].

En ce qui concerne le passage de microparticules plus petites, de taille inférieure à 10 µM, des études de capture ont été menées en utilisant différents modèles *in vivo* [156], *ex vivo* [157] ou *in vitro* [158, 159]. Ces méthodes utilisent principalement la microscopie (par fluorescence [159], confocale [159, 160]) afin de dénombrer les particules ayant été incorporées au sein d'un épithélium de cellules ou d'évaluer la distribution des particules dans des tissus intestinaux.

Un récapitulatif des principaux résultats est présenté dans le Tableau 7.

TABLEAU 7 : SYNTHESE DES ETUDES AYANT EVALUE LE PASSAGE INTESTINAL DE MICROPARTICULES.

Références	Type de particules	Taille	Modèle	Quantités absorbée
[161]	MPs de latex	2 µm	Souris normale Souris immunodéficiente (sans PP)	0,27 % 0,21% Passage par les villosités et pas par les PP.
[159]	MPs de PLGA	1 µm 2µm	Caco-2	% d'interaction 0,4 ± 0,2 (4h) 0,2 ± 0,1 (4h)
	MPs de PS	1 µm 2µm	Caco-2	% d'interaction 7 ± 0 (4h) 1 ± 0 (4h)
[158]	MPs de PS-latex	2 µm	Caco-2 Souris/Rat/Cochon d'inde (boucles intestinales) [156]	80 particules / 1000 cellules (90 min.) 16 particules / 1000 cellules (90 min)
[156]	MPs de latex	2 µm	Souris/Rat/Cochon d'inde (boucles intestinales)	0,12 à 0,32%
[160]	MPs de PLA	2 µm à 30 µm	Caco-2 Lapin/Rat (boucles intestinales)	≈ 10 % des particules adsorbées à la surface des cellules, quelque soit le modèle Faible absorption des particules taille-dépendante et aucune absorption si taille > 4 µm.
[157]	MPs de PLGA	1 µm	Rat (boucles intestinales)	Duodénum et iléon PP : 1 à 8% (2h) Duodénum et iléon NP : 0,01% (2h)
		10 µm	Rat (boucles intestinales)	Duodénum et iléon PP : < 1,5 % (2h) Duodénum et iléon NP : < 0,5% (2h)
[162]	MPs de PLGA	1 µm 10 µm	Caco-2	15% (2h) 6% (2h)

MPs : microparticules
PS : polystyrène
PP : plaques de Peyer
NP : non plaques de Peyer

Ce tableau démontre que le passage de microparticules d'une taille importante (>10 µm) au niveau de l'intestin reste très marginal et qu'il ne permet pas d'expliquer la présence d'une quantité importante de substance active dans le sang suite à une administration par voie orale d'un tel vecteur. Ainsi, c'est donc la molécule au sein d'un système particulaire de taille

importante (> à 10 µm) qui va passer la barrière intestinale. Dans la section suivante sont décrites les différentes voies de passage qu'une molécule peut emprunter afin de franchir l'épithélium intestinal.

4.1.3.2. VOIES DE PASSAGE DES MOLECULES LIBRES

Le passage de substances actives à travers la membrane intestinale peut se faire suivant 2 voies principales : la voie paracellulaire qui correspond au passage de la molécule entre deux cellules et la voie transcellulaire qui correspond au passage de la molécule par traversée des cellules endothéliales (Figure 38). Le passage transcellulaire se décline en plusieurs types : le transport transcellulaire passif, le transport transcellulaire mettant en jeu un transporteur (actif ou facilité) et la transcytose. En revanche dans le cas d'un passage paracellulaire, un seul mécanisme passif existe.

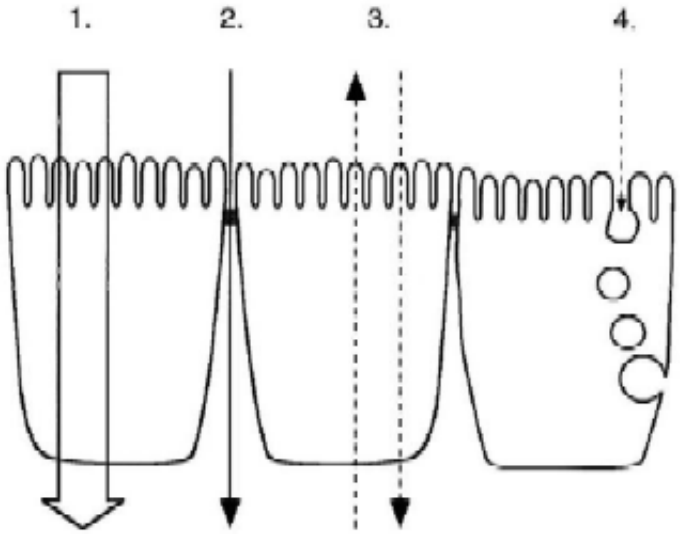


FIGURE 38 : SCHEMA DES DIFFERENTES VOIES DE PASSAGE POSSIBLE DES SUBSTANCES ACTIVES A TRAVERS L'EPITHELIUM INTESTINAL [163].

1. transport transcellulaire passif.
2. transport paracellulaire passif.
3. transport transcellulaire actif médié par un transporteur.
4. transport par transcytose.

En fonction de leurs caractéristiques physicochimiques, les molécules peuvent passer par une des voies mentionnées ci-dessus. Ainsi, Lipinski a listé des paramètres physico-chimiques critiques [164] qui permettent de définir si une molécule va être peu absorbée. Ces

paramètres, qui s'appliquent uniquement aux molécules n'étant pas des substrats de transporteurs biologiques, sont : une masse moléculaire supérieure à 500 Da, une valeur de logP supérieure à 5, la présence de plus de 5 H donneurs de liaisons, et la présence de plus de 10 H accepteurs de liaisons.

4.1.3.2.1. TRANSCELLULAIRE PASSIF

Les substances actives diffusent au sein de la membrane apicale puis traversent l'intérieur de la cellule et passent enfin la membrane basolatérale (Figure 38 (1.)). La voie transcellulaire est empruntée par des petites molécules, peu chargées [165] qui ont à la fois une bonne affinité avec la membrane plasmique lipophile et le cytoplasme aqueux de la cellule. Ainsi, un certain nombre de substances lipidiques traverse l'épithélium intestinal selon cette voie. Le passage s'effectue selon la première loi de Fick et dépend donc du gradient de concentration de la substance active à travers la membrane cytoplasmique.

4.1.3.2.2. TRANSCELLULAIRE MEDIE PAR UN TRANSPORTEUR

La substance est reconnue par un transporteur présent au niveau de la membrane intestinale (Figure 38 (3.)). Le passage peut être actif, nécessitant alors de l'énergie, ou facilité. L'existence d'un transport de substance active par transporteur selon le mode facilité reste incertain. En revanche, on sait que les substances actives empruntant un transporteur actif sont principalement celles dont la structure chimique présente des similitudes avec celles de nutriments, substrats réels du transporteur.

Ces voies de passage sont saturables et très souvent, le transport des molécules les utilisant est réalisé en parallèle par transport passif. Ainsi, la contribution du passage par voie passive augmente avec la dose [163].

4.1.3.2.3. TRANSCYTOSE

La transcytose étant une voie de passage de faible capacité pour le transport de substance active, elle ne semble pas très intéressante dans le cadre du passage de médicaments. En effet, elle est considérée comme une voie pouvant favoriser le passage de macromolécules non absorbées par ailleurs, de par leur taille trop importante. Cependant un des inconvénients de cette voie de passage est le fait que les vésicules formées contiennent une quantité importante d'enzymes protéolytiques. Le contenu de ces vésicules peut soit être acheminé jusqu'au pôle

basolatéral de la cellule, soit être digéré à l'intérieur même de la cellule [165]. Cependant, étant donné l'existence de récepteurs spécifiques au niveau de la membrane, le couplage de substances actives avec des ligands (lectines, transferrines) semble une option prometteuse afin de permettre l'internalisation de substance active dans des vésicules qui vont rester intactes et qui vont ensuite fusionner avec la membrane basolatérale.

4.1.3.2.4. TRANSPORT PARACELLULAIRE PASSIF

Les substances actives traversent l'épithélium en passant entre deux cellules adjacentes (Figure 38 (2.)). Cependant, l'espace existant entre les pores présents au niveau paracellulaire est relativement faible, compris entre 10 Å et 30 à 50 Å [166]. Ainsi, le passage par voie paracellulaire est restreint à des molécules de petite taille (c'est à dire de masse moléculaire inférieure à 300 Da) et hydrophiles. En effet, leur hydrophilie empêche leur passage par voie transcellulaire passive, car elles ne peuvent se répartir dans la membrane plasmique lipophile.

4.2. MODELES D'ETUDE DU PASSAGE DES XENOBIOTIQUES AU NIVEAU INTESTINAL

4.2.1. BIODISPONIBILITE, FRACTION DE DOSE ABSORBEE ET PERMEABILITE

La biodisponibilité (F) est le paramètre pharmacocinétique le plus utilisé afin de quantifier la fraction de dose de substance active qui arrive au niveau sanguin sous forme inchangée. Elle dépend principalement de trois processus relativement complexes :

- l'absorption intestinale d'une certaine fraction de la dose administrée (Fa)
- l'effet de premier passage intestinal (PPi)
- l'effet de premier passage hépatique (PPh)

$$F = Fa \times (1 - PPi) \times (1 - PPh)$$

De nombreux facteurs influent sur la fraction de dose absorbée et le premier passage intestinal des substances actives tels que notamment i) des facteurs galéniques (choix des excipients et méthode de fabrication) ii) les paramètres physicochimiques de la substance active elle-même (solubilité, formes cristallines) iii) des paramètres physiologiques, biochimiques et pathophysiologiques de l'intestin.

La fraction de dose absorbée au niveau intestinal dépend principalement :

- de la concentration en substance active dissoute et donc de la solubilité de la substance active.
- de la perméabilité de la substance active vis-à-vis de la barrière intestinale.

Si l'évaluation de la solubilité d'une substance active et de la dissolution de la forme pharmaceutique la contenant sont des données accessibles de façon relativement simple (expériences de dissolution *in vitro*), en revanche, l'évaluation de la perméabilité intestinale nécessite des modèles plus complexes. Ainsi, un certain nombre de méthodes expérimentales aussi bien *in vivo*, *ex vivo* que *in vitro* ont été développées afin de déterminer la valeur de la perméabilité des substances actives à travers l'épithélium intestinal. Nous allons maintenant décrire ces différents modèles ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients.

4.2.2. DESCRIPTION DES MODELES

4.2.2.1. MODELES UTILISANT DES TISSUS ANIMAUX

Etant donné que l'obtention de tissu humain est problématique, des modèles animaux utilisant des boucles intestinales ou à base de tissus excisés ont été utilisés relativement tôt. Ces modèles présentent l'avantage d'évaluer la perméabilité de la substance active à travers le tissu entier. Ils permettent également, lorsque les études sont menées sur différents segments intestinaux, de localiser au niveau de quel segment il existe une absorption préférentielle de la substance active.

4.2.2.1.1. BOUCLES INTESTINALES

Les boucles intestinales peuvent être considérées comme des perfusions intestinales simplifiées.

Elles ont lieu sur un animal entier vivant anesthésié. Une incision de l'abdomen est réalisée de façon à accéder à l'intestin. Après une localisation du segment à étudier, une boucle intestinale est réalisée par ligature des deux extrémités. Au préalable, deux petites incisions peuvent être réalisées en amont et en aval du segment d'intérêt afin d'en nettoyer le contenu au moyen d'une solution saline [167, 168]. La solution de substance active à étudier est alors injectée du côté proximal de la boucle. La boucle est ensuite replacée dans l'abdomen de l'animal. Des prélèvements sanguins peuvent avoir lieu à différents temps et en fin

d’expérience, le contenu de la boucle est récupéré et analysé : cela donne accès à la quantité de substance active qui a disparu.

Cette méthode présente l’avantage d’être simple et de ne pas nécessiter d’équipement spécialisé. Elle permet de tester le passage de la substance active sur les différentes portions intestinales du même animal, évitant ainsi les variations interindividuelles. De plus, le flux sanguin est maintenu intact.

Cependant il s’agit d’une méthode très coûteuse en animaux. De plus, les résultats peuvent être biaisés du fait de l’anesthésie des animaux mais également par les mauvaises conditions d’agitation intestinale.

4.2.2.1.2. PERFUSION INTESTINALE

Dans cette méthode, les animaux sont anesthésiés et une incision de l’abdomen est réalisée afin d’accéder à l’intestin. Une fois le segment à étudier localisé, il est canulé à ses deux extrémités (distantes d’une longueur de 10 à 30 cm) et perfusé au moyen d’une solution tamponnée.

Les boucles intestinales peuvent être fermées ou ouvertes. Dans le cas des boucles fermées (méthode Doluisio, [169]), la solution à étudier est placée au niveau proximal de la boucle et des échantillons luminaux sont prélevés à différents intervalles de temps : il est ainsi possible de calculer la diminution de la concentration en substance active dans le segment intestinal au cours du temps. Pendant l’expérience, la boucle est replacée à l’intérieur de l’animal.

Dans le cas des boucles intestinales ouvertes (méthode d’Higuchi), un flux continu est maintenu au niveau de la lumière de l’intestin. Dans ce cas, la perméabilité est évaluée par la différence de concentration entre la solution en entrée de boucle et en sortie de boucle, à l’équilibre. Pendant l’expérience, la boucle est généralement laissée à l’extérieur de l’animal.

En plus des prélèvements de la solution de substance active n’ayant pas été absorbée au niveau intestinal, il existe la possibilité de procéder à des prélèvements sanguins à différents niveaux du système sanguin. Ainsi, si les prélèvements de solution donnent uniquement accès à la fraction de dose absorbée au niveau des entérocytes, les prélèvements sanguins permettent de quantifier la vitesse d’apparition de la substance active au niveau du sang, mais aussi, dans certains systèmes, d’évaluer la clairance hépatique.

Avec ces techniques de perfusion intestinale, le flux sanguin étant maintenu, les tissus sont correctement oxygénés. Des informations relativement précises peuvent être obtenues, mais la technique nécessite à la fois beaucoup d'animaux et elle est complexe à mettre en place.

4.2.2.1.3. SAC EVERSE

Cette méthode se base sur le prélèvement d'une portion d'intestin contenant la zone d'intérêt à étudier. Le tissu est d'abord lavé puis est délicatement retourné de façon à ce que l'intérieur de l'intestin se retrouve à l'extérieur (Figure 39(A)).

Une fois éversé, l'intestin peut être utilisé de façon relativement simple : un sac est formé en scellant une des extrémités au moyen d'une attache. On place alors dans ce sac un milieu tamponné oxygéné puis on ferme l'autre extrémité. Le sac est alors mis dans un bol de dissolution, contenant à la fois un milieu adapté prolongeant la survie du tissu et la substance active à étudier, sous agitation douce [170]. Une fois l'étude terminée on récupère le contenu du sac et on dose la quantité de substance active qu'il contient.

Des systèmes plus sophistiqués peuvent être utilisés (Figure 39 (B)) permettant une oxygénation optimale du tissu et facilitant les prélèvements [171].

Ce système contrairement aux chambres de Ussing et à la culture cellulaire, ne nécessite pas de matériel spécialisé. Un grand nombre de substances actives peuvent être testées simultanément, notamment les substances actives peu perméables : en effet, le volume d'échantillon récupéré à l'intérieur du sac étant relativement petit, les substances actives s'y concentrent donc plutôt rapidement [170]. En plus de la perméabilité, il est possible d'étudier les mécanismes d'absorption (utilisation d'inhibiteurs de transporteurs).

Cependant, chaque nouvelle expérience nécessitant une portion d'intestin frais, ces expériences sont coûteuses en animal. De plus, la viabilité du tissu est relativement réduite dans le temps car il n'est plus alimenté par le sang et il est non innervé. Enfin, l'étape d'éversion de l'intestin est critique car elle peut induire des lésions morphologiques faussant ainsi les résultats [170].

A **B**

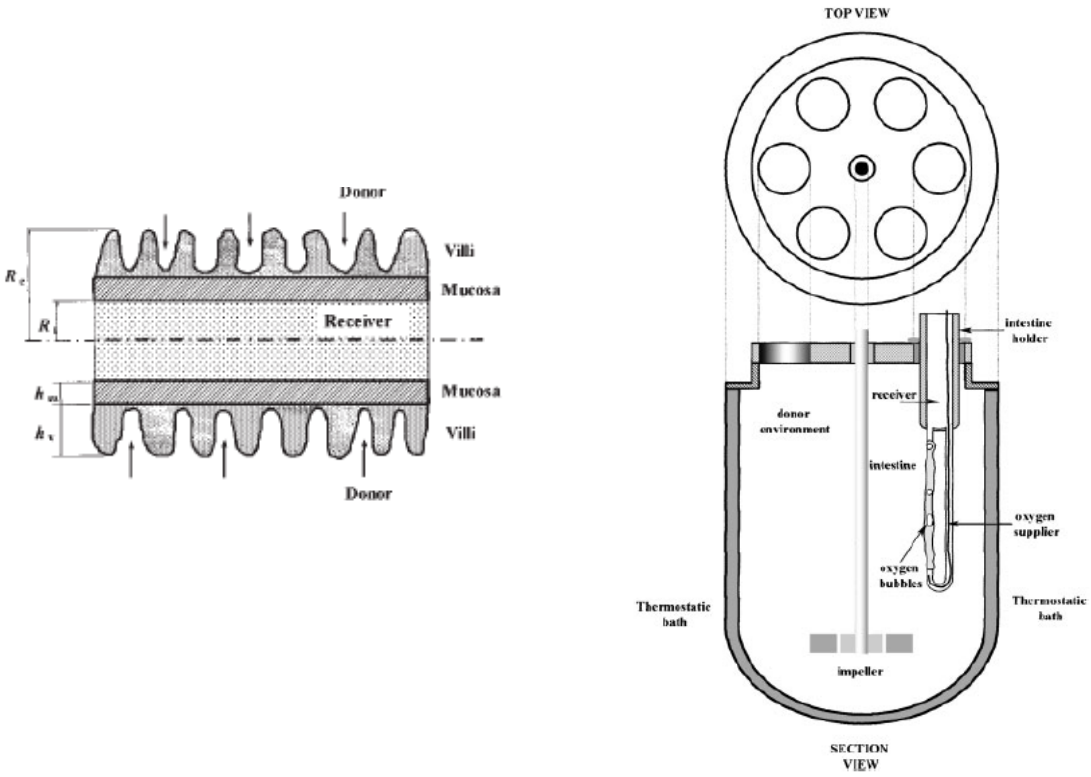


FIGURE 39 : (A) REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE PORTION D'INTESTIN EN CONFIGURATION EVERSEE (B) DISPOSITIF EXPERIMENTAL [171].

chaque bol contient un capillaire en «U» dont une des parties est constituée par l'intestin éversé.

4.2.2.1.4. CHAMBRE DE USSING

La chambre de Ussing est un dispositif comportant un tube en verre en forme de « U », rempli par les solutions expérimentales. Les deux branches du « U » sont reliées par deux demi-chambres (Figure 40), entre lesquelles est placée la portion d'intestin, préalablement prélevée sur un animal ou issue de biopsies humaines. Les tubes peuvent être chauffés et le milieu qu'ils contiennent peut être oxygéné par différents gaz (CO_2, O_2 ou N_2) et mis sous agitation. La forme en « U » du tube permet d'assurer l'existence d'une pression hydrostatique égale des deux côtés, évitant ainsi d'endommager le tissu [172]. Lors de l'expérience, la substance active est déposée dans un des deux tubes (du côté muqueux ou du côté séreux du tissu, suivant le type de transport que l'on veut étudier). On mesure ensuite la quantité de substance active retrouvée de l'autre côté. Ce système permet de suivre la différence de potentiel et le

courant généré par la présence du tissu [170, 172] permettant ainsi d'évaluer la viabilité du tissu au cours du temps.

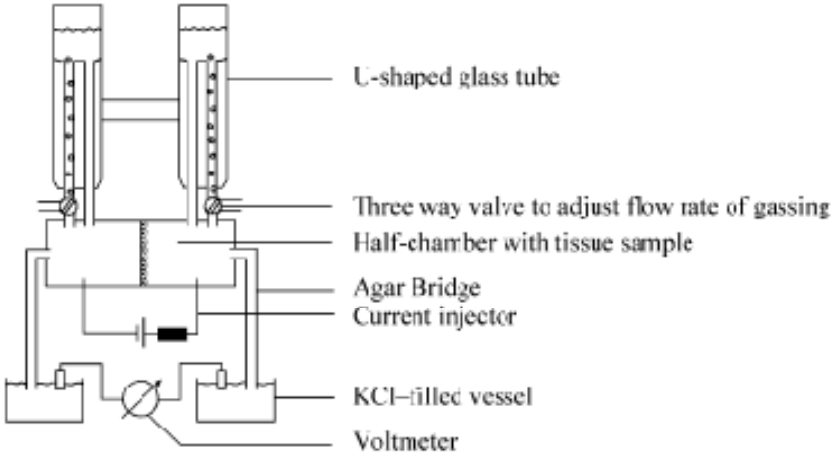


FIGURE 40 : SCHEMA D'UNE CHAMBRE DE USSING CIRCULATOIRE [172].

Il existe deux types de chambre de Ussing : les chambres circulatoires et les chambres à perfusion continue.

Les chambres de Ussing sont faciles d'utilisation, elles permettent l'étude des différences de perméabilité régionales si on utilise des échantillons de tissus provenant de diverses zones de l'intestin. Les études avec des tissus intestinaux humains sont possibles ce qui permet une comparaison de la perméabilité d'une même substance active sur des échantillons d'intestin de différentes espèces. De plus, il existe une agitation du système, les échantillons collectés sont propres facilitant ainsi en aval le travail analytique.

Le principal désavantage de cette technique est la perte de viabilité rapide du tissu utilisé (en 2 à 3 heures) qui est non innervé et qui n'est plus relié au circuit sanguin.

4.2.2.2. MODELES DE CULTURE CELLULAIRE

Le test des substances actives sur culture de cellules permet d'évaluer leur perméabilité vis-à-vis de la barrière intestinale. En cas de perméabilité importante, la culture cellulaire est également un outil permettant d'élucider les voies de passage empruntées par les substances actives pour rejoindre le pôle basolatéral (BL). Cependant, pour pouvoir espérer corréler les résultats *in vitro* avec ceux obtenus *in vivo*, il est important de choisir un modèle de cellule dont les caractéristiques se rapprochent le plus possible des cellules composant l'épithélium intestinal humain. Nous allons voir dans cette section quels sont les différents modèles de cellules pouvant être utilisés pour mimer les cellules intestinales.

4.2.2.2.1. CELLULES MADIN DARBY CANINE KIDNEY (MDCK)

Il s'agit de cellules épithéliales de rein de chien qui se différencient en cellules de forme cylindrique présentant des jonctions serrées. Du fait d'un temps de culture très réduit qui conduit à l'obtention d'un épithélium différencié et polarisé en seulement 3 à 4 jours [170] (contre 14 à 21 pour les Caco-2), ces cellules remplacent les cellules Caco-2 dans certaines études. En effet, cette durée de culture réduite permet à la fois d'éviter les contaminations et de diminuer le temps d'obtention de résultats. Etant donné qu'une bonne corrélation existe entre les valeurs de perméabilité de composés absorbés par voie passive selon le modèle Caco-2 et ce modèle [173], les cellules MDCK présentent donc un avantage sur les cellules Caco-2 dans le cadre de cette application, du fait de leur temps de culture réduit [174]. Cependant, il n'en reste pas moins que les cellules MDCK sont d'origine non humaine : les enzymes ainsi que les transporteurs présents (et leur niveau d'expression) diffèrent très probablement de ce qui existe au niveau des cellules épithéliales humaines mais des informations manquent à ce sujet [175].

4.2.2.2.2. CELLULES HT-29

Il existe différents clones sélectionnés au moyen de conditions de culture différentes. Un de ces clones ressemble morphologiquement aux cellules caliciformes et sécrète du mucus de structure semblable à celui présent au niveau du côlon. La perméabilité paracellulaire des cellules HT-29 est 50 fois plus élevée que celle des cellules Caco-2 [163]. Ces cellules sont surtout utilisées en co-culture dans des proportions identiques à celles trouvés *in vivo*. Le but est d'obtenir un système le plus proche possible de l'*in vivo* avec l'établissement d'une

couche de mucus sur les cellules. Cependant, *in vitro* les deux populations de cellules se mélangent mal et les cellules caliciformes produisent une quantité de mucus insuffisante.

4.2.2.2.3. CELLULES 2/4/A1

Il s'agit d'une lignée de cellules immortalisées issues du duodénum de rat fœtal. Ces cellules ont l'avantage de former des monocouches de cellules plus lâches par rapport aux cellules Caco-2 en ce qui concerne les jonctions serrées. En effet, les valeurs de TEER observée sur un épithélium de ces cellules est de 50 $\Omega.cm^2$ [176] ce qui s'approche du TEER des cellules humaines (compris entre 30 à 40 $\Omega.cm^2$) alors que le TEER des cellules Caco-2 est compris entre 150 et 1000 $\Omega.cm^2$. Le diamètre des pores paracellulaires des cellules 2/4/A1 est de 9,0 ± 0,2 Å ce qui est similaire aux valeurs trouvées chez l'humain, alors que chez les Caco-2 ce diamètre de pore est estimé à environ 3,7 ± 0,1 Å [177]. Ainsi, ces cellules se rapprochent plus des cellules épithéliales physiologiques de l'intestin grêle. De plus, comme elles expriment peu de transporteurs actifs, elles sont surtout utilisées dans le but d'étudier les passages par voie passive, notamment paracellulaire [176, 178].

4.2.2.2.4. CELLULES CACO-2

Les cellules Caco-2 sont issues d'un adénocarcinome de côlon humain. Elles se différencient complètement après 3 semaines de culture en des cellules polarisées. Bien qu'issues de cellules cylindriques, elles présentent beaucoup de similarités avec les entérocytes de l'intestin grêle, telles que [179] :

- la présence de microvillosités.
- la présence des jonctions serrées.
- la présence d'enzymes de la bordure en brosse (sucrase-isomaltase, lactase, aminopeptidase N, dipeptidylpeptidase IV [180]).
- la présence d'enzymes du métabolisme (phénolsulfotransférases, gluthathion-S-transférases, UDP-glucuronyltransférases et cytochromes 1A1 et 1A2 [181]).
- la présence de pompes d'efflux (P-gp).
- la présence de transporteurs :
    - de sucres (transporteurs d'hexoses (SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 et GLUT5)).
    - d'acides aminés.
    - de différentes substances actives [182].

- de peptides (PepT1 et HPT1 qui sont fréquemment impliqués dans le passage de certaines substances telles que des inhibiteurs de thrombine et des antibiotiques [183]).
- de la vitamine B12.

Ainsi, de par ces grandes similitudes avec les entérocytes intestinaux humains, les cellules Caco-2 sont largement utilisées pour prédire la perméabilité des substances actives.

Cependant, ce modèle n'est pas parfait et possède des différences avec les entérocytes intestinaux humains.

Ainsi, les valeurs de TEER des cellules Caco-2 varient entre 150 et 1 000 $\Omega.cm^2$ [184] alors que celles de l'épithélium colonique humain sont beaucoup plus faibles, situées entre 30 à 40 $\Omega.cm^2$ [185]. De plus, le diamètre des pores présents au niveau des jonctions serrées est plus faible sur le modèle Caco-2 qu'*in vivo* : les jonctions serrées établies entre les cellules intestinales humaines sont beaucoup plus lâches que celles établies entre les cellules Caco-2 [177, 185]. Cela permet d'expliquer que dans le cas de substances actives faiblement perméables il n'existe qu'une corrélation qualitative entre études *in vitro* sur Caco-2 et études *in vivo*. En effet, de telles substances actives sont transportées 30 à 80 fois plus lentement sur Caco-2 qu'*in vivo* [186] (Figure 41).

Les cellules Caco-2 présentent également une autre différence par comparaison à l'épithélium intestinal natif. En effet, bien que les Caco-2 expriment un nombre important de transporteurs, ceux-ci sont quantitativement sous-exprimés.

Ainsi dans le cas de la L-DOPA, complètement et rapidement absorbée au niveau du jéjunum par un transporteur aux acides aminés, il a été montré que sa perméabilité sur Caco-2 est 100 fois inférieure à celle observée au niveau du jéjunum (Figure 41) : une saturation du transporteur, présent en faible quantité au niveau des Caco-2, intervient probablement *in vitro*. Des résultats similaires ont été observés dans le cas notamment du D-glucose et de la L-leucine. En ce qui concerne la corrélation *in vitro*/*in vivo* pour les substances actives absorbées par le biais d'un transporteur protéique, le modèle Caco-2 peut donc générer des faux-négatifs [187].

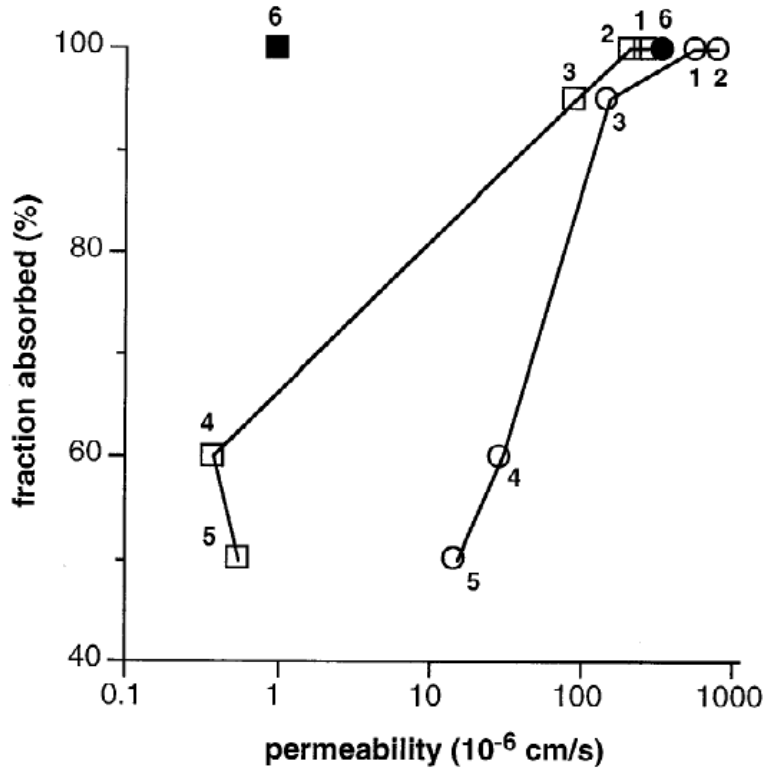


FIGURE 41 : FRACTION DE DOSE ABSORBEE APRES ADMINISTRATION ORALE EN FONCTION DU COEFFICIENT DE PERMEABILITE OBTENU SUR MODELE CACO-2 (□ TRANSPORT PASSIF, ■ L-DOPA) OU SUR JEJUNUM HUMAIN (○ TRANSPORT PASSIF, ● L-DOPA) [186].

Les nombre correspondent à : 1 – antipyrine, 2 – naproxène, 3 – métoprolol, 4 – terbutaline, 5 – aténolol, 6 – L-DOPA.

La L-DOPA est absorbée de façon totale et rapide via un transporteur aux acides aminés présent au niveau du jéjunum.

De la même façon que les cellules Caco-2 sous-expriment certains transporteurs, il existe également une sous expression du cytochrome majeur de l'intestin, le cytochrome CYP3A4. Ceci est un désavantage pour l'étude de l'absorption des substances actives substrats de ce cytochrome. En effet, une surestimation du passage va donc être induite par ce modèle cellulaire [175].

Malgré le manque de corrélation *in vitro*/*in vivo* pour les cas qui viennent d'être décrits (substance active absorbée par voie paracellulaire, substance active absorbée par un transporteur actif sous exprimé par les cellules Caco-2 et substance active substrat du cytochrome CYP3A4), les résultats d'études de passage menées sur cellules Caco-2 avec des molécules rapidement et complètement absorbées montrent une bonne corrélation avec les résultats *in vivo*. En effet, seules des variations minimes (d'un facteur 2 à 4, [186]) de perméabilité sont observées (Figure 41) : le modèle Caco-2 constitue donc un excellent modèle en ce qui concerne le passage par voie transcellulaire passive.

Bien qu'imparfait pour certaines corrélations *in vitro*/*in vivo*, l'épithélium de cellules Caco-2 reste cependant le modèle d'épithélium intestinal le plus utilisé *in vitro* : c'est d'ailleurs celui que nous avons choisi d'utiliser dans notre étude expérimentale. Dans la section suivante nous allons donc aborder différents aspects techniques de la culture cellulaire puis nous terminerons par un bilan des études ayant décrit le passage de l'héparine au niveau intestinal.

4.3. ETUDE DES MECANISMES DE PASSAGE SUR UN MODELE DE CULTURE CELLULAIRE : ASPECTS PRATIQUES

Les études de passage en culture cellulaire sont réalisées au moyen de plaques stériles contenant des inserts appelés Transwell®. Chaque insert contient une membrane microporeuse sur laquelle se développe l'épithélium de cellules, permettant ainsi de délimiter un compartiment apical (AP) où est déposée la solution de substance active à étudier et un compartiment basolatéral (BL) où est collectée la substance active ayant traversé l'épithélium (Figure 42).

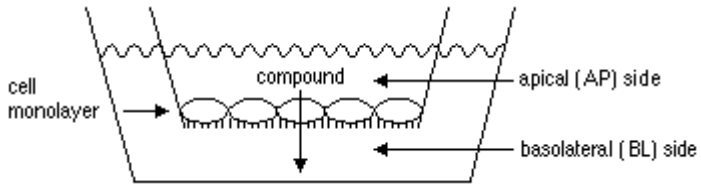


FIGURE 42 : SCHEMA D'UN INSERT DE TRANSWELL® [188].

Dans cet exemple, le transport des substances actives se fait du compartiment AP vers le compartiment BL.

La perméabilité apparente d'une substance active est déterminée grâce aux données générées par les études de passage, sa valeur reflétant l'importance du passage de la substance active. D'une façon générale, les composés dont la perméabilité est inférieure à 1.10^{-6} cm/s sont considérés comme faiblement absorbés (de 0 à 20%), ceux dont la perméabilité est comprise entre 1 et 10.10^{-6} cm/s sont dits moyennement absorbés (de 20 à 70%) et enfin ceux dont la perméabilité est supérieure à 10.10^{-6} cm/s sont fortement absorbés (70 à 100%) [189].

Cependant, avant toute étude de passage sur des modèles cellulaires, il est nécessaire, dans un premier temps, de vérifier que les cellules cultivées se sont différenciées correctement et ont conduit à l'établissement d'un épithélium polarisé qui possèdent des jonctions serrées suffisamment fortes. Principalement deux méthodes sont utilisées pour cela : la mesure de la résistance électrique de l'épithélium (TEER) et la mesure de la perméabilité de composés de référence.

4.3.1. VERIFICATION DE L'INTEGRITE D'UN EPITHELIUM DE CELLULES

L'intégrité et la maturité de l'épithélium, en ce qui concerne les jonctions serrées, est généralement suivie par la mesure de TEER ainsi que par la détermination de la perméabilité de certains marqueurs paracellulaires, connus comme non perméables vis-à-vis de l'épithélium.

4.3.1.1. MESURE DE LA RESISTANCE ELECTRIQUE TRANSEPITHELIALE

Les mesures de TEER au moyen d'un voltmètre équipé de deux électrodes : une est plongée dans le compartiment donneur alors que l'autre est placée simultanément dans le compartiment receveur. Si un épithélium de cellules jointives existe, une résistance au passage du courant entre les deux compartiments va être observée. La valeur de la résistance électrique est influencée par de nombreux paramètres tels que notamment [190] :

- la nature des cellules cultivées.
- le nombre de cellules déposées par puits.
- la nature et la surface du support.
- les conditions de culture.
- le nombre de passages réalisés.
- la durée de culture.

Par exemple, dans le cas des Caco-2, la résistance électrique augmente jusqu'à un maximum après 10 à 15 jours de culture [179, 191] et les valeurs de TEER peuvent alors varier de 150 à 1000 $\Omega.cm^2$[184].

Comme de nombreux paramètres peuvent faire varier les valeurs de TEER, cette mesure est plus qualitative que quantitative [184]. Ainsi, l'utilisation complémentaire de marqueurs de l'intégrité des jonctions serrées peut être utile afin de s'assurer de façon certaine de l'intégrité des jonctions serrées.

4.3.1.2. MARQUEURS DE L'INTEGRITE DES JONCTIONS SERREES

Afin d'évaluer l'intégrité de l'épithélium, certains marqueurs dont le passage paracellulaire est très faible peuvent être employés. Des composés non fluorescents (mannitol [192], inuline, PEG [192]) marqués par radioactivité ou des composés fluorescents (fluorescéine, inuline-FITC, dextran-FITC) peuvent être employés.

Les valeurs de perméabilité de certains de ces composés sur un épithélium de cellules Caco-2 sont les suivantes :

- mannitol : $0,29 \pm 0,03.10^{-6}$ cm/s, [193].
- inuline, $0,70 \pm 0,01.10^{-6}$ cm/s, [194].
- PEG-4 000, $1,44 \pm 0,17.10^{-6}$ cm/s, [194].
- FITC-dextran 10 000, $0,24 \pm 0,03.10^{-6}$ cm/s [194].
- FITC-inuline, $0,09 \pm 0,01.10^{-6}$ cm/s [195].
- fluorescéine, $0,94 \pm 0,06.10^{-6}$ cm/s [196].

4.3.2. DETERMINATION DE LA PERMEABILITE

Pour étudier le passage, il est nécessaire dans un premier temps, de déterminer la perméabilité d'une substance active par rapport à l'épithélium de cellules, en conditions « normales », c'est-à-dire sans utiliser d'inhibiteurs de passage.

La perméabilité est obtenue grâce à la formule suivante [188] :

$$Papp = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C0}$$

Avec :

dQ/dt : taux d'apparition de la substance active au cours du temps dans le compartiment receveur (mol/s).

A : surface de l'épithélium (cm^2).

C0 : concentration initiale en SA dans le compartiment donneur (mol/cm^3).

4.3.3. ELUCIDATION DES MECANISMES DE PASSAGE D'UNE SUBSTANCE ACTIVE

Afin d'élucider le passage de substances actives au niveau cellulaire, différentes stratégies se basant sur l'inhibition spécifique des différentes voies de passage, ont été développées. Les inhibiteurs sont principalement des composés chimiques mais des variations de paramètres physiques tels que la température ou le pH peuvent être employés.

L'étude consistant à déterminer les voies de passage d'une substance active se base sur la comparaison de la perméabilité apparente déterminée en conditions « normales » (c'est-à-dire en l'absence d'inhibiteurs) par rapport à la perméabilité apparente obtenue suite à l'introduction d'un inhibiteur d'une voie de passage. Si la perméabilité apparente évaluée en présence d'inhibiteur est la même que celle déterminée sans inhibiteur, cela signifie que la molécule n'emprunte pas cette voie de passage. En revanche, en cas de modification de la perméabilité, cela signifie que la substance active emprunte cette voie de passage.

La première question à résoudre est de savoir si le transport de la SA implique des phénomènes actifs ou passifs : ainsi il est possible de différencier les passages médiés par un

transporteur ou par des vésicules (actifs), des passages paracellulaires et transcellulaires par gradient de concentration (passifs). Pour cela, différentes stratégies peuvent être employées.

4.3.3.1. MISE EN EVIDENCE DE TRANSPORTS ACTIFS

Tout d'abord, étant donné que le métabolisme cellulaire est inhibé par une baisse de température, des expériences de passage menées à 4°C (au lieu de 37°C) permettent de bloquer les mécanismes de transport actif [197, 198]. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs affectant le métabolisme cellulaire constitue une technique encore plus fiable. On emploie pour cela l'azide de sodium, le 2-déoxyglucose ou le 2,4-dinitrophénol. L'azide de sodium inhibe l'activité des ATPases conduisant à une diminution de la capacité de la production d'ATP cellulaire. Le 2-déoxyglucose agit différement, par dépletion des stocks d'ATP intracellulaires. Le 2,4-dinitrophénol est un réducteur de l'ATP intracellulaire. Lors de l'utilisation de ces composés, les mécanismes actifs de la cellule sont inhibés par le manque d'ATP intracellulaire.

Ces expériences doivent être réalisées avec précaution car la déplétion en ATP affecte l'intégrité cellulaire. Il faut aussi noter que de telles expériences doivent être menées dans un milieu qui ne contient pas de glucose car la présence de ce sucre peut fausser les résultats.

Si un phénomène actif est mis en évidence, il faut alors déterminer s'il s'agit d'un mécanisme d'endocytose ou un phénomène mettant en jeux des transporteurs actifs.

La mise en évidence d'un mécanisme de transport par endocytose peut notamment être réalisée par la colchicine qui perturbe la structure des microtubules et donc le transport des substances actives au sein de vésicules intracellulaires.

Dans le cas ou un mécanisme d'endocytose n'est pas présent, cela signifie que le mécanisme de passage met en jeu un transporteur actif. Dans ce cas :

- soit le transporteur impliqué est inconnu, il faut alors le caractériser précisément. Ainsi, il est possible de mettre en évidence la Na^+-dépendance de certains transporteurs en réalisant une inhibition de la Na^+/K^+ ATPase au moyen d'ouabaïne. De même, la dépendance du transporteur aux ions Cl^- peut être mise en évidence par l'utilisation de composés tels que le SITS et le DIDS (tableau 8) et celle aux ions H^+ par le FCCP (Tableau 8) [192].

- soit le transporteur soupçonné de réaliser le passage est connu et bien caractérisé, il est alors possible d'utiliser certains analogues structuraux qui permettent son blocage spécifique. Parmi ces transporteurs, on peut notamment citer le transporteur des acides biliaires [105] ainsi que le transporteur des peptides PepT1 [199].

TABLEAU 8 : EXEMPLE D'AGENTS PHARMACOLOGIQUES UTILISES POUR L'ETUDE DES MECANISMES DE PASSAGE DE MOLECULES SUR DES MODELES D'EPITHELIUM ISSUS DE LA CULTURE CELLULAIRE.

	Inhibiteur	Rôle	Concentration en inhibiteur
Passage actif	Azide de sodium	Inhibiteur de la synthèse d'ATP	0,5 mM [192]/ 10 mM [105]/ 25 mM [200]
	2-déoxyglucose	Génère une déplétion des stocks d'ATP cellulaires	50 mM [201]
	DNP	Réducteur de l'ATP intracellulaire	0,5 mM [200] / 1 mM [202]
Endocytose	Colchicine	Perturbateur des microtubules	1µM [200] / 0,3 mM [192]
Passage paracellulaire	EDTA	Chélateur des ions Ca^{2+}	1,25 mM [200]
	EGTA	Chélateur des ions Ca^{2+}	2,5 mM [105]
Dépendance du transport en ions Na^+	DMA	Inhibiteur de l'échangeur Na^+/H^+	10 µM [192]
	Ouabaïne	Inhibiteur de la pompe Na^+/K^+-ATPase	1 mM [192, 202] / 5 mM [203]
Dépendance du transport en ions H^+	FCCP	Agent découplant qui abolit le gradient de H^+	40 µM [192]
Dépendance du transport en ions Cl^-	DIDS	Inhibiteur de l'échangeur Cl^-/HCO_3^-	0,1 mM [192] / 0,5 mM [204]
	SITS	Inhibiteur de l'échangeur Cl^-/HCO_3^-	0,5 mM [204]
	Bumétanide	Inhibiteur du cotransporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$	0,1 mM [192]

DIDS : acide 4,4'-diisothiocyanostilbène-2,2 disulfonique — DMA :dimethyl amiloride
SITS : 4 acétamino-4'-isothicyanostilbène-2, 2'-disulfonate — DNP : 2,4-dinitrophénol
FCCP : P-trifluoromethoxy carbonylcyanide phenyl hydrazone

4.3.3.2. MISE EN EVIDENCE DE PASSAGES PASSIFS

Si un transport actif est écarté, le passage ne peut se faire que par passage paracellulaire ou transcellulaire passif. Afin de différencier ces deux voies de passage, des composés chélateurs de Ca^{2+}, tels que l'EDTA et l'EGTA sont utilisés car ils permettent l'ouverture des jonctions serrées entre les cellules, abolissant donc le transport paracellulaire [205]. Ainsi, si un composé est suffisamment petit pour traverser l'épithélium au niveau des pores des jonctions serrées, l'ouverture des jonctions ne va pas conduire à une variation de sa perméabilité.

4.3.4. INFLUENCE DES CONDITIONS D'ETUDE SUR LES RESULTATS

Les cellules constituent un modèle pratique pour l'étude de la perméabilité et du mécanisme de passage des substances actives. Cependant, contrairement aux modèles qui utilisent des tissus animaux *ex vivo*, un grand nombre de conditions physiologiques ne sont plus présentes : pH, agitation, conditions « sink », … . Ainsi, les conditions expérimentales doivent être choisies avec soin afin de s'approcher au maximum des conditions physiologiques, dans le but d'éviter l'introduction de biais dans les résultats de l'étude. Il est donc primordial de savoir comment et dans quelle mesure les conditions expérimentales peuvent influer les résultats obtenus.

4.1.4.1. TEMPERATURE

La température classiquement choisie est 37°C afin de mimer les conditions *in vivo*. Cependant, une température basse (4°C) peut être également utilisée dans le but d'inhiber les phénomènes de passage actif [197, 198]. Si une diminution de la température inhibe effectivement les mécanismes de passage actif, elle joue également un rôle sur les propriétés physico-chimiques de la molécule telles que sa solubilité et son rayon hydrodynamique et donc sur les observations qui en résultent. Ainsi, les résultats issus de ce type d'expérience devront être analysés avec précaution [175].

4.1.4.2. AGITATION

L'agitation est nécessaire à la réduction de la couche d'eau liée, adjacente à la membrane épithéliale. Sans agitation, les perméabilités des substances actives transportées rapidement sont surestimées. En revanche, cela n'a pas d'influence majeure sur la perméabilité apparente des SA peu perméables [206].

4.1.4.3. CONDITIONS « SINK »

In vivo, la substance active absorbée traverse l'épithélium intestinal puis gagne le système sanguin, elle est alors immédiatement évacuée de la zone d'absorption. Cela permet le maintien d'un gradient de concentration, phénomène essentiel à l'absorption. On se trouve alors dans les conditions « sink ».

Ces conditions doivent être maintenues *in vitro* afin de prédire au mieux l'absorption. Pour cela, il faut que les conditions utilisées (concentration en substance active déposée, volume de milieu) permettent d'être dans une zone de concentration en substance active éloignée de la

concentration de saturation de la substance active : en général, on considère que la concentration doit être au maximum égale à 30% de la concentration de saturation.

Ainsi, dans le cadre des études de passage sur Transwell®, si la substance active étudiée est très peu soluble, l'emploi des conditions « sink » va permettre d'éviter la saturation du compartiment receveur, alors que dans le cas d'une substance active très perméable, ces conditions vont éviter l'existence d'un efflux artificiel de la substance active du compartiment donneur vers le compartiment receveur [175, 207]. Ainsi, les conditions « sink » permettent de maintenir un gradient de concentration suffisamment important, nécessaire à une perméation des substances actives la plus similaire possible à celle rencontrée *in vivo*.

4.1.4.4. CHOIX DES CONCENTRATIONS

Le choix de la concentration en substance active est un paramètre critique. En effet, vu les faibles volumes utilisés en culture cellulaire, le choix de la concentration met souvent en balance la solubilité de la substance active et la réponse analytique.

Dans le cas d'un transport actif, saturable par essence, la concentration utilisée doit être inférieure à la concentration à partir de laquelle il existe une saturation du transport actif, sinon la diffusion par voie passive devient alors prépondérante.

Ainsi à des concentrations faibles, la solubilité de la substance active n'est pas limitante et permet la mise en évidence d'un passage par transporteur. En revanche, si l'augmentation de concentration permet l'obtention de valeurs plus élevées en terme de perméabilité passive, la solubilité peut alors être un frein.

4.1.4.5. CONDITIONS DE PH

Le pH du milieu est un facteur très important en ce qui concerne l'absorption des substances actives ionisables. Un système à gradient de pH de 6,0 pour le pôle apical (mimant le pH du lumen) et de 7,4 pour le pôle basolatéral (mimant le sang) est recommandé pour les tests *in vitro*.

En effet, contrairement aux cellules de l'intestin, les cellules Caco-2 ne comportent pas de couche de mucus : les solutions appliquées au pôle apical sont donc directement au contact des cellules. Or *in vivo*, il existe un gradient de pH naturel de part et d'autre de l'épithélium intestinal : en effet, le pH de l'intestin est proche de 6,0 alors que le pH sanguin est de 7,4. Comme l'existence de ce gradient peut jouer un rôle dans l'absorption de certaines SA, il est

recommandé de se rapprocher des conditions de pH *in vivo* [182]. Cependant, dans certaines situations spécifiques telles que l'étude de voies d'efflux, ce gradient peut générer des faux-négatifs en ce qui concerne les bases faibles [208].

4.4. PERMEABILITE ET MECANISMES DE PASSAGES INTESTINAUX DE L'HEPARINE

Aucune étude portant exclusivement sur la détermination de la perméabilité apparente d'une solution d'héparine n'a été publiée. En effet, les valeurs de perméabilité apparente de l'héparine existant dans la littérature sont issues des recherches portant sur les systèmes d'administration permettant d'augmenter l'absorption de l'héparine par voie orale.

Ces travaux ont permis de déterminer la perméabilité apparente de l'héparine seule en solution ou en présence du promoteur d'absorption. Pour ces déterminations, des modèles tissulaires ou cellulaires ont été utilisés. Les principaux résultats de ces études sont présentés de façon synthétique dans le Tableau 9.

Nous allons, dans un premier temps, nous intéresser aux informations apportées par les systèmes tissulaires, à savoir la détermination de la perméabilité apparente de l'héparine, et la localisation d'une éventuelle absorption préférentielle au niveau de certains segments de l'intestin.

Tous les systèmes d'absorption orale ayant été présentés en détail dans la section 3 de l'étude bibliographique, seuls les résultats des études de passage sont exposés dans cette section.

4.4.1. MODELE TISSULAIRE

4.4.1.1. BOUCLES INTESTINALES, CAS DU SNAC

Des boucles intestinales ont été réalisées sur des rats, au niveau de l'iléon et du côlon. Une dose de 1 400 UI/kg d'HNF en présence ou non de SNAC (dose de 35 mg/kg) et/ou de propylène glycol (PG) a été administrée [84]. Des prélèvements ont été effectués pendant deux heures et ont permis d'obtenir la courbe suivante qui montre la variation du TCA (ou aPTT en anglais) en fonction du temps :

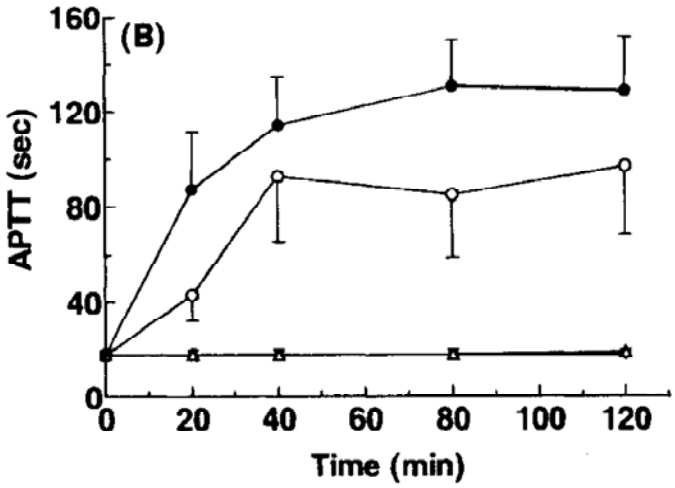


FIGURE 43 : EFFET DU SNAC ET DU PROPYLENE GLYCOL SUR LE TCA SUITE A LEUR ADMINISTRATION INTRA-ILEALE CHEZ DES RATS EN PRESENCE D'HEPARINE [84].

Légende : héparine en solution dans l'HBSS (Δ), d'héparine en présence de 25% de PG (▼), d'héparine en présence de SNAC (○) et d'héparine en présence de SNAC et de 25% de PG (●).

Cette étude montre une augmentation significative du TCA lorsque l'héparine est administrée avec du SNAC (en présence ou non de PG) aussi bien au niveau de l'iléon (figure 43) qu'au niveau du côlon. Ainsi, le PG qui ne présente aucun effet propre sur la perméation de l'héparine, potentialise l'effet du SNAC. Une biodisponibilité relative, par comparaison avec l'injection sous-cutanée d'une solution de 250 UI/kg de la même héparine, a été calculée dans le cas de l'héparine administrée avec le SNAC seul (18,4%) et le SNAC en présence de PG (26,5%). Cependant aucune valeur de perméabilité de l'héparine avec ce modèle n'a été évaluée. Enfin, l'étude des tissus en fin d'expérience n'a pas mis en évidence de signes de nécrose.

4.4.1.2. CHAMBRE DE USSING

4.4.1.2.1. POLYMERES MUCOADHESIFS : THIOMERES

Une étude utilisant un thiomère (le polycarbophile) a été réalisée sur chambre de Ussing dans le but de déterminer la perméabilité d'une HBPM [100]. Des échantillons de duodénum de cochon d'inde, d'une surface de perméation de 0,64 cm^2, ont été utilisés. Une quantité de 465

unités anti-Xa/mL d'HBPM a été déposée dans le compartiment donneur. Des prélèvements effectués chaque demi-heure durant 3 heures et dosés en activité anti-Xa, ont permis d'obtenir une courbe (Figure 44) montrant l'apparition de l'héparine au pôle basolatéral en fonction du temps.

En utilisant le système complet promoteur d'absorption (c'est-à-dire le polycarbophile conjugué à la cystéine en présence de gluthation), une activité atteignant jusqu'à 1,25 unité anti-Xa/mL est obtenue au pôle basolatéral après 3 heures d'expérience. Cela correspond à 0,26% de la quantité déposée initialement. Une perméabilité apparente de $0{,}39.10^{-6}$ cm/s est retrouvée dans ce cas et donne, par comparaison au témoin (de perméabilité apparente de $0{,}18.10^{-6}$ cm/s), un rapport d'effet promoteur de 2,2. Il faut signaler que lors de l'expérience, une diminution de TEER a été observée, témoignant ainsi de la capacité de ce polymère à ouvrir les jonctions serrées.

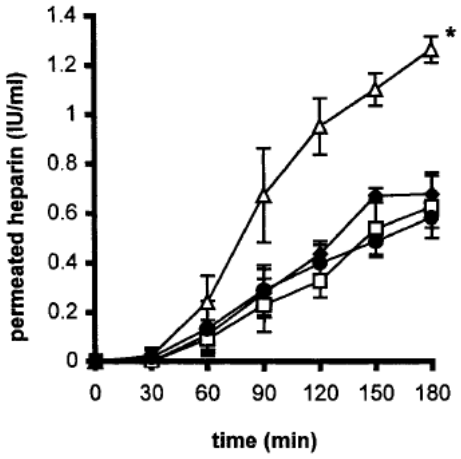


FIGURE 44 : EFFET PROMOTEUR D'ABSORPTION D'UN THIOMERE SUR L'HEPARINE, TESTE SUR CHAMBRE DE USSING [100].

Comparaison de l'effet promoteur d'absorption sur chambre de Ussing du polycarbophile seul (◆), du polycarbophile conjugué avec la cystéine (□) du polycarbophile conjugué à la cystéine en présence de gluthation (Δ) et d'une solution tampon témoin (●). Chaque échantillon contient également 465 unités anti-Xa/mL d'HBPM.

4.4.1.2.2. AGENTS MUCOLYTIQUES

4.4.1.2.2.1. BROMELAÏNE

Des expériences utilisant la bromélaïne à différents rapports avec une HBPM (2:1, 1:1 et 1:2) ont été réalisées sur chambre de Ussing à partir du duodénum de rat [92].

Il a été démontré que la bromélaïne possède un effet promoteur d'absorption, quelle que soit sa concentration. Cependant, c'est avec le rapport 1:1 que la quantité d'héparine la plus importante a été trouvée au niveau basolatéral (Figure 45 (A)). La perméabilité apparente obtenue avec le rapport 1:1 est de 170.10^{-7} cm/s alors que la valeur du témoin (solution d'HBPM) est de 40.10^{-7} cm/s : la présence de bromélaïne permet d'augmenter la perméabilité apparente de l'HBPM d'un facteur 4,5.

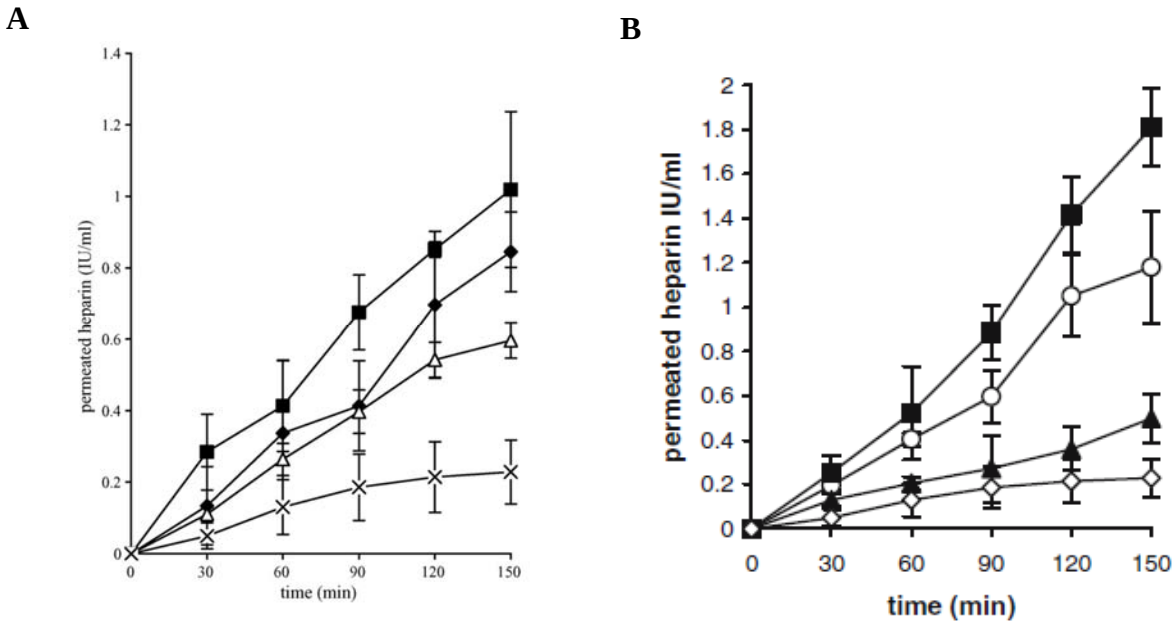


FIGURE 45 : EFFET DE LA BROMELAÏNE ET DE LA PAPAÏNE SUR LE TRANSPORT D'HEPARINE EVALUE SUR CHAMBRE DE USSING [91, 92].

Cette figure présente l'héparine transportée dans le compartiment basolatéral de la chambre de Ussing en présence de (A) bromélaïne ou de (B) papaïne à des concentrations croissantes.

Dans le cas de la bromélaïne, le compartiment apical contient 10 unités anti-Xa/mL d'HBPM et des quantités en bromélaïne correspondant à des rapports entre bromélaïne et HBPM de 2:1 (◆), 1:1 (■) et de 1:2 (Δ). Dans le cas de la papaïne, le compartiment apical contient 50 unités anti-Xa/mL d'HBPM et des quantités en papaïne correspondant à des rapports entre papaïne et HBPM de 2:1 (○), 1:1 (■) et de 1:2 (Δ).

4.4.1.2.2.2. PAPAÏNE

Une étude de passage sur chambre de Ussing, utilisant des conditions très similaires à celle menée avec la bromélaïne, a été réalisée [91]. La quantité d'HBPM trouvée au niveau du compartiment receveur est présentée dans la Figure 45(B). Au bout de trois heures, en présence d'un rapport molaire 1:1 entre papaïne et HBPM, une quantité de 1,81 unité anti-Xa est retrouvée au niveau basolatéral alors que la quantité d'HBPM issue du témoin est de 0,23 unité anti-Xa/mL. Ainsi, en présence du promoteur d'absorption, la perméabilité apparente de l'héparine est de 62.10^{-7} cm/s alors que sans le promoteur la perméabilité n'est plus que de 8.10^{-7} cm/s : la papaïne permet donc une augmentation de 7,9 fois de la perméabilité apparente de l'héparine. La papaïne constitue donc *in vitro* un promoteur d'absorption efficace de l'héparine.

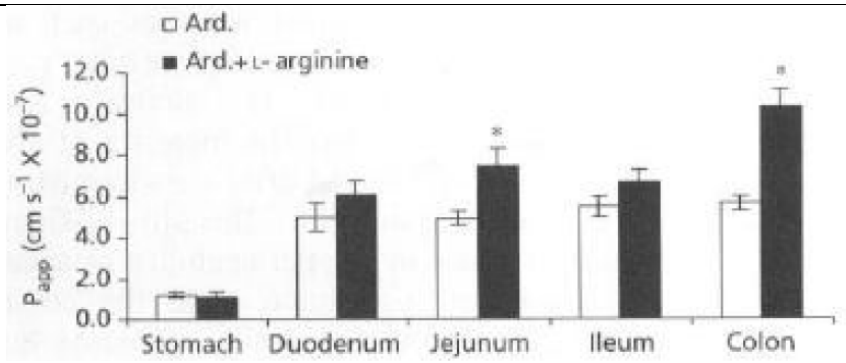
4.4.1.2.3. AUTRES PROMOTEURS D'ABSORPTION : L-ARGININE, ACIDE GLYCCYRHETINIQUE, CAPRATE DE SODIUM ET PEPTIDE SYNTHETIQUE DERIVE DE LA TOXINE ZO 1002

L'équipe de Motlekar a étudié la perméabilité de 4 promoteurs d'absorption (l'acide glycyrrhétinique [209], la L-arginine [114], un peptide synthétique dérivé de la toxine ZO 1002 [117] et le caprate de sodium [77]) co-administrés avec une HBPM, l'ardéparine, lors d'études sur chambre de Ussing dans des conditions rigoureusement identiques.

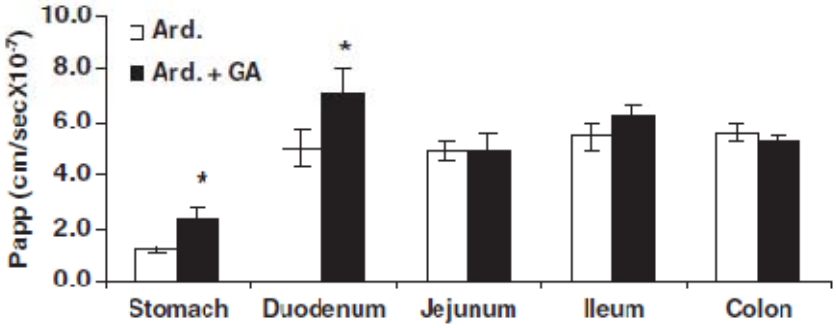
Dans chacune de ces études, il a été effectué une détermination de la perméabilité apparente de l'ardéparine à travers différents segments du tractus gastro-intestinal de rat (l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon) permettant ainsi de mettre en évidence (ou non) l'existence d'une zone tissulaire intestinale d'absorption préférentielle de cette HBPM en présence du promoteur testé.

Ces études ont montré que la perméabilité du témoin (consistant en une solution d'ardéparine) est constante au niveau de tous les segments de l'intestin et située aux alentours de 5.10^{-7} cm/s (figure 46). En revanche au niveau de l'estomac, la perméabilité de l'ardéparine, est plus faible, de valeur 1.10^{-7} cm/s.

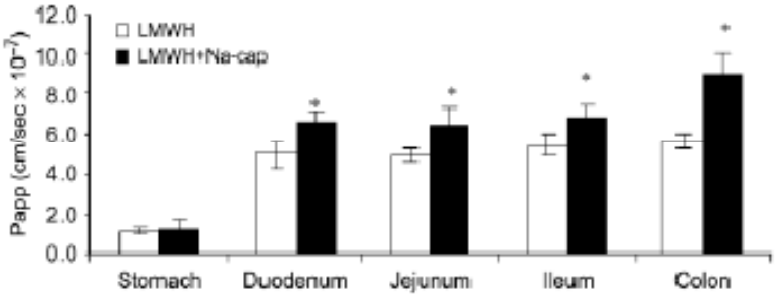
A



B



C



D

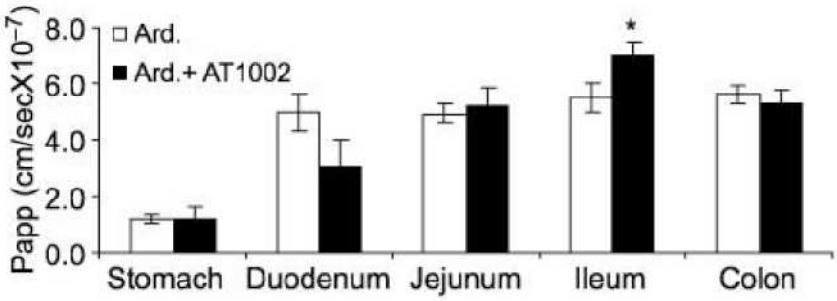


FIGURE 46: PERMEABILITE REGIONALE DE L'ARDEPARINE EN PRESENCE DE DIFFERENTS PROMOTEURS D'ABSORPTION, EVALUEE SUR CHAMBRE DE USSING [77, 114, 117, 209].

L'ardéparine est utilisée (2 400 unités anti-Xa/kg) seule ou en présence (A) de L-arginine ou (B) d'acide glycyrrhétinique ou (C) de caprate de sodium ou (D) d'un peptide synthétique dérivé de la toxine ZO 1002, à travers la membrane gastro-intestinale du rat montée sur chambre de Ussing.

En ce qui concerne l'effet promoteur de ces différents systèmes sur le passage au niveau tissulaire de l'héparine, il a été observé :

- une absorption préférentielle de l'héparine en présence de L-arginine au niveau du jéjunum et du côlon (figure 46 (A)) puisque les valeurs de perméabilité apparentes sont statistiquement différentes de celles du témoin (de 7.10^{-7} cm/s et de 10.10^{-7} cm/s, respectivement).
- une absorption préférentielle de l'héparine en présence d'acide glycyrrhétinique au niveau de l'estomac (perméabilité apparente de $2{,}5.10^{-7}$ cm/s) et du duodénum (perméabilité apparente de 7.10^{-7} cm/s, figure 46 (B)).
- une absorption similaire de l'héparine en présence de caprate de sodium au niveau des différents segments de l'intestin (perméabilité apparente comprise entre 6 et 8.10^{-7} cm/s, figure 46 (C)).
- une absorption préférentielle de l'héparine au niveau de l'iléon en présence du peptide synthétique analogue à la toxine AT 1002 (figure 46 (D)).

4.4.2. MODELE CELLULAIRE

Toutes les études étudiant le passage de l'héparine sur des cultures de cellules ont uniquement employé le modèle Caco-2. Bien qu'un certain nombre de ces études aient déterminé la valeur de la perméabilité de l'héparine, très peu d'entre elles se sont intéressées aux mécanismes de passage. Les principaux résultats de ces expériences sont exposés dans cette section et présentés sous forme synthétique dans le Tableau 9.

4.4.2.1. POLYMERES MUCOADHESIFS : DERIVES DE CHITOSANE

La perméabilité d'HBPM en présence de deux dérivés de chitosane, un cationique le MCC [97] et l'autre anionique, le SNOCC [98], a été testée sur des Transwell® contenant un épithélium de cellules Caco-2, obtenu après 21 à 23 jours de culture. Ces polymères ont été testés à deux concentrations différentes (3% et 5% (m/v)) et sous différents grades de viscosité (basses et faible viscosité dans le cas du MCC et viscosité de 20,40 et 60 centipoises dans le cas du SNOCC) en présence d'une concentration de 1% (m/v) d'HBPM (Tableau 9).

Dans les deux cas, les conditions de l'étude sont relativement proches car elles ont été menées par la même équipe. Ainsi, la mesure du TEER en présence des polymères, et le recouvrement à des valeurs normales en fin d'expérience, a été évaluée avant la réalisation de l'étude de

passage proprement dite. Il a été montré que les MCC et les SNOCC induisent une diminution du TEER concentration dépendante. Cependant, des variations importantes sont constatées en fonction de la viscosité : dans le cas du MCC, c'est avec le dérivé de plus basse viscosité que les diminutions les plus importantes sont observées alors que dans le cas des SNOCC, c'est les SNOCC 40 et 60 qui induisent la plus forte diminution. Dans tous les cas, un retour à des valeurs normales de TEER après expérience est obtenu dans les 24 heures : ces polymères permettent donc d'induire une ouverture réversible des jonctions serrées.

En ce qui concerne l'étude de passage, le SNOCC 40 à la concentration de 3% (m/v) permet l'obtention d'une perméabilité apparente de l'héparine $0{,}063.10^{-7}$ cm/s (Tableau 9). Comme l'activité anti-Xa présente au pôle basolatéral suite au dépôt d'une solution témoin de reviparine n'est pas détectable, le rapport d'augmentation de la perméabilité n'a pas pu être déterminé. Dans le cas du MCC de basse viscosité à la concentration de 3% (m/v), une perméabilité apparente de l'héparine de $0{,}020.10^{-7}$ cm/s est obtenue, alors que la perméabilité du témoin (solution d'héparine à la même concentration) n'est que de $0{,}002.10^{-8}$ cm/s : cela conduit à une augmentation de la perméabilité d'un facteur 88 en présence de SNOCC par comparaison au témoin.

Cependant, les valeurs cumulées de passage de l'activité anti-Xa au niveau de pôle basolatéral ne sont pas présentées, rendant la comparaison difficile avec les autres systèmes.

4.4.2.2. AGENT MUCOLYTIQUES : BROMELAÏNE

En plus d'une étude sur chambre de Ussing, une étude de passage sur monocouche de cellules Caco-2 a été réalisée dans ce cas. La quantité d'HBPM déposée au pôle donneur est systématiquement de 5 unités anti-Xa/mL, alors que la quantité de bromélaïne varie (rapports molaires de 2:1, 1:1 et 1:2 entre bromélaïne et HBPM). Dans le cas de la concentration la plus élevée en bromélaïne, les valeurs du TEER sont effondrées, aboutissant ainsi aux valeurs les plus importantes de passage (47%, Figure 47) et de perméabilité ($45.\ 10^{-7}$ cm/s). Cependant, la valeur du TEER ne revient pas à sa valeur initiale, même après 5 jours dans le milieu de culture, démontrant la toxicité de la bromélaïne à des concentrations élevées. Il semblerait qu'à de fortes concentrations, cette enzyme bloque la reformation des jonctions serrées conduisant à la perte d'intégrité de l'épithélium.

En revanche, à des concentrations plus faibles, un retour aux valeurs normales de TEER sont observées après l'étude de passage. Dans ce cas, des transports de 24% et 21% de la quantité

initiale d'HBPM déposée sont obtenus, avec les ratios molaires (1:1) et (1:2), respectivement (Figure 47). Les valeurs de perméabilité apparente sont alors de 20 et 24.10^{-7} cm/s, ce qui correspond à une augmentation de 3,0 à 3,5 fois par rapport à la perméabilité apparente du témoin.

Les différences de perméabilité obtenues entre études sur cellules Caco-2 et chambre de Ussing sont attribuées aux différences histologiques entre les cellules mais également à l'absence de mucus et d'autres populations cellulaires dans le cas de l'étude sur Caco-2.

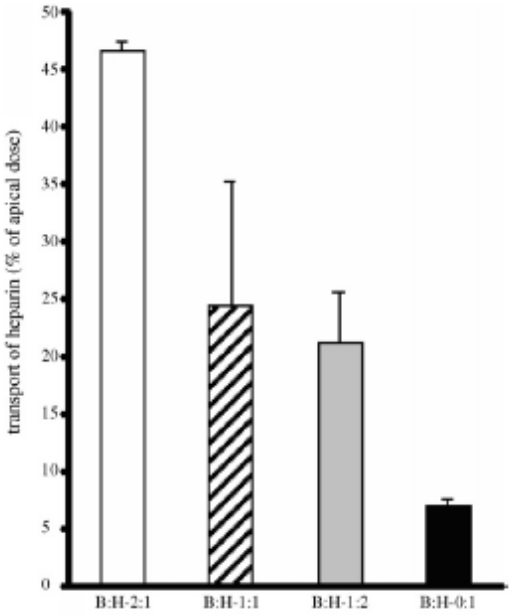


FIGURE 47 : ETUDE DE TRANSPORT DE L'HEPARINE EN PRESENCE DE BROMELAÏNE SUR UN MODELE D'EPITHELIUM ISSU DE LA CULTURE CELLULAIRE [92].

Cette figure représente le transport cumulé de l'héparine du pôle apical au pôle basolatéral à travers une monocouche de cellules Caco-2 pendant une durée de 150 minutes d'incubation en présence de bromélaïne (à des rapports molaires avec l'héparine de 2:1 (barre blanche), 1:1 (barre hachurée), 1:2 (barre grise)) par comparaison avec le contrôle (barre noire). La concentration initiale en héparine au niveau du pôle apical était de 5 unités anti-Xa/mL.

4.4.2.3. AUTRES PROMOTEURS D'ABSORPTION : L-ARGININE, ACIDE GLYCCYRHETINIQUE, CAPRATE DE SODIUM ET PEPTIDE SYNTHETIQUE DERIVE DE LA TOXINE ZO 1002

Des études relativement similaires ont été réalisées par l'équipe de Motlekar à partir de différents promoteurs d'absorption tels que l'acide glycyrrhétinique [209], la toxine AT 1002[117], la L-arginine [114] et le caprate de sodium [77] (tableau 9).

Suite à la détermination de la cytotoxicité des promoteurs utilisés, des études de passage sur Transwell®, réalisées exactement dans les mêmes conditions de culture (seule la concentration en promoteur d'absorption varie), permettent d'évaluer la perméabilité de l'héparine en présence du promoteur d'absorption ainsi que le rapport d'effet promoteur de la substance étudiée. La quantité d'héparine présente au pôle basolatéral suite au passage à travers les cellules n'est jamais présentée. La quantité d'héparine déposée au pôle apical n'est pas mentionnée.

Les effets promoteurs d'absorption de ces composés, sont compris entre 7,34 (cas du caprate de sodium à la concentration de 6%) et 2,1 (cas du peptide synthétique issu de la toxine ZO 1002 à la concentration de 0,0250 %). Tous semblent agir sur les jonctions serrées, bien que les mécanismes d'actions n'aient pas été investigués dans ces études.

4.4.2.4. SNAC

Dans cette étude [84], suite au dépôt d'héparine en solution à la concentration de 500 UI/mL dans le pôle apical, aucune activité n'est détectée dans le pôle basolatéral. En effet, en présence de SNAC, la présence d'héparine au pôle basolatéral n'est observable que dans le cas de l'emploi de doses cytotoxiques de SNAC. De plus, les résultats de passage obtenus ne sont pas du tout reproductibles. Différentes explications sont proposées afin d'expliquer ce phénomène :

- les doses d'héparine présentes au pôle basolatéral sont inférieures à la limite de détection de la méthode de dosage utilisée (dosage par méthode colorimétrique de l'activité anti-Xa).
- il existe une séquestration de l'héparine au niveau des entérocytes empêchant ainsi toute détection d'une activité importante au pôle basolatéral.
- la concentration en SNAC utilisée est trop faible pour permettre un transport suffisant d'héparine au pôle basolatéral. Cependant, comme des concentrations plus

importantes en SNAC sont cytotoxiques pour les cellules Caco-2, l'étude de passage ne peut pas être réalisée sur ce modèle.

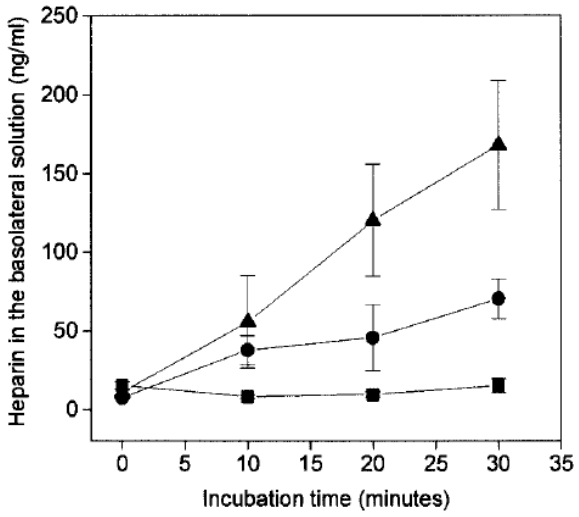
Cette étude a également déterminé les valeurs de perméabilité du SNAC, suggérant ainsi différentes hypothèses pour expliquer le mécanisme du passage *in vivo*. Trois éléments laissent à penser que le passage du SNAC au niveau cellulaire se fait selon un mécanisme transcellulaire passif : i) il existe un flux bidirectionnel égal non saturable en SNAC aussi bien dans le sens de la sécrétion que de l'absorption ii) la valeur élevée de perméabilité apparente du SNAC ne varie pas en fonction de la dose de SNAC utilisée et iii) le coefficient de partage octanol/eau du SNAC est de 0,7.

Une autre étude plus récente à également été publiée à ce sujet [210]. En plus d'une étude de passage, qui montre que de l'héparine (dosée en quantité et non en activité) est détectée au pôle BL de Transwell® en présence de SNAC à la concentration de 33 et 66 mM (Figure 48 (A)), un marquage fluorescent de l'héparine par Alexa fluor 488 a été mis en place dans le but d'identifier la localisation de l'héparine au sein de l'épithélium de Caco-2.

Cette étude a également utilisé d'autres marqueurs fluorescents tels que le YOYO-1, un colorant de l'ADN du noyau, imperméable à la membrane plasmique et l'Alexa fluor 488 qui couplé à la phalloïdine permet de visualiser la F-actine, une protéine responsable du maintien des jonctions serrées. Si une ouverture des jonctions serrées se produit, elle s'accompagne d'une redistribution de l'actine qu'il est alors possible d'observer.

Ainsi, il a été montré qu'en présence de SNAC, l'héparine est retrouvée au niveau du cytoplasme des cellules (Figure 48 (B)) sans que cela n'induise de lésion de la membrane cytoplasmique. En effet, aucune coloration du noyau des cellules n'a été observée en présence de YOYO-1 et de SNAC à des concentrations de 33 et 66 mM : le passage de l'héparine se fait donc sans perméabilisation de la membrane plasmique. De plus, comme ces mêmes concentrations en SNAC n'induisent pas de modification de la localisation de la F-actine, il a été conclu que le passage de l'héparine en présence de SNAC ne se fait pas selon la voie paracellulaire. Cependant, le mécanisme de passage qui permet à l'héparine de gagner le cytoplasme des cellules endothéliales sans endommager la membrane cytoplasmique de la cellule reste à élucider. Il est supposé que la création de complexes SNAC-héparine plus lipophiles que l'héparine seule, aident à la perméation de l'héparine par voie transcellulaire.

A



B

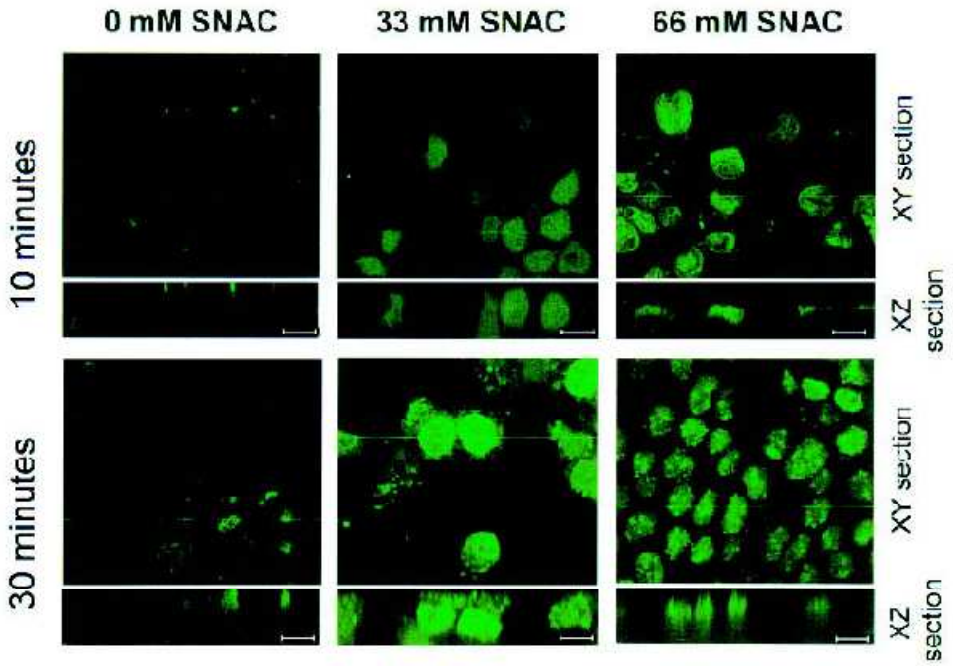


FIGURE 48 : ETUDE DU PASSAGE DE L'HEPARINE EN PRESENCE DE SNAC SUR UN MODELE D'EPITHELIUM ISSU DE LA CULTURE CELLULAIRE [210].

(A) concentration en héparine présente au niveau du pôle basolatéral d'un épithélium de cellules Caco-2 incubées avec de l'héparine seule (■) ou en présence de 33 mM (●) et 66 mM (▲) de SNAC.

(B) Capture de l'héparine par l'épithélium de cellules Caco-2 à différents temps d'incubation (10 et 30 minutes) en présence d'héparine seule ou en présence d'héparine et de SNAC (concentrations de 33 ou 66 mM). La barre d'échelle représente 10 µm.

4.4.2.5. ACIDE DEOXYCHOLIQUE (DOCA)

L'étude la plus aboutie en ce qui concerne l'étude du mécanisme de passage de l'héparine au niveau cellulaire est celle qui utilise des conjugués d'acide déoxycholique et d'héparine en présence de DMSO [105].

La perméabilité de différentes concentrations en conjugués (0,1 ; 0,5 ; 1 et 5 mg/mL) a été évaluée sur un épithélium de cellules Caco-2 développé durant 4 semaines sur des Transwell®. Ce sont les concentrations les plus faibles en conjugué qui ont conduit aux perméabilités apparentes les plus élevées : 45.10^{-7} cm/s et 42.10^{-7} cm/s pour des concentrations de 0,1 et 0,5 mg/mL, respectivement. La perméabilité apparente du témoin, c'est-à-dire une solution d'héparine en présence de DMSO, est inférieure à 3.10^{-7} cm/s.

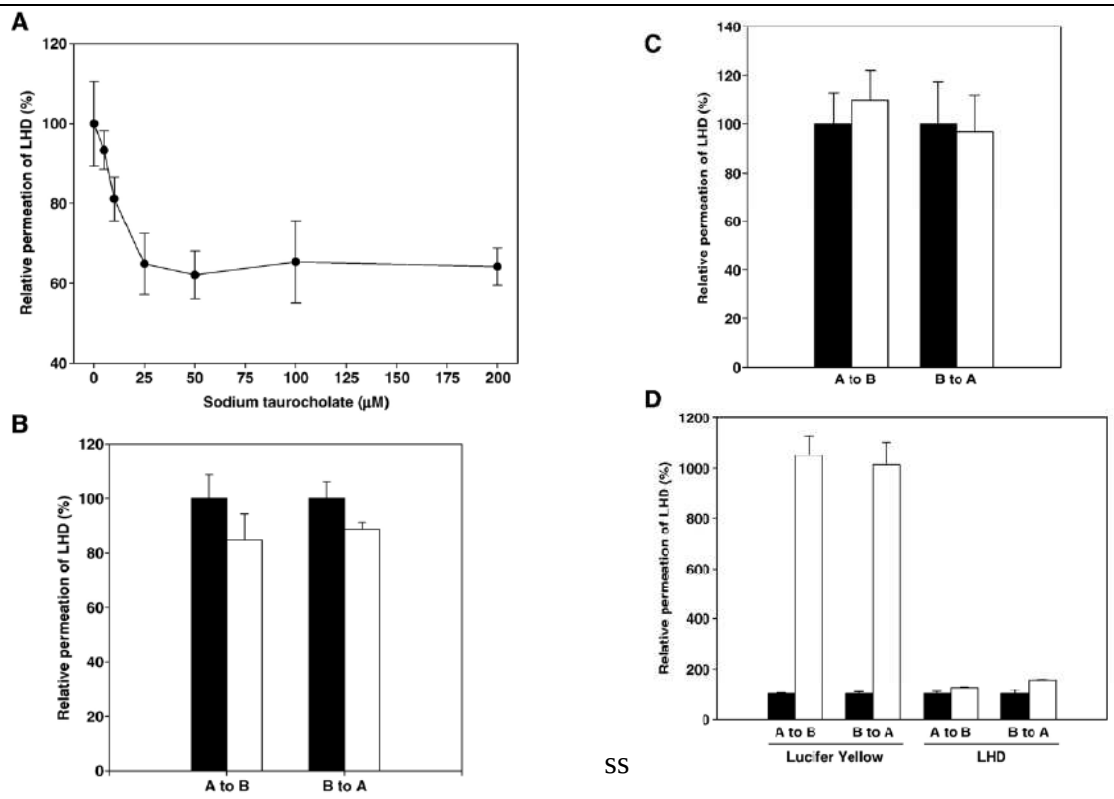
Suite à ces résultats probants, le reste de l'étude s'est focalisé sur l'élucidation des mécanismes de passage. Pour cela, différents inhibiteurs ont été utilisés :

- le taurocholate de sodium, un inhibiteur compétitif des transporteurs des acides biliaires.
- l'azide de sodium, un inhibiteur des transports actifs, qui permet de stopper la production d'ATP cellulaire.
- la colchicine, un inhibiteur de l'endocytose qui agit par blocage des microtubules.
- l'EGTA (acide tétra-acétique éthylène glycol), un chélateur des ions calcium qui permet d'induire une ouverture des jonctions serrées.

Lors de la mise en présence de taurocholate sur les cellules et de conjugué DOCA-HBPM, il a été constaté que plus la concentration en taurocholate augmente, plus la perméabilité du conjugué diminue (voir Figure 49 (A)). Cependant, cet effet est stoppé quand la concentration en taurocholate dépasse 25 µM : il n'y a alors plus de diminution de la perméabilité du conjugué.

Cette expérience prouve qu'il existe bien une interaction entre les transporteurs aux acides biliaires et le passage par l'héparine des cellules. Cependant, l'utilisation de l'azide de sodium, un inhibiteur des transports actifs, n'a pas permis de mettre en lumière l'existence d'un mécanisme de transport actif, étant donné que la perméabilité du conjugué avec ou sans azide est la même (figure 49 (B)). De plus, la colchicine et l'EGTA n'ont pas mis en évidence l'existence d'un passage par endocytose ou par voie paracellulaire (figure 49 (Cet D)).

Cela signifie donc qu'il existe une liaison entre les récepteurs biliaires et les conjugués DOCA-HBPM. Cependant, cette interaction ne conduit pas à une translocation de l'héparine au sein de la cellule : elle permet uniquement une augmentation du gradient en conjugué à travers la paroi cellulaire, aidant ainsi à la simple diffusion par voie passive.



SS

FIGURE 49 : ETUDES DES MECANISMES DE PASSAGE DU CONJUGUE DOCA-HBPM EN PRESENCE DE DMSO A TRAVERS UN EPITHELIUM DE CELLULES CACO-2 [105].

(A) Perméabilité relative de 0,5 mg/mL de conjugué DOCA-HBPM (avec DMSO) du pôle AP au pôle BL en présence de différentes concentrations en taurocholate de sodium (0 à 200 µM).

(B) Perméabilité relative de 0,5 mg/mL de conjugué DOCA-HBPM (avec DMSO) du pôle AP au pôle BL et inversement après 2 heures sans (barres noires) ou en présence d'azide de sodium (barres blanches).

(C) Perméabilité relative de 0,5 mg/mL de conjugué DOCA-HBPM (avec DMSO) du pôle AP au pôle BL et inversement après 2 heures sans (barres noires) ou suite à un prétraitement des cellules avec 2,5 µM de colchicine (barres blanches).

(D) Perméabilité relative de 0,5 mg/mL de conjugué DOCA-HBPM (avec DMSO) du pôle AP au pôle BL et inversement après 2 heures en présence de glucose (barres noires) ou suite au prétraitement à base de 2,5 mM d'EGTA (barres blanches). L'épithélium de Caco-2 a également été traité avec le jaune lucifer (100 µM).

Les modèles tissulaires et cellulaires génèrent des informations essentielles en ce qui concerne la perméabilité d'une substance active vis-à-vis de la barrière épithéliale (valeurs de la perméabilité apparente, localisation d'une zone d'absorption préférentielle, élucidation des mécanismes de passage cellulaires). Cependant pour l'héparine, dont la perméabilité apparente vis-à-vis de l'épithélium intestinal en solution est quasi-nulle, les informations relatives à ce sujet dans la littérature sont inexistantes : ainsi, il n'a jamais été publié d'études évaluant sa perméabilité ou recherchant l'existence d'un transporteur capable d'aider à sa perméation. Or, on peut se poser légitimement la question de l'existence d'un tel transporteur car les héparines, en temps que molécules naturelles, possèdent des rôles très variés au sein du corps : il ne faut pas oublier qu'il s'agit de molécules présentes en fortes quantités au niveau des muqueuses intestinales. Elles sont d'ailleurs extraites de l'intestin de porc ou de bœuf. De plus, les héparanes sulfates, glycosaminoglycanes de structure très similaire à l'héparine, jouent un rôle fondamental dans un grand nombre de mécanismes physiologiques (inflammation, maintien de la fonction de barrière de l'intestin [211], transmission de signaux cellulaires très divers, …). La question des mécanismes de passage de l'héparine administrée par voie orale au sein des différents systèmes permettant de promouvoir son absorption a, par ailleurs, été très peu étudiée et reste ainsi entière.

TABLEAU 9 : RECAPITULATIF DES RESULTATS DES ETUDES DE PASSAGE (*IN VITRO* ET *EX VIVO*) DE L'HEPARINE AU SEIN DE SYSTEMES D'ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE.

Auteur	Système : Héparine [Promoteur]	Modèle	Milieu utilisé pour l'étude	Dose héparine [Dose de promoteur]	P_{app}. 10^{-7} (cm/s) *Papp témoin*	ER (adim.)	Activité cumulée	Mécanisme de passage supposé	Toxicité
Motlekar N.A., 2006	Ardeparine [Acide Glycyrrhétinique]	Chambre de Ussing Estomac et intestin de rat	NR	2 400 U a-Xa/kg [50 µg/kg]	7 (3h, duodenum) 5	NR	NR	Absorption au niveau du duodénum	-
		Caco-2 (0,2.10^4 c/puits) TEER > 500 Ω.cm^2	Milieu tampon	0,045 µCi [0,02%]	20,39 ± 2,83 *2,83 ± 0,62*	7,2 -	NR	Effet TA + ouverture des JS	Cytotox. à 6h. pour des C° > 0,25%
Motlekar N.A. 2005	Ardeparine [Caprate de Na]	Chambre de Ussing Estomac et intestin de rat	NR	2 400 U a-Xa/kg [6%]	7-9 (3h) 5	NR	NR	Absorption au niveau de toutes les parties de l'intestin	-
		Caco-2 (0,2.10^4 c/puits) TEER > 500 Ω.cm^2	Milieu tampon	0,045 µCi [0,25%]	20,8 ± 2,4 *2,83 ± 0,62*	7,34 -	NR	Ouverture des JS	Cytotox. à 6h. pour des C° > 0,25%
Motlekar N.A. 2006	Ardeparine [Peptide AT 1002]	Chambre de Ussing Estomac et intestin de rat	NR	1200 UI/kg [200 µg/kg]	7 (3h, iléon) *5*	NR	NR	Absorption au niveau de l'iléon	-
		Caco-2 (0,2.10^4 c/puits) TEER > 500 Ω.cm^2	PBS	0,045 µCi [0,0250%]	5,9 ± 0,6 *2,8 ±0,6*	2,1 -	NR	Ouverture des JS réversible	Non observée
Motlekar N.A. 2006	Ardeparine [L-arginine]	Chambre de Ussing Estomac et intestin de rat	Milieu tampon	2400 U a-Xa/kg [250 mg/kg]	10 (3h, côlon) *5*	NR	NR	Absorption au niveau du jéjunum et du côlon	-
		Caco-2 (0,2.10^4 c/puits) TEER > 500 Ω.cm^2	PBS	0,045 µCi [2 %]	8,49 ± 1,25 *2,83 ±0,62*	3,0 -	NR	Ouverture des JS médiée par le NO	Cytotox. à 6h. pour des C° > 7%
Thanou M. 2007	Reviparine [SNOCC]	Caco-2 (1.10^4 c/cm^2) 21-23 j	HBSS-HEPES	1% (m/v) [3% (m/v)]	0,063 ± 0,016 *Non détectable*	NR	NR (non calculable)	Ouverture des JS réversible	NR
Thanou M. 2001	Opocrin [MCC]	Caco-2 (1.10^4 c/cm^2) 23-25 j., TEER ∈ [1000-1200 Ω.cm^2]	DMEM-HEPES	1% (m/v) [3% (m/v)]	0,020 ± 0,002 *0,0002 ±0,00006*	88	NR	Ouverture des JS réversible	NR
Kast 2003	HBPM [Thiomère]	Ch. de Ussing Duodénum de cochon d'inde	Milieu salin tamponné	465 UI/mL [0,5 % w/v]	3,9 ± 0,2 *1,8 ±0,1*	2,2	1,25 U anti-Xa/mL (3h) 0,5 U a-Xa (3h)	Ouverture des JS réversible	NR
Brayden 1997	Héparine sodique [SNAC]	Caco-2 (0,5.10^6 c/puit) 20-30 j., TEER ∈ [250-500 Ω.cm^2]	HBSS/glucose/HEPES	500 et 1000 UI/mL NR	NR	NR	NR	Passage transcellulaire passif des complexes héparine-SNAC	Toxicité si concentration > 25 mg/mL
		Boucle intestinale fermée Iléon et côlon de rat	NR	1400 UI/kg [35 mg/kg + 25% PG]	NR	NR	NR		Pas de nécrose tissulaire
Malkov D., 2002	Héparine sodique [SNAC]	Caco-2 (NR) 21-28 j., TEER ∈ [300-400 Ω.cm^2]	HBSS	5 mg/mL [66 mM]	NR	NR	170 ng/mL (0,5h)	Présence d'héparine dans le cytoplasme : transport transcellulaire Pas de rupture des JS	Toxicité pour dose de SNAC >100 mM
Grabovac 2007	HBPM, 105 UI/mg [Papaïne]	Chambre de Ussing Duodénum de rat	HBSS	50 U a-Xa/mL [0,48 mg/mL]	62 ± 6 *8 ±2*	7,9	1,81 U a-Xa/mL (150 min.) 0,228 U a-Xa/mL (150 min.)	Agent mucolytique Ouverture des JS	NR
Grabovac 2006	HBPM, 105 UI/mg [Bromélaïne]	Chambre de Ussing Duodénum de rat	Milieu salin tamponné	10 U a-Xa/mL [0,7 mg/mL]	170 ± 30 *40 ±15*	4,5	1,81 U a-Xa/mL (150 min.) 0,228 U a-Xa/mL (150 min.)	Agent mucolytique Ouverture des JS	Faible
		Caco-2 (?) 21 j., TEER ∈ [800-900] Ω.cm^2	Milieu salin tamponné	5 U a-Xa/mL [2,25 FIP/mL]	45 ± 0,9 *6 ±0,7*	6,7	1,0 U a-Xa(150 min.) 0,2 u a-Xa/mL (150 min.)		
Kim S.K. 2007	Nadroparine [Conjugué DOCA-HBPM + DMSO (10%)]	Caco-2 (3.10^5 c/mL) TEER > 400 Ω.cm^2	Tampon HBSS / HEPES / glucose	8,6 U a-Xa/mL [0,5 mg/mL de conjugué]	42,3 ± 4,6 (2h) *> 3 (2h)*	NR	NR	Passage transcellulaire passif. Gradient de concentration augmenté par liaison sans translocation du complexe au recepteur des acides biliaires	NR

NR : non renseigné
JS : jonctions serrées
Ch. De Usssing : chambre de Ussing
HEPES : acide [(hydroxyéthyl-2)-4-piperazinyl-1]- éthanesulfonique
HBSS : hanks balanced salt solution
HBPM : héparine de bas poids moléculaire
DMSO : diméthyl sulfoxide
ER (enhanced Ratio) : augmentation de la perméabilité en présence du promoteur

TRAVAIL EXPERIMENTAL

PUBLICATION I

ENCAPSULATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARINS:

INFLUENCE ON THE ANTI-Xa/ANTI-IIa RATIO.

L. Javot, T. Lecompte, M. Rabiskova, P. Maincent

Publié dans Journal of Controlled Release (2009) 139, 8-14.

Cet article concerne l'évaluation des activités anti-Xa et anti-IIa, ainsi que la détermination du ratio d'activité anti-Xa/anti-IIa de deux héparines de bas poids moléculaire (HBPM), la nadroparine et la tinzaparine, après i) leur encapsulation dans des microparticules polymériques et ii) une étape de dissolution *in vitro*.

Les microparticules polymériques ont été réalisées par la méthode de la double émulsion à partir d'un polymère acrylique polycationique non biodégradable (Eudragit®RS), seul ou en mélange avec un polyester aliphatique biodégradable (PLGA) à différents ratios (25 : 75, 50 : 50 et 75 : 25). Une caractérisation *in vitro* de chaque formulation a été menée : mesure de la taille des particules, détermination du taux d'encapsulation et des profils de libération évalués par une méthode chimique et par une méthode biologique.

Les microparticules chargées en HBPM présentent une taille comprise entre 43 et 98 µm.

Le dosage par méthode chimique témoigne uniquement de la présence de chaines glycosaminoglycanes. Les taux d'encapsulation, évalués par cette méthode, varient de 62 à 87% pour la nadroparine et de 22 à 74% pour la tinzaparine. Les différentes formulations de tinzaparine présentent des profils de libération très similaires et permettent la libération en 24 heures d'environ 6 000 unités/g de polymère. En revanche, les profils de libération obtenus avec les microparticules de nadroparine sont très dépendants de la composition en polymère : plus la quantité de PLGA est importante plus la libération est élevée. Les valeurs s'échelonnent ainsi entre 5 000 et 11 000 unités/g de polymère libérées à 24 heures.

La méthode biologique repose sur le dosage des activités anti-Xa et anti-IIa permettant ainsi la détermination du rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa, caractéristique des héparines. Ce rapport représente également la proportion relative de chaines courtes actives par rapport à la proportion de chaines longues actives. La notion de chaines courtes et longues est définie par la longueur critique de 18 sucres (correspondant à environ 5 000 Da) : les chaines courtes ont toutes une longueur de moins de 18 sucres (chaines BCL, c'est-à-dire Below the critical Chain Length) alors que les chaines longues (chaines ACL, c'est-à-dire Above the critical Chain Length) ont toutes une longueur supérieure à 18 sucres.

Suite à l'étape de fabrication, et indépendamment de l'HBPM testée et du ratio de polymère utilisé, le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa encapsulé au sein des microparticules diminue légèrement par comparaison avec le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa de la solution commerciale d'héparine, utilisée comme référence. En effet, le rapport anti-Xa/anti-IIa de la

solution commerciale de tinzaparine est de 1,80 alors que celui présent au sein des formulations est compris entre 1,20 et 1,69. De même pour la nadroparine, le rapport anti-Xa/anti-IIa de la solution commerciale est de 3,50 alors que ceux des formulations s'échelonnent entre 2,94 et 3,25. Il a ainsi été montré que les chaines ACL sont légèrement mieux encapsulées que les chaines BCL.

En revanche, lors de l'étape de dissolution *in vitro*, une augmentation importante du rapport anti-Xa/anti-IIa s'observe pour toutes les formulations ce qui signifie que les chaines BCL sont plus facilement libérées des microparticules que les chaines ACL.

Cependant, en fonction de l'HBPM utilisée, deux comportements apparaissent. Dans le cas de la tinzaparine, le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa libéré est indépendant de la composition en polymère (il varie entre 2,99 et 4,30) alors que dans le cas de la nadroparine, une forte corrélation entre quantité d'Eudragit® RS et valeur du rapport est observée : plus la quantité d'Eudragit® RS augmente et plus le rapport est élevé. Ainsi dans le cas de la formulation ERS 100% de nadroparine il atteint à 24 heures une valeur de 44,38 alors qu'il n'est que de 4,00 dans le cas de la formulation PLGA S 75% / ERS 25%. Cela montre que dans le cas de la nadroparine, des interactions relativement fortes sont développées entre les chaines ACL et l'Eudragit® RS, limitant ainsi fortement leur libération. Même si ces interactions existent probablement aussi dans le cas de la tinzaparine, la différence de composition en terme de distribution de chaines entre ces deux HBPM ainsi que l'existence de sucres terminaux différents, permettent d'expliquer en partie les différences observées.

PUBLICATION I

ENCAPSULATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARINS:

INFLUENCE OF THE ANTI-Xa/ANTI-IIa RATIO

Abstract

Tinzaparin and nadroparin, two Low Molecular Weight Heparins (LMWH), were encapsulated within microparticles by the double emulsion method using ammonium methacrylate copolymer (Eudragit® RS) alone or mixed with poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) at different ratios.

The resulting microparticles were characterized *in vitro* according to particle size, encapsulation rate and release profiles both by chemical and biological methods. The biological method was based on the measurement of the anti-Xa/anti-IIa ratio typical of each LMWH. This ratio also reflects the relative proportion between active chains below and above the critical chain length of 5 000 Da (i.e. BCL and ACL chains), since LMWH are mixtures of chains with various lengths and activities.

For both LMWH, high entrapment efficiencies, expressed as anti-Xa and anti-IIa activities, were obtained and amounted to anti-Xa/anti-IIa ratios close to the commercial ratio. During the *in vitro* release, whatever the formulation, more BCL chains were released than ACL chains: a higher (compared to commercial ratio) and stable anti-Xa/anti-IIa ratio was observed. This increase of the anti-Xa/anti-IIa ratio was influenced by the type of LMWH used and the composition of the Eudragit® RS formulation. This type of microparticles could constitute a new pharmaceutical form of LMWH with a higher anti-Xa/anti-IIa ratio than commercial forms.

Keywords

LMWH, microparticles, anti-Xa/anti-IIa ratio.

1. Introduction

Low molecular weight heparins (LMWH) are the gold standard for anticoagulants used in the prevention and treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism [1]. For many years, LMWH have overtaken unfractionated heparin (UFH) in many countries due to the simplicity of using them and their lower overall cost [2]. Indeed, the pharmacodynamic effect of LMWH is easier to predict, they have excellent bioavailability after s.c. administration and carry a lower risk of heparin-induced thrombocytopenia [3-5]. Unfortunately, they have to be administered parenterally, which is a disadvantage especially during long-term outpatient therapy (pregnancy, cancer). Oral dosage forms would be a major improvement, since this is most convenient and physiological route. Despite the strong negative charge and high molecular weight of LMWH which are obstacles to their oral absorption, researchers have tried for many years to develop oral formulations of these macromolecules.

An interesting option was the use of absorption enhancers like sodium N-[8(-2-hydroxybenzoyl)amino]decanoate (SNAD), designed specifically to facilitate the intestinal absorption of LMWH, and sodium N-[8(-2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate (SNAC) designed for UFH. Indeed the bioavailability of an oral administration of UFH combined with SNAC in healthy human subjects was 2.19% [6].

Other permeation enhancers were also tested *in vivo* on animal models by oral route using liquid or solid dosage forms. The most recent used properties of thiolated polycarbophil [7] surfactant agent as Labrasol® [8], derivates of chitosan [9], mucolytic agent as papain [10] and polycationic liphophilic-core dendrons [11].

After tablets administration in rats, the best results in terms of relative anti-Xa bioavailability were 19.9% and 9.1% for thiolated polymers[12] and papain [10] at the dose of 279 anti-Xa units/per animal and 210 anti-Xa units/per animal, respectively. Absolute bioavailability of 18.8% was also obtained using Labrasol® [8] in so-called “oral solid heparin” after direct administration of 200 anti-Xa U/kg in the jejunum of rats. After such direct injection in intestine of rats with a solution containing polyanionic derivate of chitosan and 5 000 anti-Xa U/kg of LMWH, sustained LMWH levels till 360 minutes (between 0.2 to 0.4 anti-Xa U/mL) were obtained [9]. On the other hand, co-administration by gavage of polycationic lipophilic-core dendrons and LMWH at the dose of 7 500 IU/kg led to anti-Xa activity over 0.2 IU/mL during only twenty minutes [11].

Another strategy, based on the synthesis of new heparin derivatives by coupling LMWH with deoxycholic acid (DOCA) was also tested. After oral administration of LMWH-DOCA in dimethyl sulfoxide to mice, the bioavailability was 17.6 % [13].

We have developed multiparticulate forms based on a mixture of a biodegradable polymer and a non biodegradable polycationic polymer. We have obtained mean absolute bioavailabilities of 59 % and 48 % with nanoparticles of LMWH [14] and microparticles of UFH [15], respectively. One of the main advantages of the multiparticular system is that the administered doses are lower than those of the other systems and the corresponding bioavailabilities are higher.

Our previous results with LMWH are very promising but were solely based on the activated partial thromboplastin time (aPTT) or the anti-Xa bioavailability. Results of the other research teams were also quantified with the same assays. As a clotting assay, aPTT is known to depend on the anti-IIa activity and is not very sensitive to anti-Xa activity. Since LMWH have predominantly anti-Xa activity, the anti-Xa assay is widely used to measure LMWH activity in plasma. However, it has been shown that LMWH tested *in vitro* at doses defined by anti-Xa-activity showed variable inhibitory effects on thrombin generation, mainly due to their different anti-IIa activity [4, 16]. So, it is obvious that the anti-Xa activity is not a sufficient criterion for the *in vitro* or *in vivo* activity of LMWH and that there is a clear need to measure both the anti-IIa and the anti-Xa activity for each sample. One simple way to express this is the anti-Xa/anti-IIa ratio, which is systematically used to define the biological activity of commercial heparins. This ratio clearly reflects the proper biochemical and pharmacodynamic properties of each LMWH arising from its specific composition [3].

Indeed, heparins are glycosaminoglycan macromolecules composed of a mixture of different chains lengths: their composition is very heterogeneous [17]. They act by binding to antithrombin, a natural inhibitor of the coagulation cascade. The capacity of heparin to bind and catalyze the antithrombin (AT) action is selectively supported by a specific pentasaccharidic structure, present only in a third of the total population chains [18, 19].
Heparin chains having the pentasaccharidic sequence are all able to inhibit factor Xa and all chains Above the Critical chain Length of 5 000 Da (ACL chains [17]) are also able to inhibit factor IIa [17, 20-22].

It has to be noted that the value of this ratio is by convention 1 for each UFH. Indeed, UFH are made exclusively of ACL chains: consequently, each one has the capacity to catalyze the inhibition, mediated by antithrombin, of factor IIa and factor Xa as well. For the LMWH, the values of the anti-Xa/anti-IIa activity ratio are between 1.6 and 9.7 [20]. This means that the anti-Xa activity for the LMWH is 1.6 to 9.7 times more important that the anti-IIa activity. The increase of this ratio (compared to UFH ratio) is related to the presence of chains Below the Critical chains Length of 5 000 Da (BCL chains [17]) in LMWH which exclusively support an anti-Xa activity. Furthermore, it has to be noticed that the higher the anti-Xa/anti-IIa ratio, the higher the relative proportion of BCL chains compared to ACL chains.

In this experimental work, we have chosen to use two different LMWH: one with a low anti-Xa/anti-IIa ratio (1.8), i.e. tinzaparin, and the other one with a high anti-Xa/anti-IIa ratio (3.5), i.e. nadroparin. As a result of its smaller ratio, tinzaparin contains almost twice ACL chains providing anti-IIa activity than nadroparin. So, despite the quite similar mean molecular weights of these two LMWH, the chain length distribution is different [23, 24]. When LMWH is incorporated into microparticles, it is possible that the BCL and ACL chains are not encapsulated and released in equal proportions due to their different physicochemical properties, such as size and overall charge, leading to a modified anti-Xa/anti-IIa ratio. In order to characterize our system accurately before embarking on *in vivo* pharmacokinetic studies, we evaluated the evolution of this ratio after both the final manufacturing step and during release *in vitro*: any increase or decrease in the anti-Xa/anti-IIa ratio is related to an increase or a decrease of relative proportion of BCL chains compared to ACL chains. A non biodegradable polycationic polymer (ammonium methacrylate copolymer) used alone or mixed with a biodegradable polymer (capped or uncapped PLGA) at different ratios was selected for the microparticle preparation in order to determine whether one of these ratios favors i) the encapsulation of the anti-Xa or anti-IIa activity of heparin; ii) the release of anti-Xa or anti-IIa activity.

2. Material and methods

2.1. Materials

Two commercially available LMWH were used: sodium tinzaparin (50 anti-IIa U/mg, 90 anti-Xa U/mg, anti-Xa/anti-IIa ratio 1.8) and calcium nadroparin (32.1 anti-IIa U /mg, 112.5 anti-Xa U/mg, anti-Xa/anti-IIa ratio 3.5) marketed by Leo Laboratory (Innohep®, Saint

Quentin en Yvelines, France) and GlaxoSmithKline (Fraxodi®, Marly-le-Roi), respectively. Uncapped poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) 50/50 (Resomer® RG 504 H, MW 52 500 g.mol^{-1}) and end-capped poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) 50/50 (Resomer® RS 504 S, MW 52 500 g.mol^{-1}) were gifts from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Ammonium methacrylate copolymer (Eudragit® RS PO, MW 150 000 g.mol^{-1}) was generously supplied by Evonik Röhm GmbH (Darmstadt, Germany). Polyvinylalcohol (PVA, MW 30 000 g.mol^{-1}, 88% hydrolyzed) was provided by Sigma-Aldrich (Stenheim, Germany). The Stachrom® heparin kit used for the measurement of the anti-Xa activity was supplied by Diagnostica Stago (Asnière, France). The reagents for the measurement of the anti-IIa activity were provided by Instrumentation Laboratory (Lexington, USA) for 25 IU antithrombin and substrate S-2238 and by Hyphen BioMed (Neuville sur Oise, France) for 21 NIH bovine thrombin. All other chemical reagents were of analytical grade and used as supplied.

2.2. Methods

2.2.1. Polymeric microparticles preparation

The polymeric microparticles were prepared using a non biodegradable but positively charged polymethacrylate (Eudragit® RS or ERS) alone or mixed with a biodegradable polymer [(poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) 50/50, either uncapped, i.e. PLGA 504 H or poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) 50/50 or end-capped, i.e. PLGA 504 S)] at various ratios 75/25, 50/50, 25/75. The preparation of microparticles was carried out by the double emulsion (water-in-oil-in-water) and extraction method routinely used for manufacturing microparticles in our laboratory. Briefly, 1 mL of an aqueous LMWH solution (5000 anti-Xa U/mL) was first emulsified by sonication (15 s) in ethyl acetate (5 mL) containing the mixture of polymers (0.250 g). The resulting water-in-oil emulsion was poured into 400 mL of an aqueous solution of PVA (0.1%). A water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion was formed by extensive stirring with a three-bladed propeller for 1h at room temperature until the organic solvent was extracted. Upon solvent extraction, the polymers precipitated and the microparticle cores solidified. Microparticles were then collected by filtration, washed extensively with deionized water and dried at room temperature. An aliquot of the external phase was collected in order to determine the entrapment efficiency by an indirect method. Drug-free microparticles were prepared in the same way.

2.2.2. Particle mean diameter

The mean diameter of microparticles was evaluated with a Malvern Mastersizer (Mastersizer X, Malvern Instrument, UK) using laser light diffraction. Microparticles were resuspended in Tween® 80 (1%, w/v) for1h in an ultrasonic bath. Each sample was measured in triplicate.

2.2.3. *In vitro* drug release

LMWH-loaded microparticles (50 mg) were suspended in 20 mL of phosphate buffer saline (KH_2PO_4 4.4 mM, Na_2HPO_4 45.1 mM, NaCl 105.8 mM, pH 7.4) in a flask incubated under gentle magnetic stirring (200 rpm) in a water bath at 37 ºC. At various time intervals, 1.5 mL samples were withdrawn, filtered on a 0.22 µm Millipore filter and replaced by 1.5 mL fresh buffer. The same type of experiment was performed with unloaded microparticles that were stirred for 24 hours in the dissolution medium. After 24 hours, the total volume (20 mL), filtered on 0.22 µm filters, was used for performing the LMWH anti-Xa and anti-IIa activity calibration curve.

2.2.4. Determination of drug entrapment efficiency and *in vitro* drug release

2.2.4.1. Turbidimetric assay

The amount of LMWH entrapped and released from microparticles was determined by a turbidimetric method [25]. Turbidimetric assay is based on the quantitative precipitation reaction of stoechiometry (1:1) occurring between both sulfate and carboxyl groups of heparin at pH 6.8 and the amine groups of cetylpyridinium chloride [26]. All experiments were performed in triplicate.

Five hundred µL aliquots of each sample were reacted at 37ºC for 1 hour with 500 µL of acetate buffer (1M, pH 5), followed by the addition of 2 mL of cetylpyridinium chloride (2.9 mM) in NaCl aqueous solution (168.8 mM) and were assayed by spectophotometry at 500 nm, in duplicate (Uvikon 922, Kontron, Eching, Germany). The drug entrapment efficiency was expressed as the percentage of LMWH entrapped with respect to the theoretical value, whereas the drug loading and the *in vitro* drug release was presented as the amount of LMWH (U) entrapped per g of polymer.

2.2.4.2. Biological assay

The *in vitro* activities of LMWH entrapped and released from microparticles were also measured by biological methods [27] with determination of i) the anti-factor Xa activity with a chromogenic substrate (CH_3SO_2-D-Leu-Gly-Arg-pNA.AcOH) and ii) the anti-factor IIa activity with another chromogenic substrate (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl). Each experiment was performed automatically (STA Compact Automate, Diagnostica Stago, France), in triplicate.

- **Anti-Xa activity**

LMWH standards and samples (25 µL) were incubated in presence of antithrombin (50 µL) with an excess of factor Xa (100 µL), during 90s at 37°C. Thus, an AT-heparin-factor Xa complex is formed and the remaining free Xa catalyzes the release of p-nitroaniline (pNA) from the chromogenic substrate (100 µL). The absorbance was determined at 405 nm every 2 s for 10 to 30 s of incubation.
LMWH assay was performed using a standard calibration curve in the PBS filtrate (obtained after dissolution of unloaded microparticles and filtration on 0.22 µm filters) in the range of 0.1-0.7 anti-Xa U/mL and 0.1-0.6 anti-Xa U/mL, for tinzaparin (R = - 0.999) and nadroparin (R = -0.998), respectively.

- **Anti-IIa activity**

LMWH standards and samples (55 µL) were incubated in presence of antithrombin (100 µL) with an excess of factor IIa (25 µL) during 60s at 37°C. An AT-heparin-factor IIa complex is formed and the remaining free IIa catalyzes the release of p-nitroaniline (pNA) from the chromogenic substrate (100 µL). The absorbance was determined at 405 nm every 2 s for 10 to 60 s of incubation.
Analysis of LMWH was performed using a standard calibration curve in the PBS filtrate (obtained after dissolution of unloaded microparticles and filtration on 0.22 µm filters) in the range of 0.1-0.7 anti-Xa U/mL and 0.1-0.7 anti-Xa U/mL, for tinzaparin (R = -0.997) and nadroparin (R = -0.998), respectively.

- **Expression of results**

The anti-Xa (or anti-IIa) entrapment efficiency was expressed as the percentage of anti-Xa (or anti-IIa) units entrapped with respect to the theoretical value, whereas the anti-Xa (or anti-IIa)

drug loading was presented as the amount of anti-Xa (or anti-IIa) units entrapped per g of polymer.

In order to get an insight on potential changes in the proportion chain lengths below and above the critical chain length, we calculated the anti-Xa/anti-IIa ratios. The drug loading ratio corresponded to the entrapped anti-Xa units divided by the entrapped anti-IIa units. The released ratio was expressed as anti-Xa units released per gram of polymer divided by anti-IIa units released per gram of polymer.

2.2.5. Statistical treatment of experimental results

The Mann-Whitney test was applied to the results of both *in vitro* release and anti-Xa/anti-IIa ratios. In all cases, a probability value of less than 0.05 was considered to be significant.

3. Results and discussion

The selection of the optimal microencapsulation technique for a drug depends strongly on its physicochemical properties. For the entrapment of highly water-soluble molecules such as LMWH, double emulsion (water/oil/water) followed by a solvent extraction has been established as the best technique for many years [15, 28]. Under controlled conditions, two successful emulsification steps determine the size of the droplets in the polymeric organic phase and consequently the size of the particles formed during the solvent extraction step. The addition of surface-active agents and the mechanical stirring rate are the most important conditions [29, 30]. The use of components with surfactant properties such as PVA or Eudragit® RS [31] is appropriate because they help to stabilize the emulsion and to avoids particle coalescence. Vigorous mechanical stirring reduces the particle size, but carries the disadvantage of possible shear-induced cleavage of the heparin chains.

This technique was successfully applied in our laboratory to a mixture of Eudragit® RS and uncapped PLGA i.e. “PLGA H”. With the aim of comparing encapsulation and release with a less degradation-sensitive PLGA, another kind of PLGA, i.e. end-capped PLGA (“PLGA S”), was tested. According to the supplier, the two types of PLGA have similar viscosity and molecular weight. The only difference between them is that the end-capped PLGA is substituted by an alkyl group on its acidic terminal. Thus, the ester group leads to slower degradation of PLGA S compared with PLGA H.

3.1. Particle size and shape

It can be observed (Table 1) that the microparticles without heparin were generally smaller than the particles containing the drug. In fact, the mean diameter of heparin-loaded microparticles varied from 43 to 98 µm, whereas the one of empty microparticles were in the interval 17-63 µm. The surface-active properties of Eudragit® RS are responsible for the small size of empty microparticles [31]. Indeed, in case of loaded microparticles, the electrostatic interactions between the positively charged Eudragit® RS and LMWH decreased the surfactant properties of Eudragit® RS, leading to a formation of larger microparticles, regardless of the polymer ratio. Thus smaller blank particles were obtained in the case of the ERS 100%, PLGA 25% / ERS 75%, and PLGA 50% / ERS 50% ratio. However, it should be noted that the diameters of loaded and unloaded microparticles of PLGA H 75% / ERS 25% were quite similar, probably due to the insufficient amount of Eudragit® RS which could not exhibit its surfactant properties. Microparticles formed from 100% PLGA H or PLGA S microparticles were attempted but could not be formed; the preparation resulted in polymeric threads. Particle shape was observed under an optical microscope (Olympus IX 50, Olympus France S.A.S, France). It was noticed that the shape of microparticles consisting of at least 50% of Eudragit RS® was more regular and spherical than that of microparticles formed from PLGA 75% / ERS 25% polymer ratio which showed irregular shape and significant amount of polymer fragments at their surface.

Table 1: Physicochemical Properties of Heparin-Loaded Microparticles. Data are means ± SD, n=3.

		Empty Microparticles	Nadroparin-Loaded Microparticles			Tinzaparin-Loaded Microparticles		
PLGA type	Polymer-to-polymer ratio	Mean diameter (µm)	EE (%)	Drug loading (U/g of polymer)	Mean diameter (µm)	EE (%)	Drug loading (U/g of polymer)	Mean diameter (µm)
	ERS 100%	27± 3	85 ± 2	17,056 ± 433	53 ± 18	72 ± 4	14,301 ± 900	49 ± 2
PLGA S	PLGA S 25% / ERS 75%	17 ± 3	85 ± 4	16,930 ± 846	43 ± 5	74 ± 4	14,870 ± 731	54 ± 6
	PLGA S 50% / ERS 50%	50 ± 7	84 ± 4	16,718 ± 759	94 ± 15	57 ± 5	11,473 ± 1,020	98 ± 3
	PLGA S 75% / ERS 25 %	36 ± 8	62 ± 9	12,396 ± 1,768	89 ± 19	22 ± 5	4,335 ± 926	58 ± 6
PLGA H	PLGA H 25% / ERS 75%	22 ± 6	87 ± 1	17,400 ± 241	62 ± 38	70 ± 2	13,861 ± 316	57 ± 6
	PLGA H 50% / ERS 50%	19 ± 10	86 ± 2	17,114 ± 485	58 ± 14	70 ± 1	13,968 ± 205	69 ± 2
	PLGA H 75% / ERS 25 %	64 ± 23	69 ± 4	13,802 ± 748	61 ± 28	39 ± 3	7,846 ± 519	49 ± 2

EE-entrapment efficiency

3.2. Entrapment efficiency

It has to be kept in mind that the turbidimetric assay does not measure the biological activity but the presence of polysaccharide chains whether they are active or not.

Entrapment efficiency of LMWH-loaded microparticles prepared with Eudragit® RS alone or in combination with PLGA (Table 1) ranged from 62% to 87% for nadroparin and from 22% to 74% for tinzaparin. These encapsulation efficiencies were satisfactory. Indeed, since heparins are water-soluble compounds, they have a tendency to leak into the aqueous external phase during the drug entrapment step before polymer precipitation, which usually decreases the entrapment efficiency. However, in the double emulsion method using ethyl acetate as the extraction solvent, the extraction step is nearly instantaneous as a result of the high solubility of ethyl acetate in water (about 10% v/v). So, during the second emulsion, ethyl acetate was easily and quickly dissolved in the aqueous external phase, causing fast polymer precipitation and rapid formation of solid microparticles, avoiding a large leakage of LMWH.

Furthermore, two parameters appeared to have an effect on the entrapment efficiency: the nature of LMWH and the polymer ratio of the formulation.

Indeed, it should be noted that the nadroparin entrapment efficiency was higher than that of tinzaparin in all formulations. The different compositions of tinzaparin and nadroparin, i.e. the different chain length distribution [23, 24], may explain these results.

For any one LMWH, the entrapment efficiency values were highest when positively charged polymethacrylates were used in higher proportions, i.e. at least 50% in the formulation. Entrapment efficiencies of these formulations were 84 – 87 % and 57 – 74 % for nadroparin and tinzaparin, respectively. The use of the PLGA 75% / ERS 25% polymer mixture led to lower entrapment efficiency, especially for tinzaparin that decreased from 72% (ERS 100%) to 39 % (PLGA H 75% / ERS 25%) and even to 22 % (PLGA S 75% / ERS 25%). These observations can be explained by the physicochemical properties of the polymers. On one hand, in formulations containing more than 50% of Eudragit® RS, polycationic groups of Eudragit RS® can interact with the anionic chains of heparins. Consequently, a much less migration of the entrapped drug into the external aqueous phase occurred before the polymer precipitation. On the other hand, in the PLGA 75% / ERS 25% formulation, the main component was PLGA, a non charged hydrophobic polymer. Thus charged hydrophilic chains of heparin tended to migrate more rapidly towards the external aqueous phase before polymer

precipitation. Furthermore, there was less Eudragit RS® available to interact with heparin chains.

Finally, it must be noted that the nature of the PLGA (uncapped or end-capped) did not seem to have a significant influence on the encapsulation rate (87% ± 1% for PLGA H and 85% ± 4% for PLGA S in nadroparin PLGA 25% / ERS 75% formulations).

3.3. *In vitro* LMWH release profiles

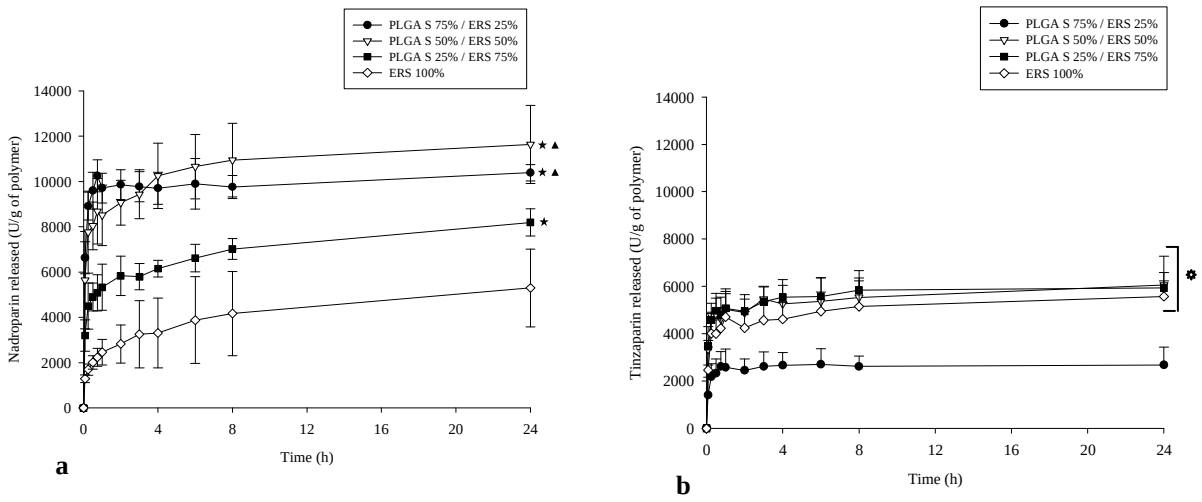
Release profiles of nadroparin and tinzaparin from microparticles are shown in Figure 1. Since similar results were obtained for both PLGA types, only results with PLGA S are presented.

For all heparin formulations, the release profiles could be divided in two phases: an initial burst followed by a plateau. However, the curves had different forms depending on the LMWH used: for tinzaparin, a large and rapid burst was observed during the first half-hour and was followed by a plateau leading to an incomplete release at 24h. For nadroparin, the total amount released at 24 hours was higher (12,637 U/g of polymer, PLGA S 50% / ERS 50% formulation) than that of tinzaparin (6,057 U/g of polymer, PLGA S 50% / ERS 50% formulation) except for the ERS 100% formulations which yielded the same values (5,299 ± 1,714 U/g of polymer and 5,577 ± 653 U/g of polymer for nadroparin and tinzaparin, respectively). In addition, the release of nadroparin was slower and more sustained than that of tinzaparin. From these observations, it was deduced that some heparin chains were partly adsorbed on the surface of microparticles, leading to easy desorption and explaining the burst effect. On the other hand, other chains interacted strongly with Eudragit® RS, leading to their incomplete release. The relative proportion of the chains at the surface or bound to Eudragit® RS may be the reason for the observed differences in the release profiles.

Moreover, the release of both types of LMWH depended on the composition of the formulation. The amount of Eudragit® RS influenced the nadroparin release whereas tinzaparin release was not statistically different regardless of the amount of Eudragit® RS (except for PLGA S 75% / ERS 25% microparticles). The low amount of drug released from the latter formulation can be explained by the difference of entrapment efficiency. Indeed, entrapment efficiency values were very similar for formulations with a high amount of Eudragit® RS (72 ± 4 %, 74 ± 4 % and 57 ± 5% in ERS 100%, PLGA S 25 % / ERS 75% and PLGA S 50% / ERS 50%, respectively) compared to the low value of PLGA S 75 % / ERS 25

% formulation (22 ± 5 %). This different behavior could be explained by the different composition of the two LMWH. Tinzaparin contains a larger proportion of ACL chains [23, 24] that were able to interact strongly with Eudragit® RS, compared to nadroparin. These interactions led to an incomplete release whereas the weaker interactions between Eudragit® RS and nadroparin were easily disrupted and allowed sustained release.

Fig. 1. *In vitro* release profiles of (a) nadroparin and (b) tinzaparin from microparticles. Microparticles were prepared with a non biodegradable polymer ERS alone or mixed with biodegradable polymer PLGA S: PLGA S 25% / ERS 75%; PLGA S 50% / ERS 50%; PLGA S 75% / ERS 25%. Experiments were performed in phosphate buffer at 37°C and pH 7.4. Data are means ± SD (n = 3).



▲ Statistically different at all times from PLGA S 25% / ERS 75% at $P < 0.05$.

✿ Statistically different at all times from PLGA S 75% / ERS 25% at $P < 0.05$.

⋆ Statistically different at all times from ERS 100% at $P < 0.05$.

3.4. Change in the anti-Xa/anti-IIa drug loading ratio after encapsulation

For each formulation, the encapsulation efficiency and the drug loading in terms of anti-Xa and anti-IIa activities were calculated. For easier comparison, these results and the corresponding anti-Xa/anti-IIa ratios are presented in Table 2.

During the formulation step, 5 000 anti-Xa units of LMWH were systematically used for a total amount of 250 mg of polymer, thus the maximal anti-Xa drug loading expected was 20 000 anti-Xa units per gram of polymer. However, although the maximal anti-Xa drug loading was the same for the two heparins, the maximal anti-IIa drug loading would be different, depending on the anti-Xa/anti-IIa ratio. For instance, the number of anti-IIa units introduced during manufacturing was 20,000/3.5 ≈ 5,714 and 20,000/1.8 ≈ 11,111 for nadroparin microparticles and tinzaparin microparticles respectively. Thus, as shown in Table 2, nadroparin entrapment efficiency of 94 % (PLGA S 50 % / ERS 50 % formulation) corresponded to a drug loading of 5,503 anti-IIa units whereas the same entrapment efficiency for tinzaparin (94 %; ERS 100 % formulation) corresponded to a drug loading of 10,455 anti-IIa units.

The results shown in Table 2 indicate that the anti-Xa/anti-IIa activity ratio of both LMWH decreased after encapsulation compared to the commercial values.

Table 2: Effects of encapsulation on anti-Xa/anti-IIa ratio, anti-Xa and anti-IIa activities for microparticles of nadroparin and tinzaparin. Data are means ± SD (n = 3).

		Nadroparin					Tinzaparin				
PLGA type	Polymer-to-polymer ratio	Anti-Xa/anti-IIa ratio	Anti-Xa activity		Anti-IIa activity		Anti-Xa/anti-IIa ratio	Anti-Xa activity		Anti-IIa activity	
			EE (%)	Drug loading (anti-Xa U/g of polymer)	EE (%)	Drug loading (anti-IIa U/g of polymer)		EE (%)	Drug loading (anti-Xa U/g of polymer)	EE (%)	Drug loading (anti-IIa U/g of polymer)
	Commercial dosage form*	3.50	-	-	-	-	1.80	-	-	-	-
	ERS 100%	3.20 ± 0.07	90 ± 2	18,052 ± 395	99 ± 0	5,633 ± 12	1.69 ± 0.06	88 ± 3	17, 635 ± 534	94 ± 0	10,455 ± 37
PLGA S	PLGA S 25% / ERS 75%	3.13 ± 0.08	87 ± 3	17,377 ± 683	97 ± 1	5,551 ± 70	1.61± 0.04	83 ± 4	16,576 ± 804	92 ± 2	10,260 ± 242
	PLGA S 50% / ERS 50%	3.02 ± 0.16	83 ± 3	16,572 ± 688	94 ± 2	5,503 ± 253	1.51 ± 0.04	72 ± 4	14,499 ± 838	87 ± 3	9,613 ± 314
	PLGA S 75% / ERS 25 %	3.13 ± 0.74	65 ± 5	13,021 ± 1,062	75 ± 12	4,263 ± 703	1.02 ± 0.06	34 ± 4	6,717 ± 848	59 ± 4	6,576 ± 415
PLGA H	PLGA H 25% / ERS 75%	3.25 ± 0.05	91 ± 2	18,185 ± 311	98 ± 0	5,593 ± 23	1.66 ± 0.01	84 ± 1	16,863 ± 232	92 ± 1	10,184 ± 95
	PLGA H 50% / ERS 50%	3.15 ± 0.15	85 ± 3	17,037 ± 600	95 ± 1	5,405 ± 36	1.50 ± 0.00	70 ± 0	13,913 ± 90	84 ± 1	9,295 ± 74
	PLGA H 75% / ERS 25 %	2.94 ± 0.14	72 ± 5	14,381 ± 909	85 ± 2	4,881 ± 107	1.20 ± 0.19	35 ± 7	6,944 ± 1,376	52 ± 2	5,823 ± 201

EE-entrapment efficiency

* according to the manufacturer

Indeed, the anti-Xa activity entrapment efficiency was always slightly lower than anti-IIa activity entrapment efficiency, leading to a decrease of the anti-Xa / anti-IIa ratio. For example, nadroparin PLGA S 50% / ERS 50% formulation displayed anti-Xa and anti-IIa activity entrapment efficiencies of 83 ± 3% and 94 ± 2%, respectively. The corresponding ratio was 3.02, whereas the commercial ratio was 3.5.

Differences between the anti-Xa/anti-IIa ratio of the commercial solution and the experimental values in the microparticles could be explained as follows. During the initial encapsulation step, both hydrophilic BCL and ACL chains were present in the internal aqueous phase of the double emulsion. Although all heparin chains are negatively charged, ACL chains carry significantly more negative charge than BCL chains due to the higher number of sulfates and carboxylic groups per chain. So ACL chains probably interacted more intensively with the positively charged Eudragit® RS groups than BCL chains. Consequently, during the solvent and water leakage from the internal phase which initiates the polymer precipitation, probably fewer ACL chains would leave the polymeric matrix than shorter BCL chains. So, it can be assumed that the preferential encapsulation of the ACL chains leads to the decrease of the anti-Xa/ anti-IIa ratio in comparison with the commercial ratio.

Another phenomenon, the cleavage of ACL chains to BCL chains due to the mechanical stress of the stirring period could also contribute to the observed decrease of the anti-Xa/anti-IIa ratio. Indeed, the use of sonication and vigorous mechanical stirring creates a risk of shearing ACL chains, which would then appear as BCL chains in the external phase. Thus the loss of BCL chains may be overestimated.

The entrapped activity ratio seemed to be only slightly dependent on the percentage of Eudragit® RS. Indeed, although the entrapment efficiency of anti-Xa and anti-IIa activities appeared to be correlated with this parameter, they vary in the same manner, yielding a quite constant ratio. So, large changes in the ratio reflect a difference in behavior between anti-Xa activity and anti-IIa activity, whereas insignificant changes demonstrate the same tendency, i.e. a decrease in both anti-Xa and anti-IIa activities.

Indeed, in formulations with Eudragit® RS concentrations higher than 50%, very similar anti-Xa and anti-IIa activities entrapment efficiencies was observed. For these formulations, nadroparin entrapment efficiency values were 83 – 91 % for the anti-Xa activity and 94 – 99 % for the anti-IIa activity, while the activity ratio ranged between 3.02 and 3.25. As far as tinzaparin was concerned, entrapment efficiency values for the same formulations were 70 –

88 % for the anti-Xa activity and 84 – 94 % for the anti-IIa activity whereas the activity ratio ranged between 1.50 and 1.69. The amount of Eudragit® RS was sufficient to allow good entrapment efficiency of both BCL and ACL chains, but always with a trend in better encapsulation of ACL chains compared to BCL chains.

On the other hand, in PLGA S 75 % / ERS 25 % formulations of tinzaparin, entrapment efficiency of anti-Xa and anti-IIa activities were 34 % and 59 %, respectively. This 25% difference between anti-Xa and anti-IIa entrapment efficiencies leads to the smallest anti-Xa/anti-IIa ratio, i.e. 1.02. So, in formulations containing a low proportion of Eudragit® RS, ACL chains seemed to be less subject to leakage during the encapsulation step compared with BCL chains probably due to their stronger interaction with Eudragit® RS, as mentioned above.

To conclude, a decrease of the anti-Xa/anti-IIa ratio due to a preferential encapsulation of ACL chains was observed in all formulations. This finding was even more pronounced in the formulations with a low content of Eudragit® RS.

This is the first time, to the best of our knowledge, that such a phenomenon has been reported. On the other hand, there is no other active molecule which is a mixture of chain lengths like heparin, except the other glycosaminoglycans such as chondroitin sulfate or dermatan sulfate. Nevertheless, in the limited number studies on chondroitin sulfate-based microparticles, the authors did not study the encapsulation process with respect to the length of the chains [32, 33].

3.5. Anti-Xa/anti-IIa ratio variations during drug release

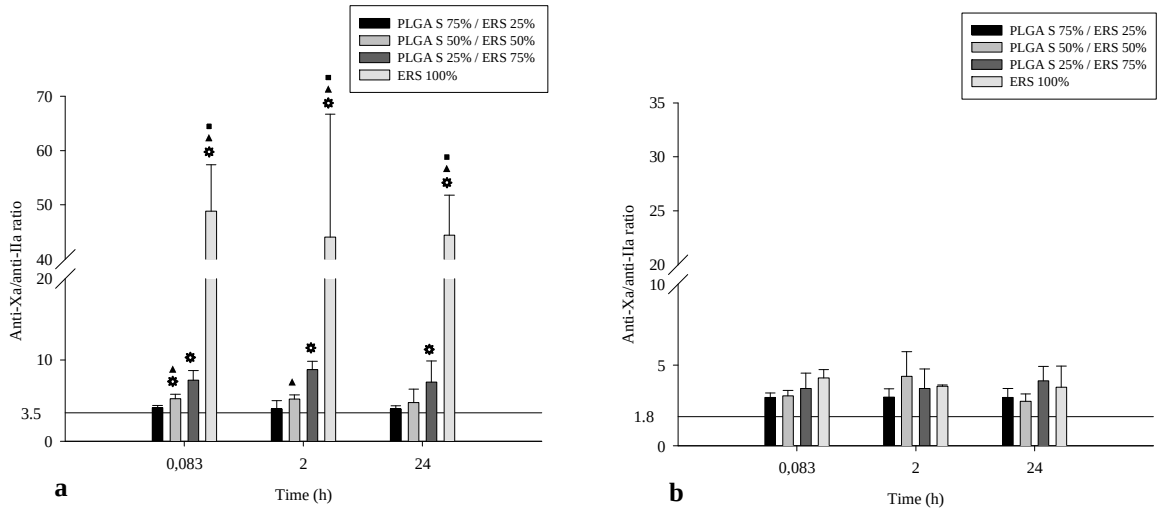
The variations of the anti-Xa/anti-IIa ratio for nadroparin and tinzaparin during *in vitro* release are presented in Figure 2. Since similar results were obtained for both PLGA types, only results with PLGA S are presented.

First of all, regardless of the LMWH and formulation used, an increase of anti-Xa/anti-IIa ratio compared to the commercial values was noticed. Therefore, an easier release of BCL chains was observed whereas ACL chains had a tendency to remain within the microparticles.

For nadroparin microparticles, as shown in Figure 2, the increase of the anti-Xa/anti-IIa ratio was related to the formulation. Indeed, the higher the amount of Eudragit® RS in the formulation the higher the ratio. Thus, the increase in the ratio at 24 hours was between 1.14

(with the PLGA S 75 % / ERS 25 % formulation) and 12.68 times (with the ERS 100 % formulation). During the drug release step, the release of the BCL chains would be easier than that of the ACL chains due to their smaller size which would permit faster diffusion across the polymeric matrix of nadroparin microparticles but also because of the reduced ionic interactions with the positively charged groups of Eudragit® RS.

Fig. 2. Anti-Xa/anti-IIa ratios of (a) nadroparin and (b) tinzaparin during release from microparticles. Microparticles were prepared with a non biodegradable polymer ERS alone or mixed with biodegradable polymer PLGA: PLGA S 25% / ERS 75%; PLGA S 50% / ERS 50%; PLGA S 75% / ERS 25%. Experiments were performed in phosphate buffer at 37°C and pH 7.4. Data are means ± SD (n = 3). Please note change in scale between 2(a) and 2(b).



▲ Statistically different at all times from PLGA S 25% / ERS 75% at $P < 0.05$.

✿ Statistically different at all times from PLGA S 75% / ERS 25% at $P < 0.05$.

▪ Statistically different at all times from PLGA S 50% / ERS 50% at $P < 0.05$.

For tinzaparin microparticles, anti-Xa/anti-IIa ratios during the release were not statistically different. So it seems that the composition of the formulation did not influence the release. Therefore, the observation is probably related to differences of composition between tinzaparin and nadroparin in terms of chain length distribution and distinguishable terminus at the end of chains. Indeed, the depolymerization methods used were either chemical or

enzymatic for the preparation of nadroparin and tinzaparin, respectively [34]. In the case of tinzaparin, this leads to a larger fraction of ACL chains and the presence of 4,5 unsaturated uronic acid at the non-reducing terminus. As for nadroparin, there is a lower ACL chains fraction and the reducing terminus of nadroparin chains bears a 2,5-anhydro-D-mannose. So it could be speculated that tinzaparin active chains are slightly longer and more reactive than nadroparin ones. Thus, during the encapsulation step of tinzaparin, there were probably more interactions with Eudragit® RS leading to higher proportion of tightly bound chains (therefore trapped within the matrix) whereas another part, adsorbed on the surface, could be easily released.

This phenomenon may also occur with nadroparin, but probably due to the difference of composition, the balance between adsorbed chains and chains bound to Eudragit® RS would be in favor of bound chains. However, these chains are probably shorter and therefore released more easily, as mentioned previously.

4. Conclusion

For the first time, it has been shown that a microencapsulation process allows selective incorporation and release of different length chains of the same active entity. This selectivity appears to depend on the charge and molecular weight of chains and also on the composition on the matrix.

Indeed, the ACL chains bearing both the anti-IIa and anti-Xa activity are more easily encapsulated than the BCL chains bearing exclusively anti-Xa activity, presumably due to many more interactions with the positively charged Eudragit® RS. On the other hand, these stronger interactions between ACL chains and Eudragit® RS explain that ACL are retained in the matrix whereas BCL chains are easily released.

Our heparin delivery system provides release of heparin chains with a new and different anti-Xa/anti-IIa ratio compared with the commercial ratio, and therefore constitutes a new pharmaceutical form of LMWH.

Since it has already been demonstrated that this type of microparticles can promote the oral absorption of heparin, an *in vivo* studies will be carried out in order to determine the resulting anti-Xa/anti-IIa ratio.

5. Acknowledgement

The help of Dr. Gillian Barratt in reviewing the revised manuscript is greatly acknowledged.

6. References

[1] C. Kearon, S.R. Kahn, G. Agnelli, S. Goldhaber, G.E. Raskob, A.J. Comerota, Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest 133(6 Suppl) (2008) 454-545.

[2] A.K. Kakkar, Low- and ultra-low-molecular-weight heparins. Best Pract Res Clin Haematol 17(1) (2004) 77-87.

[3] B. Boneu, Low molecular weight heparins: are they superior to unfractionated heparins to prevent and to treat deep vein thrombosis? Thromb Res 100(2) (2000) V113-120.

[4] G.T. Gerotziafas, A.D. Petropoulou, E. Verdy, M.M. Samama, I. Elalamy, Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. J Thromb Haemost 5(5) (2007) 955-962.

[5] J. Hirsh, K.A. Bauer, M.B. Donati, M. Gould, M.M. Samama, J.I. Weitz, Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest 133(6 Suppl) (2008) 141S-159S.

[6] S.A. Mousa, F. Zhang, A. Aljada, S. Chaturvedi, M. Takieddin, H. Zhang, L. Chi, M.C. Castelli, K. Friedman, M.M. Goldberg, R.J. Linhardt, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral heparin solid dosage form in healthy human subjects. J Clin Pharmacol 47(12) (2007) 1508-1520.

[7] C.E. Kast, D. Guggi, N. Langoth, A. Bernkop-Schnurch, Development and in vivo evaluation of an oral delivery system for low molecular weight heparin based on thiolated polycarbophil. Pharm Res 20(6) (2003) 931-936.

[8] Y. Ito, T. Kusawake, Y.V. Prasad, N. Sugioka, N. Shibata, K. Takada, Preparation and evaluation of oral solid heparin using emulsifier and adsorbent for in vitro and in vivo studies. Int J Pharm 317(2) (2006) 114-119.

[9] M. Thanou, S. Henderson, A. Kydonieus, C. Elson, N-sulfonato-N,O-carboxymethylchitosan: a novel polymeric absorption enhancer for the oral delivery of macromolecules. J Control Release 117(2) (2007) 171-178.

[10] V. Grabovac, T. Schmitz, F. Foger, A. Bernkop-Schnurch, Papain: an effective permeation enhancer for orally administered low molecular weight heparin. Pharm Res 24(5) (2007) 1001-1006.

[11] P.Y. Hayes, B.P. Ross, B.G. Thomas, I. Toth, Polycationic lipophilic-core dendrons as penetration enhancers for the oral administration of low molecular weight heparin. Bioorg Med Chem 14(1) (2006) 143-152.

[12] T. Schmitz, V.M. Leitner, A. Bernkop-Schnurch, Oral heparin delivery: design and in vivo evaluation of a stomach-targeted mucoadhesive delivery system. J Pharm Sci 94(5) (2005) 966-973.

[13] S.K. Kim, B. Vaishali, E. Lee, S. Lee, Y.K. Lee, T.S. Kumar, H.T. Moon, Y. Byun, Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation. Thromb Res 117(4) (2006) 419-427.

[14] V. Hoffart, A. Lamprecht, P. Maincent, T. Lecompte, C. Vigneron, N. Ubrich, Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. J Control Release 113(1) (2006) 38-42.

[15] Y. Jiao, N. Ubrich, V. Hoffart, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman, P. Maincent, Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. J Pharm Sci 91(3) (2002) 760-768.

[16] R. al Dieri, S. Alban, S. Beguin, H.C. Hemker, Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. J Thromb Haemost 2(8) (2004) 1395-1401.

[17] H.C. Hemker, S. Beguin, in: H. Bounameux (Ed.), Low-molecular-weight heparins in prophylaxis and therapy of thromboembolic diseases (fundamental clinical cardiology series), Vol. 19, Editions Medicales Inter-nationales, New York, 1994, pp. 21-42.

[18] J. Choay, M. Petitou, J.C. Lormeau, P. Sinay, B. Casu, G. Gatti, Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. Biochem Biophys Res Commun 116(2) (1983) 492-499.

[19] L.H. Lam, J.E. Silbert, R.D. Rosenberg, The separation of active and inactive forms of heparin. Biochem Biophys Res Commun 69(2) (1976) 570-577.

[20] E. Gray, B. Mulloy, T.W. Barrowcliffe, Heparin and low-molecular-weight heparin. Thromb Haemost 99(5) (2008) 807-818.

[21] J. Choay, Structure and activity of heparin and its fragments: an overview. Semin Thromb Hemost 15(4) (1989) 359-364.

[22] D.A. Lane, J. Denton, A.M. Flynn, L. Thunberg, U. Lindahl, Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. Biochem J 218(3) (1984) 725-732.

[23] Monographie 01/2008:1134, Nadroparine Calcique. Pharmacopée Européenne, Vol. 6, 2007, pp. 2647-2650.

[24] Monographie 01/2008:1271, Tinzaparine Sodique. Pharmacopée Européenne, Vol. 6, 2007, pp. 3322-3323.

[25] M. Ardry, Dosage de l'héparine. Bull. Ordre 135 (1971) 699-708.

[26] B. Demore, E. Benoit, P. Maincent, M. Hoffman, J. Bessiere, Determination of heparin in aqueous solutions. J Clin Pharm Ther 23(5) (1998) 381-384.

[27] A.N. Teien, M. Lie, Evaluation of an amidolytic heparin assay method: increased sensitivity by adding purified antithrombin III. Thromb Res 10(3) (1977) 399-410.

[28] R. Alex, R. Bodmeier, Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment. J Microencapsul 7(3) (1990) 347-355.

[29] Y.Y. Yang, T.S. Chung, N.P. Ng, Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. Biomaterials 22(3) (2001) 231-241.

[30] S. Freiberg, X.X. Zhu, Polymer microspheres for controlled drug release. Int J Pharm 282(1-2) (2004) 1-18.

[31] Chernyshera Y.V., Babak V.G., Kildeeva N.R., Boury F., Benoit J.P., Ubrich N., Maincent P., Effect of the type of hydrophobic polymers on the size of nanoparticles obtained by emulsification-solvent evaporation. Mendeleev Communications 2 (2003) 65-68.

[32] K.E. Brown, K. Leong, C.H. Huang, R. Dalal, G.D. Green, H.B. Haimes, P.A. Jimenez, J. Bathon, Gelatin/chondroitin 6-sulfate microspheres for the delivery of therapeutic proteins to the joint. Arthritis Rheum 41(12) (1998) 2185-2195.

[33] A. Ganza-Gonzalez, S. Anguiano-Igea, F.J. Otero-Espinar, J. Blanco Mendez, Chitosan and chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metoclopramide. Eur J Pharm Biopharm 48(2) (1999) 149-155.

[34] R.L. Bick, E.P. Frenkel, J. Walenga, J. Fareed, D.A. Hoppensteadt, Unfractionated heparin, low molecular weight heparins, and pentasaccharide: basic mechanism of actions, pharmacology, and clinical use. Hematol Oncol Clin North Am 19(1) (2005) 1-51.

PUBLICATION II

ORAL ADMINISTRATION OF A MICROENCAPSULATED LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN TO RABBITS: ANTI-Xa AND ANTI-IIa PROFILES

L. Javot, A. Sapin, J. Scala-Bertola, C. Vigneron, T. Lecompte, P. Maincent

Soumis à : Thrombosis and haemostasis

RESUME DE LA PUBLICATION II

L'objectif de cette étude a été la détermination *in vitro* et *in vivo* des activités anti-Xa et anti-IIa ainsi que du rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa de microparticules de nadroparine.

Des microparticules de nadroparine ont été préparées par la méthode de la double émulsion à partir soit d'Eudragit® RS seul ou en mélange avec l'acide poly (lactique-co-glycolique) ayant été modifié (PLGA S) ou non (PLGA H) par estérification de son extrémité acide.

Une caractérisation *in vitro* des particules à été réalisée. Les particules possèdent une taille comprise entre 53 et 94 µm. Les taux d'encapsulation des activités anti-Xa et anti-IIa sont élevés, variant de 83 à 90% pour l'activité anti-Xa et de 94 à 99% pour l'activité anti-IIa. Les rapports d'activité anti-Xa/anti-IIa présents au sein des particules (de valeur 3,02 à 3,20) sont diminués par comparaison avec le rapport de la solution commerciale de nadroparine (3,5). Le rapport anti-Xa/anti-IIa, obtenu suite à la réalisation d'un essai de dissolution, est supérieur au rapport de la solution commerciale car il existe une libération des chaines ACL plus faible que celle des chaines BCL. Ce phénomène est lié à la quantité d'Eudragit® RS et il est particulièrement flagrant dans le cas de la formulation ERS 100% ou presque aucune chaine ACL n'est libérée (145 unités anti-IIa/g de polymère).

Ces microparticules ont été administrées à des lapins à la dose de 600 unités anti-Xa/kg. Il a été montré que les rapports d'activité anti-Xa/anti-IIa relargués des microparticules sont supérieurs à ceux de la solution commerciale qui sert de référence. Après administration orale, quelle que soit la formulation, des effets prolongés en termes d'activité anti-Xa et anti-IIa ont été obtenus, par comparaison avec l'injection sous-cutanée qui a servi de témoin. Une activité particulièrement importante est maintenue entre 2 et 6 heures en ce qui concerne l'activité anti-Xa (comprise entre 0,44 et 0,59 unité anti-Xa/mL), alors qu'avec l'activité anti-IIa un pic d'activité est observé à 4 heures (compris entre 0,03 et 0,11 unité anti-IIa/mL).
Si des biodisponibilités relatives en activités anti-Xa et anti-IIa équivalentes et élevées (40%) ont été obtenues avec la formulation ERS 100%, en revanche, pour les autres formulations la biodisponibilité de l'activité anti-Xa (38 % pour la formulation PLGA S 50% / ERS 50%) est supérieure à celle de l'activité anti-IIa (27 % pour la formulation PLGA S 50% / ERS 50%).

En revanche, tous les rapports anti-Xa/anti-IIa plasmatiques issus des différentes formulations sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec la sous-cutanée, c'est-à-dire compris entre 5 et 15. Ainsi avec la formulation ERS 100%, les rapports entre 2 et 6 heures s’échelonnent entre 5,89 et 14,39.

Cette étude a donc permis de démontrer que les microparticules de nadroparine sont une forme orale prometteuse, permettant l’obtention d’activités anti-Xa et anti-IIa prolongées et de rapports d’activité anti-Xa/anti-IIa stables au cours du temps et de valeurs comparables à celles obtenues suite à l’injection sous-cutanée de la solution commerciales de référence.

PUBLICATION II

ORAL ADMINISTRATION OF A MICROENCAPSULATED LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN TO RABBITS: ANTI-Xa AND ANTI-IIa PROFILES

Abstract

Background: The development of heparin oral form is a subject of international research for a long time. Promising results have been obtained *in vivo* in terms of anti-Xa activity with different strategies and notably microparticles but studies concerning the anti-IIa activity and the anti-Xa/anti-IIa ratio have never been presented.

Objectives: *In vitro* and *in vivo* determination of the anti-Xa activities, anti-IIa activities and anti-Xa/anti-IIa ratios provided by nadroparin Eudragit® RS and poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles and evaluation of their pharmacokinetic parameters compared to subcutaneous injection.

Methods: Nadroparin was encapsulated into microparticles prepared by the double emulsion method Eudragit® RS alone or in mixture with PLGA of two kinds, i.e. with (PLGA S) or without (PLGA H) esterification of the acid ending. Microparticles characterization was performed (size, anti-Xa and anti-IIa activities entrapped and released) before their oral administration in rabbits.

Result: *In vitro* anti-Xa/anti-IIa ratios released from nadroparin microparticles were higher than the ratio of the commercial solution. After oral administration, whatever the formulation, sustained anti-Xa and anti-IIa activities were obtained compared to the subcutaneous injection with a peak concentration at 4 hours (up to 0.59 anti-Xa U/mL and 0.11 anti-IIa U/mL for PLGA S 50% / ERS 50% formulation). Anti-Xa and anti-IIa relative bioavailabilities were high, up to 40% (ERS 100% formulation). Anti-Xa/anti-IIa ratios were within range already obtained for subcutaneous injection, i.e. between 5 and 15.

Conclusions: Nadroparin microparticles of nadroparin are promising oral dosage form performing sustained and well controlled anti-Xa, anti-IIa activities and anti-Xa/anti-IIa ratio at the same time.

1. Introduction

Low Molecular Weight Heparins (LMWHs) are the gold standard for the prevention and the treatment of deep venous thrombosis (DVT). They are worldwide used related to a high efficacy and safety. However, due to its high negatively charge and large size, this macromolecule is still administered by injection. It is the reason of intensive research on oral dosage form of heparin since many years. Positive results in this area would bring therapy improvement, better patient compliance and health care cost reduction.

However, the main difficulty in the development of heparin oral form is linked to its physicochemical properties, i.e. large molecular weight and high ionic charge that prevents LMWH permeation through the intestinal wall. Based on this statement, different strategies have been applied such as use of absorption enhancers [1-4] to increase the molecule permeation, its conjugation with deoxycholic acid [5] allowing heparin absorption by biliary acid the active transport, negative charge masking using a polycationic compound [6] or LMWH encapsulation into polymeric particles [7, 8]. The use of an appropriate polymer presents many advantages as i) drug protection from external medium ii) potential site specific delivery and iii) sustained and controlled release of the active substance. Polymeric particles present a delivery system ensuring one of the most best anti-Xa absolute bioavailability (59% and 48%, for nanoparticles [7] and microparticles [8], respectively) with respect to reasonable administered doses (600 anti-Xa U/kg). Nevertheless promising results (in terms of anti-Xa activities) have been obtained by different strategies mentioned above, but no studies concerning the anti-Xa/anti-IIa ratio and/or the anti-IIa activity provided by these new dosage forms were done.

Heparin is known to catalyze the inhibition of coagulation factor Xa and factor IIa by antithrombin (AT). Indeed, due to their animal origin and their preparation method (enzymatic or chemical depolymerisation), LMWHs present a very heterogeneous composition. They consist of a mixture of polysaccharide chains with different length and activities. Among these chains, approximatively a quarter contains the pentasaccharide sequence responsible for the binding with AT [9]. AT is a natural inhibitor of factor Xa and IIa of the coagulation which is catalyzed by heparin. All chains containing the pentasaccharide sequence are able to inhibit the factor Xa, independently on their size. However, for the factor IIa inhibition, the chains must i) contain the pentasaccharide sequence and ii) have minimum length of 18 saccharide units (corresponding to a molecular weight of

about 5 000 Da). Thus, a classification of active heparin chains have been performed by Hemker [10] with regards to their critical length: all chains “Below the critical Chain Length” (BCL chains) are able to inhibit factor Xa whereas all chains “Above the critical Chain Length” (ACL chains) are able to inhibit factor Xa and factor IIa as well. Since the charge density is the same for all heparin chains, the longer ACL chains are more negatively charged than the BCL chains. In addition, it has to be noticed that anti-Xa and anti-IIa activity reflects the concentration of pentasaccharide and ACL chains, respectively.

Each LMWH is composed of a specific proportion of ACL and BCL chains. Thus, the best way to characterize easily the activity of a LMWH is the anti-Xa/anti-IIa ratio: it is one of the main criteria (together with anti-Xa activity and pharmacokinetic properties) used for the differentiation of LMWHs by authorities. Anti-Xa/anti-IIa ratio of LMWHs lays from 1.6 (tinzaparin) to 9.7 (bemiparin) [11]: thus tinzaparin contains a more important fraction of ACL chains (compared to BCL chains) than bemiparin.

In clinical practice, LMWHs are administered in terms of anti-Xa units, without regards to their anti-IIa potential. However, studies have demonstrated that LMWHs have a variable inhibitory effect on thrombin generation *in vitro* when compared at equivalent anti-FXa activity, but are similar when compared by equivalent anti-FIIa activities [12]. Since each LMWH has a different anti-Xa/anti-IIa ratio, it means that at equivalent anti-Xa activities, variable inhibitory effects observed on thrombin generation are mainly due to the different anti-IIa activity of LMWHs tested. Thus, for the development of a new form of heparin, its anti-Xa activity must always be evaluated but additional studies to determine anti-FIIa activity and anti-FXa/anti-FIIa ratio should also be performed.

That is why, in this study, we investigated the *in vitro* and *in vivo* anti-Xa and anti-IIa activities provided by polymeric microparticles with encapsulated nadroparin. The anti-Xa/anti-IIa ratio was also determined and compared to the commercial ratio of 3.5 of nadroparin. Indeed, it is possible that BCL and ACL chains were not encapsulated, released [13] and resorbed in the same proportions due to their different physicochemical properties, such as size and overall charge, leading to modified anti-Xa/anti-IIa ratio. Any increase or decrease in the anti-Xa/anti-IIa ratio is related to an increase or a decrease of relative proportion of BCL chains compared to ACL chains. Furthermore, in order to observe the effect of polymers on nadroparin release and *in vivo* absorption, non biodegradable

polycationic polymer (ammonium methacrylate copolymer) was used alone or in blends (50:50) with a biodegradable polymer (PLGA) for the preparation of microparticles.

Two kinds of PLGA presenting free (uncapped) or substituted (endcapped) acid ending were also tested with the view to select the best one in terms of performance (encapsulation rate, *in vitro* and *in vivo* release).

2. Material and methods

2.1. Materials

Nadroparin calcium (112.5 anti-Xa U /mg, 32.1 anti-IIa U /mg, anti-Xa/anti-IIa ratio 3.5) was marketed by GlaxoSmithKline (Fraxodi®, Marly-le-Roi, France). Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) 50/50 uncapped (Resomer® RG 504 H, MW 52,500 $g.mol^{-1}$) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) 50/50 endcapped (Resomer® RS 504 S, MW 52,500 $g.mol^{-1}$) were a gift from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Ammonio methacrylate copolymer (Eudragit® RS PO, MW 150,000 $g.mol^{-1}$) was generously supplied by Evonik Röhm GmbH (Darmstadt, Germany). Polyvinylalcohol (PVA, MW 30,000 $g.mol^{-1}$, 88% hydrolyzed) was provided by Sigma-Aldrich (Stenheim, Germany). The Stachrom® heparin kit used for the measurement of the anti-Xa activity was supplied by Diagnostica Stago (Asnière, France). The reagents for the measurement of the anti-IIa activity were provided by Instrumentation Laboratory (Lexington, USA) for 25 IU antithrombin and substrate S-2238, and by Hyphen BioMed (Neuville sur Oise, France) for 21 NIH bovine thrombin. All other chemical reagents were of analytical grade and used as supplied.

2.2. Methods

2.2.1. Polymeric microparticles preparation

The polymeric microparticles were prepared using a non biodegradable positively charged polymethacrylate (Eudragit® or ERS) alone or in a mixture (50/50) with a biodegradable polymer, i.e. poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) 50/50 (uncapped: PLGA H or endcapped: PLGA S). The preparation of microparticles was carried out by the double emulsion (water-in-oil-in-water) and extraction method already applied for manufacturing microparticles in our laboratory. Briefly, 1 mL of an aqueous LMWH solution (5000 anti-Xa U /mL) was first emulsified by sonication (15 s) in ethyl acetate (5 mL) containing the blend of polymers (0.250 g). The resulting water-in-oil emulsion was thereafter poured into 400 mL of a PVA

aqueous solution (0.1%). A water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion was formed by extensive stirring with a three-bladed propeller for 1 h at room temperature until the organic solvent was extracted. Upon solvent extraction, the polymers precipitate and the microparticles cores solidify. Microparticles were then collected by filtration, washed extensively with deionized water and dried at room temperature.

2.2.2. Particle Mean Diameter

The mean diameter of microparticles was evaluated with a Malvern Mastersizer (Mastersizer X, Malvern Instrument, United Kingdom) using laser light diffraction. Microparticles were resuspended in Tween® 80 (1%, w/v) during one hour in an ultrasonic bath. Each sample was measured in triplicate.

2.2.3. *In vitro* studies

2.2.3.1. Entrapment efficiencies of nadroparin anti-Xa and anti-IIa activities

The amount of anti-Xa and anti-IIa activities entrapped in microparticles was determined indirectly by the determination of the amount of free anti-Xa and anti-IIa activities recovered from the external aqueous phase after filtration using the biological method described below. The drug entrapment efficiency (EE) was expressed as the percentage of anti-Xa or anti-IIa activities of nadroparin entrapped with respect to the theoretical value, whereas the drug loading was presented as the amount of anti-Xa or anti-IIa units entrapped per g of polymer. The drug loading ratio, expressed as the anti-Xa/anti-IIa ratio in the particles, corresponded to the entrapped anti-Xa units divided by the entrapped anti-IIa units. All experiments were performed in triplicate.

2.2.3.2. In vitro release of nadroparin anti-Xa and anti-IIa activities

Nadroparin-loaded microparticles (50 mg) were suspended in 20 mL of phosphate buffer saline (KH_2PO_4 0.0044 mol/L, Na_2HPO_4 0.0451 mol/L, NaCl 0.1058 mol/L, pH 7.4) in a flask incubated under gentle magnetic stirring (200 rpm) in a water bath at 37 ºC. At various time intervals, 1.5 mL samples were withdrawn, filtered with a 0.22 µm Millipore filter and replaced by 1.5 mL of fresh buffer. The amount of anti-Xa and anti-IIa activities in the dissolution medium was determined by the biological method described below and were expressed in terms of anti-Xa U (or anti-IIa U) released per gram of polymer. The released

ratio was expressed as anti-Xa units released per gram of polymer divided by anti-IIa units released per gram of polymer. All experiments were performed in triplicate.

2.2.4. *In vivo* study

Experiments were carried out according to the French legislation on animal experiments. Male adult New Zealand rabbits (mean body weight of 3.5 kg) housed in separate cages and fasted overnight with water *ad libidum* were used. Nadroparin polymeric microparticles were loaded into gelatine hard capsules (size 1) and administered to the rabbits by oral route at 600 anti-Xa U / kg. Different formulations were tested in triplicate, namely ERS 100 %, PLGA H 50% / ERS 50 % and PLGA S 50% / ERS 50 %. Bloods samples (1.5 mL) were withdrawn from the marginal ear vein into vials containing an identical volume of sodium citrate (0.129M) at 2, 4, 6, 8, 10 and 24 h after administration. Samples were centrifuged at 3 000 × g for 10 min.

A 150 anti-Xa U /kg subcutaneous injection of nadroparin was used as a control for calculation of the relative bioavaibility. Blood samples were withdrawn as described above at 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 24 h after administration and the same centrifugation protocol was applied.

The amount of anti-Xa and anti-IIa activities in plasma was determined by the biological method described below and expressed in terms of anti-Xa U/mL and anti-IIa U/mL. The released ratio was expressed as anti-Xa units released per mL divided by anti-IIa units per mL. The areas under the curve (AUC) of the anti-Xa and anti-IIa activity time profiles were calculated with the linear trapezoidal method. The absolute bioavailability of each activity was calculated by the ratio of the respective AUC corrected by the administered dose.

2.2.5. Measurement of anti-Xa and anti-IIa activities using biological method

The anti-factor Xa activity and the anti-factor IIa activity found in *in vitro* and *in vivo* samples were evaluated automatically (STA Compact Automate, Diagnostica Stago, France) by a biological method [14] using a chromogenic substrate. Each experiment was performed in triplicate.

For anti-Xa activity determination, each of the standards and samples (25 µL) were mixed with 50 µL of antithrombin solution. This solution was mixed with 100 µL of bovine factor Xa and incubated for 90 s at 37 °C. Factor Xa chromogenic substrate (100 µL) was then

added and incubated at 37 °C. The absorbance was determined at 405 nm every 2 s for 10 to 30 s of incubation. A linear relationship between Δabsorbance/min and the nadroparin anti-Xa activity in the range of 0.0 - 0.7 anti-Xa/mL was obtained.

For anti-IIa activity determination, each of the standards and samples (55 µL) were mixed with 100 µL of antithrombin in TRIS solution. This solution was mixed with 25 µL of bovine thrombin and incubated for 60 s at 37 °C. Factor IIa chromogenic substrate (100 µL) was then added and incubated at 37 °C. The absorbance was determined at 405 nm every 2 s for 10 to 60 s of incubation. A linear relationship between Δabsorbance/min and the nadroparin anti-IIa activity in the range of 0.0 - 0.7 anti-IIa U/mL was obtained.

2.2.6. Statistical treatment of experimental results

The non parametric Mann-Whitney test was applied to the analysis of i) the *in vivo* anti-Xa and anti-IIa activities ii) the *in vivo* anti-Xa/anti-IIa ratio and iii) each pharmacokinetic parameter, with comparison between the different formulations, i.e. ERS 100%, PLGA H 50% / ERS 50% and PLGA S 50% / ERS 50%. In all cases, a probability value of less than 0.05 was considered to be significant.

3. Results

3.1. Particle size

The particles size of nadroparine loaded microparticles is presented in table 1. It ranged between 53 (ERS 100%) and 94 µm (PLGA S 50% / ERS 50%). Mean diameter of PLGA H 50% / ERS 50% (58 ± 14 µm) and ERS 100% formulations (53 ± 18 µm) were similar, whereas mean diameter of PLGA S 50% / ERS 50% formulation was larger (94 ± 15 µm).

Table 1: Physicochemical characteristic of nadroparin microparticles. Data are means ± SD (n=3).

Formulation	Mean diameter (µm)	Anti-Xa/anti-IIa ratio for nadroparin	EE of anti-Xa activity (%)	Drug loading of anti-Xa activity (anti-Xa U/g of Polymer)	EE of anti-IIa activity (%)	Drug loading of anti-IIa activity (anti-IIa U/g of Polymer)
Commercial dosage form		3.50*	-	-	-	-
ERS 100%	53 ± 18	3.20 ± 0.07	90 ± 2	18,052 ± 395	99 ± 0	5,633 ± 12
PLGA H 50% / ERS 50%	58 ± 14	3.15 ± 0.15	85 ± 3	17,037 ± 600	95 ± 1	5,405 ± 36
PLGA S 50% / ERS 50%	94 ± 15	3.02 ± 0.16	83 ± 3	16,572 ± 688	94 ± 2	5,361 ± 107

EE-entrapment efficiency, *- according to the manufacturer

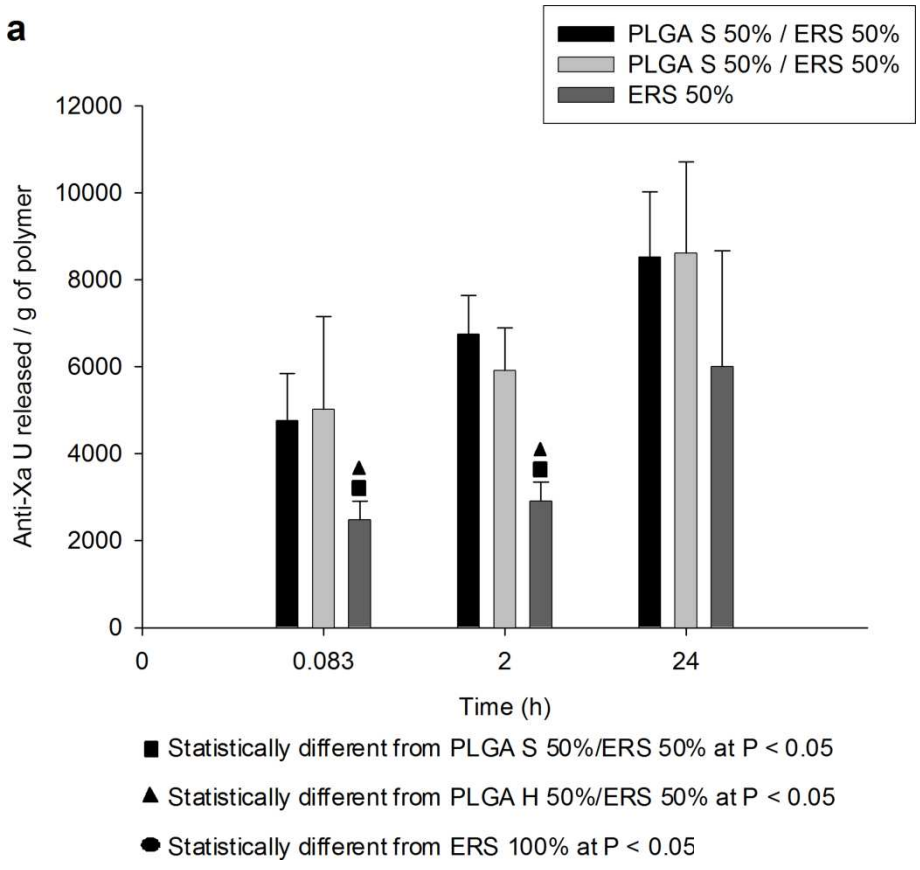
3.2. Entrapment efficiency and drug loading of anti-Xa and anti-IIa activities

As presented in table 1, high drug loadings were obtained for anti-Xa activity and for anti-IIa activity as well. Indeed, anti-Xa activity ranged from 16,572 units (PLGA S 50% / ERS 50%) to 18,052 units (ERS 100%) whereas anti-IIa activity was in between 5361 units (PLGA S 50% / ERS 50%) and 5633 units (ERS 100%). It has to be noticed that the corresponding entrapment efficiencies were slightly lower for anti-Xa activity (from 83% to 90%) than for anti-IIa activity (from 94% to 99%). Consequently, it led to a decrease of the anti-Xa/anti-IIa ratio in the particles after the encapsulation step.

The nature of the PLGA used in formulations did not seem to have an influence on the entrapment efficiency.

3.3. Anti-Xa and anti-IIa activities during *in vitro* drug release

Microparticles composed of PLGA S 50% / ERS 50% and PLGA H 50% / ERS % released significantly larger amount of the drug than ERS microparticles (see fig.1).



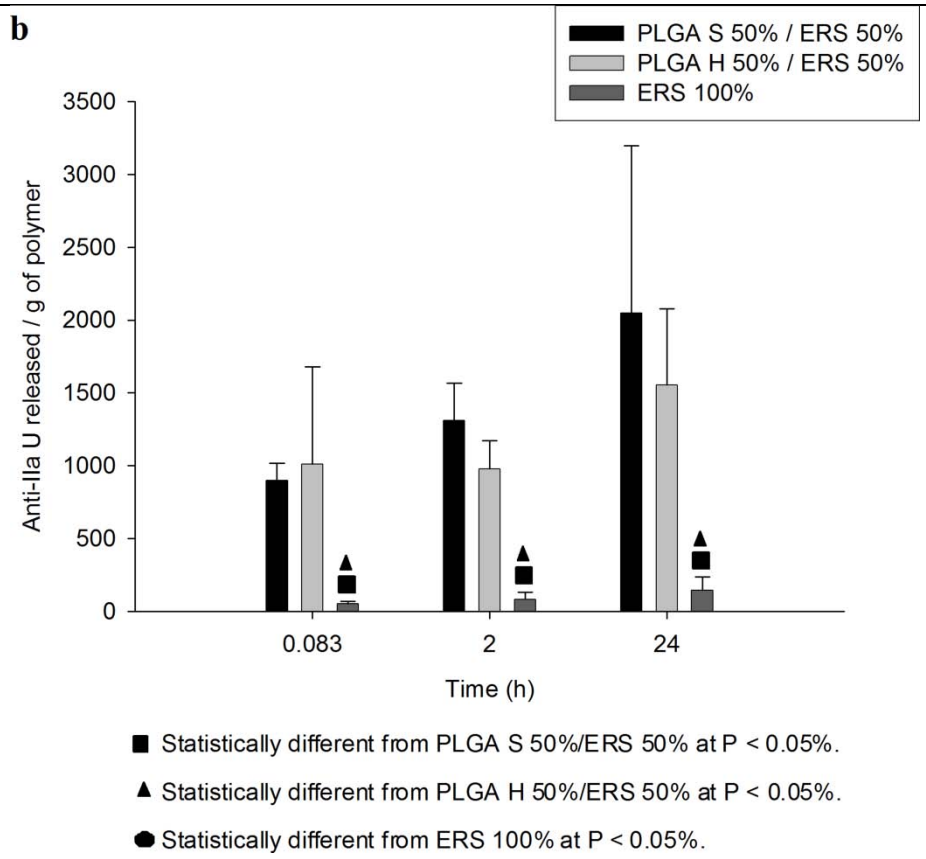


Fig. 1. Anti-Xa (a) and anti-IIa (b) activities during *in vitro* release. Data are means ± SD.

For instance, microparticles containing PLGA H 50% / ERS 50% released 8522 anti-Xa U / g of polymers and 2047 anti-IIa U / g of polymer within 24 hours, corresponding to 50% and 29% of the encapsulated quantities, respectively. This finding leads to the increase of the *in vitro* anti-Xa/anti-IIa ratio which is only concerning the above mentioned PLGA / ERS formulations :this ratio is slightly higher than the commercial ratio of 3.5 (see fig.2). Indeed, 6001 anti-Xa U / g of polymer were released but only 145 anti-IIa U /g of polymer after 24 hours, corresponding to 33% and 4% of the encapsulated quantities, respectively. This particularly low amount of released anti-IIa activity led to the very high anti-Xa/anti-IIa ratio found in vitro for ERS microparticles, i.e. 48 at 5 minutes and still 44 both at 2 and 24 hours (see fig. 2).

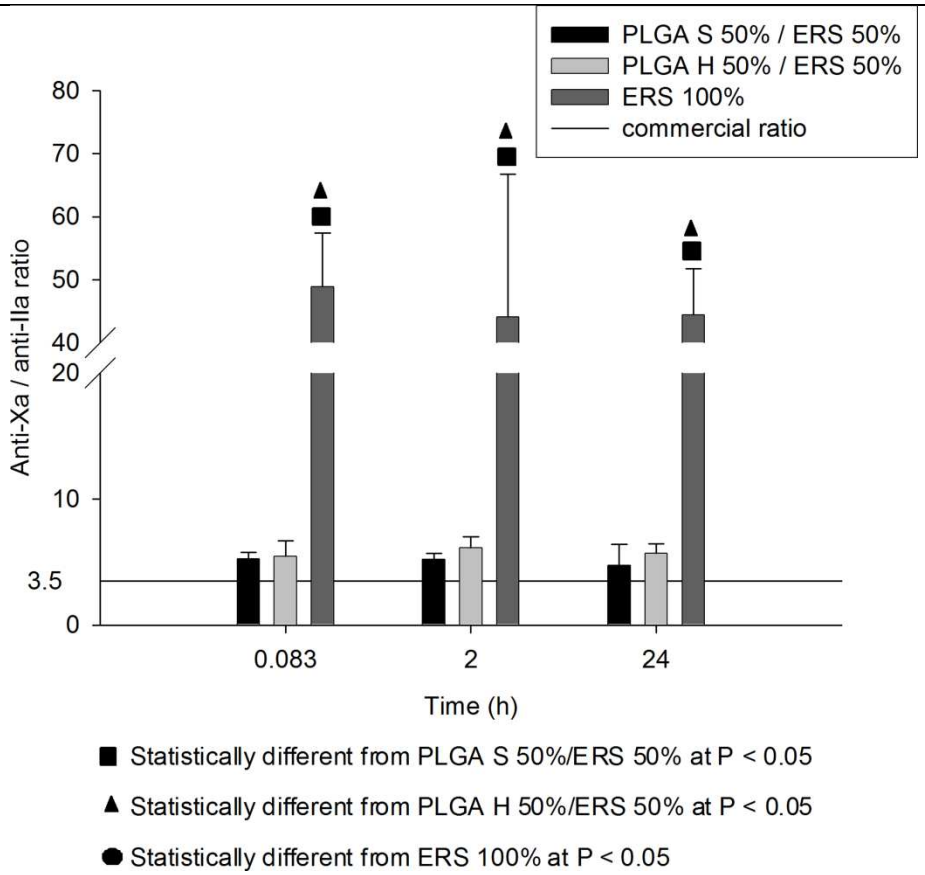


Fig. 2. Anti-Xa/anti-IIa ratio during *in vitro* release. Data are means ± SD.

Furthermore, considering the same formulation, it has to be noticed that the ratios were similar within the whole interval of 24 hours; for instance for PLGA S 50% / ERS 50% microparticles the values were 5.25, 5.20 and 4.75 at 5 minutes, 2 hours and 24 hours, respectively.

3.4. *In vivo* anti-Xa and anti-IIa activities

In vivo anti-Xa and anti-IIa activities after subcutaneous administration of nadroparin solution (150 anti-Xa U/kg) or after oral administration of microparticles loaded with nadroparin (600 anti-Xa U/kg) are presented in figure 3.

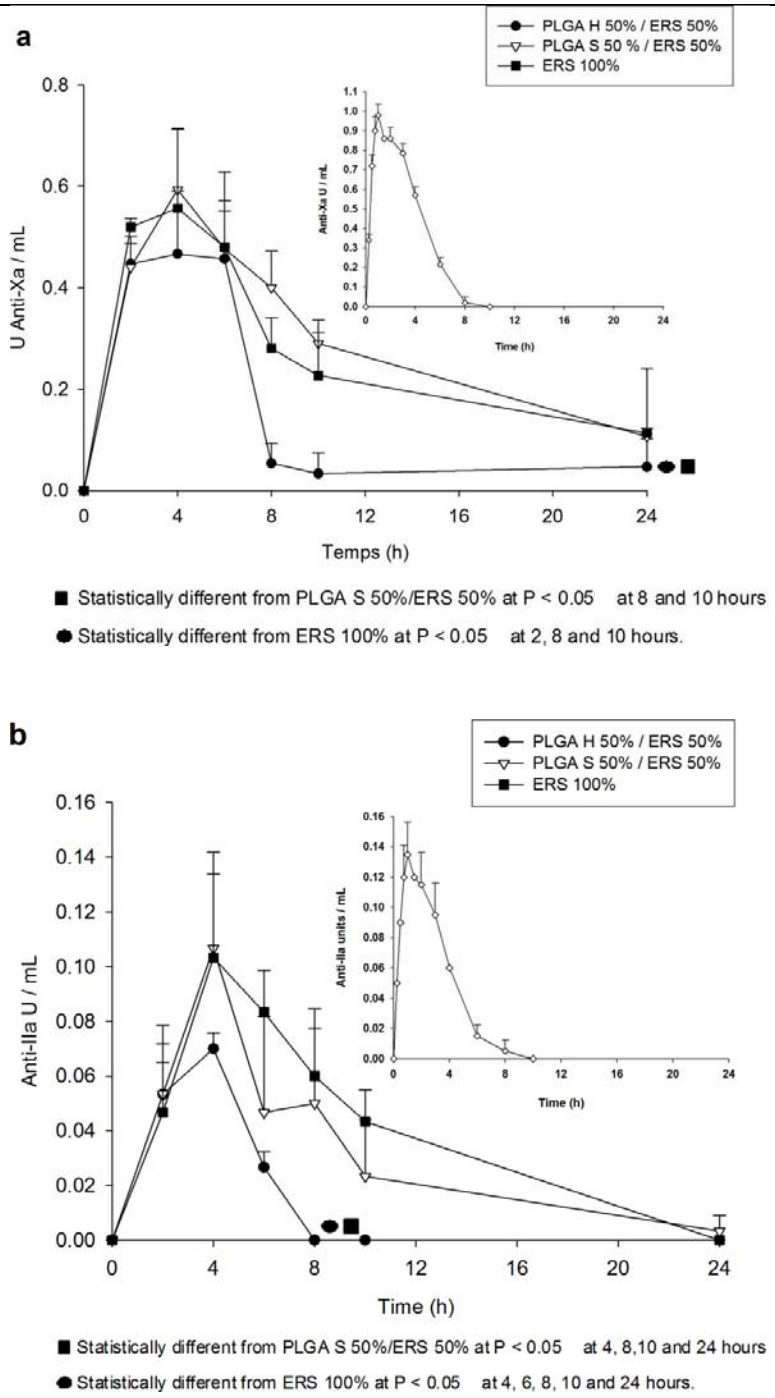


Fig. 3.: ***In vivo*** **anti-Xa activity (a) and anti-IIa activity (b) after oral administration in rabbits of MP loaded with nadroparin** (600 anti-Xa U/kg corresponding to 161-170 anti-IIa U/kg, depending on the formulation) and prepared with a single non biodegradable polymer ERS or from blends with biodegradable PLGA (H or S): PLGA H 50% / ERS 50% and PLGA S 50% / ERS 50%. Insert: mean anti-factor Xa activity (a) and mean anti-factor IIa activity (b) after subcutaneous administration of a nadroparin solution (150 anti-Xa U/kg corresponding to 43 anti-IIa U/kg). Data are means ± SD (n = 3).

The resulting pharmacokinetic parameters are shown in table 2.

Table 2 :Pharmacokinetic parameters for the anti-Xa and anti-IIa activities obtained for nadroparin-loaded microparticles after oral administration in rabbits at 600 anti-Xa U/kg (corresponding to 161-170 anti-IIa U/kg, depending on the formulation) versus the marketed solution administered by subcutaneous injection at 150 anti-Xa U/kg (corresponding to 43 anti-IIa U/kg). Data are means ± SD (n=3).

	Formulation	Units	Subcutaneous injection	PLGA H 50% / ERS 50%	PLGA S 50% / ERS 50%	ERS 100%
Anti-Xa activity	C_{max}	anti-Xa $U.mL^{-1}$	0.98 ± 0.06	0.47 ± 0.12	0.59 ± 0.12	0.56 ± 0.16
	T_{max}	h	1	4	4	4
	AUC/kg_{0-24h}	anti-Xa $U.h.mL^{-1}.kg^{-1}$	1.11 ± 0.05	0.83 ± 0.32	1.67 ± 0.28	1.76 ± 0.27
	Relative F	%	100	19 ± 7 ■ ●	38 ± 6	40 ± 6
Anti-IIa activity	C_{max}	anti-IIa $U.mL^{-1}$	0.14 ± 0.02	0.07 ± 0.01 ■ ●	0.11 ± 0.04	0.10 ± 0.03
	T_{max}	h	1	4	4	4
	AUC/kg_{0-24h}	anti-IIa $U.h.mL^{-1}.kg^{-1}$	0.16 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.18 ± 0.05	0.26 ± 0.01
	Relative F	%	100	10 ± 2 ■ ●	27 ± 8 ●	40 ± 2

Relative F : Relative bioavailability

■ Statistically different from PLGA S 50%/ERS 50% at $P < 0.05$

▲ Statistically different from PLGA H 50%/ERS 50% at $P < 0.05$

● Statistically different from ERS 100% at $P < 0.05$

3.4.1. Anti-Xa activity

Following the subcutaneous injection, the maximal activity (0.98 anti-Xa U/mL) was reached after 1 hour. However, after 10 hours, none activity was detectable in the plasma. After oral administration of microparticles, anti-Xa activity profiles were clearly prolonged till 24 hours and a plateau between 2 and 6 hours was observed. The anti-Xa activities at T_{max} (i.e. 4 hours) ranged from 0.47 anti-Xa U/mL (PLGA H 50% / ERS 50%) to 0.59 anti-Xa/U/mL (PLGA S 50% / ERS 50%). However, although no statistical differences concerning anti-Xa activities between microparticles were found at the plateau phase, differences appeared in later intervals (8h, 10h and 24h). Indeed, PLGA S 50% / ERS 50% and ERS 100% microparticles showed a well sustained and high anti-Xa activity (0.29 and 0.23 anti-Xa U/mL at 10 hours, respectively), whereas PLGA H 50% / ERS 50% microparticles showed low value since 8 hours (0.05 anti-Xa U/mL) that was further reduced at 10 hours (0.03 anti-Xa U/mL).

Furthermore, anti-Xa activity areas under the curve were higher for PLGA S 50% / ERS 50% and ERS 100% microparticle samples (1.67 anti-Xa U.h.mL^{-1}.kg $^{-1}$ and 1.76 anti-Xa U.h.mL^{-1}.kg $^{-1}$, respectively) compared to the subcutaneous injection (1.11 anti-Xa U.h.mL^{-1}.kg $^{-1}$), but not for PLGA H 50% / ERS 50% microparticles (0.83 anti-Xa U.h.mL^{-1}.kg $^{-1}$). The resulting relative bioavailabilities were high for all the samples ranging between 19% (PLGA H 50% / ERS 50%) and 40% (ERS 100%): statistically significant differences were found for PLGA H 50% / ERS 50% when compared to PLGA S 50% / ERS 50% and ERS 100% microparticles.

3.4.2. Anti-IIa activity

After subcutaneous injection, the maximal activity (0.14 anti-IIa U/mL) was also reached at 1 hour and decreased till zero at 10 hours. As already found for anti-Xa activity profiles provided by microparticles, also anti-IIa activity profiles were prolonged when compared to the subcutaneous injection, with maximum activities at 4 hours. However, at the opposite of the anti-Xa activity results, the maximum anti-IIa activities for subcutaneous injection and oral microparticles were closer. Indeed, for microparticles, they varied between 0.07 anti-IIa U/mL (PLGA H 50% / ERS 50%) and 0.11 anti-IIa U/mL (PLGA S 50% / ERS 50%).

The anti-IIa activity areas under the curve were again higher for microparticle samples compared to the subcutaneous injection, with the exception of the PLGA H 50% / ERS 50% microparticles. These results led to relative bioavailabilities from 10% (PLGA H 50% / ERS 50%) to 40% (ERS 100%). Relative bioavailability of PLGA H 50% / ERS 50% microparticles was the lowest one and it was significantly different from PLGA S 50% / ERS 50% and ERS 100% microparticles. Furthermore, the relative bioavailability of the PLGA S 50% / ERS 50% microparticles (27%) was also found to be statistically different from the ERS 100% microparticles (40%).

3.4.3. *In vivo* anti-Xa/anti-IIa ratios

In vivo anti-Xa/anti-IIa ratios obtained after subcutaneous injection are presented in figure 4a. They were determined at times 0.25; 0.5; 0.75; 1; 2; 3; 4 and 6 hours, while those of microparticles were measured at times corresponding to the maximum values observed in anti-Xa and anti-IIa plasmatic activities, i.e. 2, 4 and 6 hours (figure 4b).

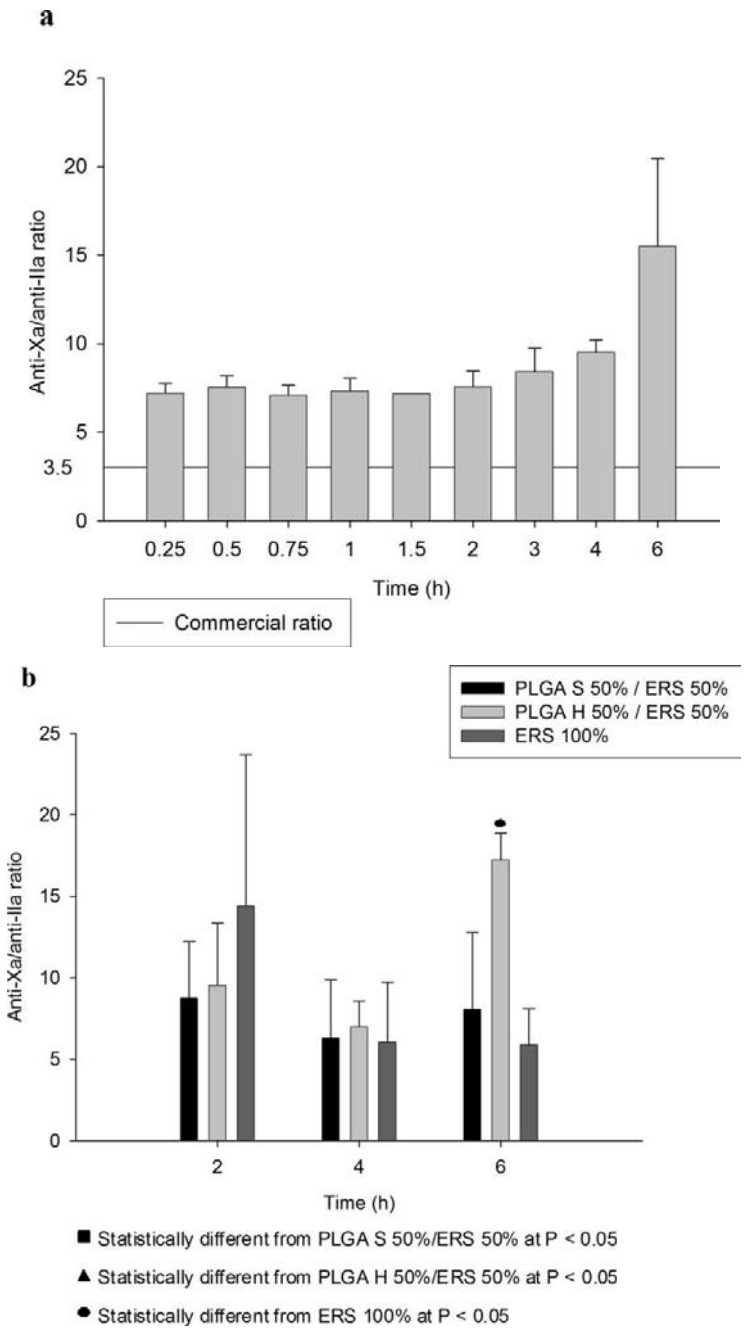


Figure 4 : (a) *In vivo* anti-Xa/anti-IIa activity ratio after subcutaneous administration in rabbits of a nadroparin solution (150 anti-Xa U/kg corresponding to 43 anti-IIa U/kg) **or (b) after oral administration of MP loaded with nadroparin** (600 anti-Xa U/kg corresponding to 161-170 anti-IIa U/kg, depending on the formulation) and prepared with a single non biodegradable polymer ERS (ERS 100%) or from blends with biodegradable polymer PLGA: PLGA H 50% / ERS 50% and PLGA S 50% / ERS 50%. Data are means ± SD (n = 3).

All obtained ratios values were higher than the commercial ratio of 3.5. Following subcutaneous injection, the ratio was stable within the interval from 0.25 to 2 hours with values varying between 7.08 and 7.56. Later on, the ratio values increased from 8.41 (at 3 hours) up to 15.50 (at 6 hours). Ratios obtained with microparticles showed a slight decrease at 4 hours and ranged between 5.89 (ERS 100%, 6 hours) and 17.22 (PLGA H 50% / ERS 50%, 6 hours).

Surprisingly, in the case of the ERS 100% microparticles it has to be noticed that their *in vitro* released ratio reached the highest value 44.07 at 2 hours, whereas their *in vivo* ratio was only 14.39 at the same time. On the other hand, *in vivo* ratios obtained with microparticles containing PLGA were higher than their *in vitro* ratios. For instance, oral administration of PLGA H 50% / ERS 50% microparticles led to an *in vitro* ratio of 5.46 at 2 hours whereas their *in vivo* ratio was 9.53 at the same time. Except for the ratio of PLGA H 50% / ERS 50% microparticles which was statistically different from that of ERS 100% microparticles at the same time, *in vivo* ratios obtained with microparticles did not statistically differ from each other.

4. Discussion

4.1. Preparation of microparticles

The choice of microparticles preparation method is based on the solubility of the active substance. Since LMWHs are highly soluble in water, the w/o/w double emulsion extraction technique was applied. This process involves two major steps: (i) droplets generation during the first emulsification step is followed (ii) by the solvent removal from the droplets during the second emulsification step leading to a precipitation of the polymer. Thus, manufacturing of small particles is based on preparation conditions leading to small size of droplets (e.g. strong sonication and a high mixing rate). Surface active components such as polyvinyl alcohol and/or Eudragit® RS are also necessary to stabilize the emulsion during the solvent extraction process [15]. Furthermore, the use of a relatively well-miscible water solvent (ethyl acetate) for the polymer dissolution leads to its rapid extraction by water during the second emulsification step. Solidification of the particles core occurs at the beginning of the second emulsion formation and limits the leakage of the very water soluble LMWH into the external aqueous phase.

Two kinds of PLGA were tested, i.e. PLGA uncapped (PLGA H) and PLGA endcapped (PLGA S). According to the supplier, the two types of PLGA exhibit equal viscosity and molecular weight, but they differ in their substituents. While the uncapped PLGA H keeps free acid-ending, PLGA S is substituted by an alkyl group. This ester bond is responsible for a longer degradation of PLGA S when compared to PLGA H with a potential slower release of the encapsulated drug.

4.2. *In vitro* characterization of microparticles

4.2.1. Entrapment efficiency

Entrapment efficiency (EE) is linked to the polymer composition of the matrix. Indeed, as heparins are known to bear the highest negative charge density of any biological macromolecules [16], the use of positively charged polymer, such as Eudragit® RS, allows creating electrostatic interactions that immobilize heparins chains in the matrix during the manufacturing process. Two mechanisms could explain nadroparin active chains immobilization in the particles: the encapsulation into the core of the particles as well as the adsorption by electrostatic interactions at their surface.

An Eudragit® RS quantity of 50% in the matrix appeared to be sufficient to obtain satisfactory entrapment efficiencies for anti-Xa as well as for anti-IIa activities (see Table 1). Thus, increased Eudragit® RS quantity (up to 100%) led only to slightly higher EE at almost 100%. However, the interaction between Eudragit® RS and heparin chains in the pure Eudragit® RS formulations could be stronger and/or more numerous compared to formulations containing 50% of Eudragit® RS due to the double amount of cationic charges in pure Eudragit® RS formulations.

Furthermore, better encapsulation of the anti-IIa activity in all samples compared to anti-Xa activity for the same composition is linked to the global charge of the different chains. Indeed, since all LMWH chains have the same charge density, the ACL chains have a higher global charge than BCL chains. Thus, more and stronger interactions between ACL chains and Eudragit® RS can be established and lead to the higher EE observed.

Results obtained with the two kinds of PLGA used, i.e. without (PLGA H) or with modification (PLGA S) on their acid terminus, indicate no influence on EE. Thus, it seems that the terminus of this polymer did not interact with the encapsulated nadroparin.

4.2.2. *In vitro* release of anti-Xa and anti-IIa activity

For all formulations a larger amount of anti-Xa activity was released compared to anti-IIa activity (see Figure 1) leading to an increase of the anti-Xa/anti-IIa ratio (see Figure 2). Thus the relative proportion of BCL chains released in the dissolution medium increased whereas ACL chains have been kept in the matrix. As mentioned previously, interactions between Eudragit® RS and BCL chains were probably reduced compared to the interactions with the ACL chains and led to their easier release by desorption. Furthermore, the small size of BCL chains allowed an easier diffusion through the polymer matrix from the core to the dissolution medium.

For ERS 100% microparticles, interactions between heparin chains and Eudragit® RS appeared strong. However, in on hand, considering a constant quantity of Eudragit® RS, ACL chains probably develop more interactions with this polymer than BCL chains due to their higher length and global charge. Thus, interactions between ACL chains and Eudragit® RS almost could not be broken (see Figure 1b) whereas BCL chains bearing the anti-Xa activity can break away from Eudragit® RS and diffuse more easily through the matrix. On the other hand, increasing Eudragit® RS quantity from 50% to 100% allowed to develop stronger interactions with ACL chains which could not be broken in *in vitro* conditions (see Figure 1b). It has to be noticed that interactions with BCL chains appear also as stronger than in the case of PLGA (H or S) 50% / ERS 50% formulations (see Figure 1a).

No differences between PLGA H and PLGA S matrices were observed *in vitro*. Both polymers have equal viscosity and molecular weight, but different terminus, that could cause their different degradation as mentioned above. If an active substance does not interact with the termini of PLGA, higher liberation rates are expected with uncapped PLGA, i.e. PLGA H as reported also in literature. However these experiments were carried out for *in situ* applications and a period of several weeks [17-20]. Short duration of our experiments, limited to a normal transit time, could explain why no differences have been found.

LMWH commercial dosage forms are characterized by their anti-Xa/anti-IIa ratio. In recent years, new LMWH appeared on the market with even higher anti-Xa/anti-IIa ratio than nadroparin, e.g. bemiparin which the ratio of 9.7. Thus the increase of the *in vitro* released ratio as observed after the encapsulation into our microparticles could be a potential advantage for a new dosage form. Consequently, the higher amount of BCL chains could be better absorbed through the intestinal wall due to their smaller size and global charge

compared to ACL chains. This is the reason why the prepared microparticles were administrated *in vivo* and compared to the commercial solution.

4.3 *In vivo* evaluation of anti-Xa and anti-IIa activities after subcutaneous injection

The injection of the commercial solution of nadroparin by subcutaneous route was used as a reference for the anti-Xa/anti-IIa ratio versus the time and for anti-Xa and anti-IIa activities as well (see Figure 4a).

As an artificial increase of the anti-Xa/anti-IIa ratio could be achieved when anti-IIa values tend towards 0, anti-Xa/anti-IIa ratio was determined just at the times when the anti-Xa and anti-IIa values were not too low (i.e. 0.2 for the anti-Xa activity and 0.02 for the anti-IIa activity).

Nadroparin anti-Xa and anti-IIa activities were both rapidly absorbed, demonstrating an important resorption of nadroparin chains. Profiles were typical of subcutaneous injections, anti-Xa and anti-IIa activities were observed during approximately 8 hours.

Plasma anti-Xa/anti-IIa ratios were higher than the commercial ratio of the injected solution. It means that BCL chains, at a given time, were i) better resorbed and/or ii) less degraded than ACL chains. These two phenomenons could be explained by the characteristics of nadroparin chains. Although permeation mechanism remain mostly unknown after subcutaneous injection, chains responsible for the anti-IIa activity, i.e. ACL chains, which are longer and more negatively charged than the BCL chains, will have major difficulties to diffuse through the viscous subcutaneous tissues and even more difficulties to cross the local capillaries membrane.

Furthermore, concerning the elimination of heparin chains, two different clearance mechanisms have been described [21, 22]. At therapeutic doses, the clearance of UFH, composed exclusively from ACL chains, is faster than that of LMWH due to different elimination mechanisms. Indeed, UFH chains are more bound than LMWH chains to plasma proteins as well as macrophage and endothelial cells. Their clearance occurred by a rapid and saturable mechanism mediated by macrophages and endothelial cells in which they were depolymerized whereas LMWH chains, which are smaller and less linked to plasmatic proteins and also macrophages and endothelial cells, are cleared predominantly by a slow and non saturable renal mechanism. Thus a slower absorption combined with a faster elimination

of the anti-IIa activity compared to the anti-Xa activity could explain the *in vivo* anti-Xa/anti-IIa ratios increase.

4.4 *In vivo* evaluation of anti-Xa and anti-IIa activities after oral administration of microparticles

Biological effect of nadroparin, detected in terms of anti-Xa and anti-IIa activities, is related to its absorption after its release from microparticles orally administered. In earlier studies [7, 23] it was confirmed that no activity occurred after the oral administration of heparin in the form of an aqueous solution, because heparin is rapidly altered by removal of sulfates in the acidic conditions and/or by the proteolytic enzymes of the gastrointestinal tract [24, 25].

The longer anti-Xa activity and anti-IIa activities (fig. 3) were related to the protection of nadroparin BCL and ACL chains inside the microparticles and their slower release. Indeed, microparticles are too large to be directly absorbed through the intestinal wall: particles with a diameter between 5 to 150 µm are not taken across the gut following an oral administration, except by persorption. However, this passive process that occurs only at a very low frequency could not explain by itself the presence of macromolecules such as LMWH in the blood stream [26].

Incomplete oral bioavailability of the anti-Xa and anti-IIa activities indicates that only a part of BCL and ACL chains reached the blood stream compared to the subcutaneous injection. However, it is clear that the polymeric system allows obtaining a high relative bioavailability, (up to 40%; Table 2) of this macromolecule with well-known poor absorption. This partial resorption seems to be dependent on the polymer matrix composition and physicochemical properties of BCL and ACL nadroparin chains.

Indeed, the profiles of anti-Xa and anti-IIa activities found were different: in all formulations, anti-Xa activities were well sustained between 2 and 6 hours (Fig. 3a) whereas anti-IIa activities reached a peak at 4 hours and decreased after (Fig.3b). As mentioned above, BCL chains have more chances to diffuse easily through the intestinal wall than ACL chains due to their smaller size and global charge. Thus the more difficult absorption combined to the higher clearance level of ACL chains that supports exclusively the anti-IIa activity, explains a less sustained plasma anti-IIa activity (from 2 to 6 hours) than that of anti-Xa activity. This leads to an increase of the *in vivo* anti-Xa/anti-IIa ratio during the peak period compared to *in vitro* results, with the exception of the ERS 100% formulation. These differences in various

chains absorption and elimination also explained why higher anti-Xa bioavailabilities than anti-IIa bioavailabilities were obtained for the same formulation.

Nevertheless ERS 100% formulation is the only one that leads to a lower anti-Xa/anti-IIa ratio *in vivo* (Fig. 4b) it provides the highest anti-Xa and anti-IIa bioavailabilities (Table 2). It was very surprising that this formulation showed very high levels of anti-IIa activity (and biovailability), since it released *in vitro* the lowest amount of ACL chains. Thus, two explanations are possible i) the *in vivo* conditions (enzymes, pH, natural surfactant,…) favoring the disruption of strong interactions between the polymer and ACL chains and/or ii) the nature of this Eudragit® RS polymer helping to the permeation of nadroparin chains in general and probably more especially the ACL chains.

Even if mechanisms of heparin absorption in these systems remain unclear for the anti-Xa activity and anti-IIa activity as well, polycationic compounds like chitosan have been described as good absorption enhancers [2] acting by tight junctions opening. A similar mechanism could be responsible for the important nadroparin ACL and BCL chains permeation observed with formulations containing Eudragit® RS. Furthermore, mucoadhesive properties of Eudragit® RS particles have been demonstrated earlier using resonant mirror system with simulation of mucus layer by mucin [27]. The initial release of nadroparin chains can also unmask positive charges of Eudragit® RS at microparticles surface and allowed its interaction with the negative charges of intestinal mucus. Such adherence of microparticles could create a concentration gradient favoring the permeation of nadroparin through gastro-intestinal membrane.

The addition of PLGA in the formulation (compared to pure Eudragit® RS formulations) was linked to a decrease of the relative bioavailability for both activities: anti-Xa as well as anti-IIa (Table 2). Since anti-Xa and anti-IIa levels released per one gram of a polymer *in vitro* were higher for PLGA containing formulations compared to pure Eudragit® RS formulation (Fig. 1a and 1b), the critical role of Eudragit® RS in the absorption mechanism was confirmed.

In PLGA containing formulations, *in vivo* anti-Xa/anti-IIa ratios were higher than *in vitro* anti-Xa/anti-IIa ratios. For example, at 2 hours, PLGA H 50% / ERS 50% formulation presented an *in vitro* ratio of 6.12 (fig. 2) whereas the *in vivo* ratio was 9.53 (fig. 3). Thus PLGA seems to favors BCL chains permeation compared to ACL chains. That was confirmed by the always higher anti-Xa relative bioavailability compared to anti-IIa bioavailability

(Table 2). However, this finding could also be related to i) a less efficient absorption enhancer effect of Eudragit® RS, due to its limited quantity in these formulations and/or ii) lower interactions with mucin leading to a decrease on the nadroparin concentration gradient through the intestinal wall.

Furthermore, a more sustained effect on the release was observed with PLGA S than PLGA H. Thus, the PLGA type also appears as an important parameter. Nature of the end termini of the PLGA can affect its degradation velocity *in vivo* compared to *in vitro* [28]: PLGA H degraded faster than PLGA S. Even if these differences were observed generally at more prolonged times, it is supposed that i) the higher hydrophilic nature of PLGA H may play a role in the *in vivo* release and resorption mechanisms of nadroparin chains and/or ii) the negative charge beared by the PLGA H could interfere with positively charged Eudragit® RS, and decrease the permeation enhancer properties of this polymer.

Finally, these results are promising in the development of an oral dosage form of heparin.

Concerning the anti-Xa activity, it was reported that a level of 0.2 anti-Xa U/mL exhibited an evident antithrombotic effect in rats [29]. Our microparticle delivery system always showed a higher anti-Xa activity level continuing from 6 hours (PLGA H 50% / ERS 50%) and up to 10 hours (PLGA S 50% / ERS 50% and ERS 100% formulations).

Nevertheless in clinical practice the doses of administered LMWH are based on the anti-Xa activity but it was demonstrated that the anti-IIa activity is also a critical issue of the detected anticoagulant response in term of thrombin generation *in vitro* and *in vivo* as well [12, 30]. Indeed, for any type of heparin, the capacity to inhibit the coagulation process in plasma is primarily determined by the concentration of ACL chains [31] directly linked to the anti-IIa activity. Sustained anti-IIa levels provided by orally administered microparticles (fig. 3b) reached values comparable to the peak value of subcutaneous injection (fig 3a). Thus it can be assumed that our formulation could have a comparable potential in the thrombin generation inhibition.

Furthermore, since the anti-Xa/anti-IIa ratio reflects the relative proportion between anti-Xa and anti-IIa activities, the maintenance of this ratio after oral administration of all tested microparticles (Fig.4b) in the same range as the ratios determined after subcutaneous injection (i.e. between 5 to 15, see fig.4a) is a sign that a good control of the *in vivo* effect of this delivery system could be expected.

Finally, an oral heparin dosage form was obtained based on well known materials. Indeed, on one hand, nadroparin is widely used in clinic practice with safety since many years and in the other hand, Eudragit® RS is pharmacopeia excipient [32]. Furthermore PLGA is a hydrolytically degradable polymer widely investigated for biomedical applications [33]. Thus, since we demonstrated that anti-Xa activities, anti-IIa activities and anti-Xa/anti-IIa ratio were satisfactory and well controlled, the proposed microparticle delivery system is clearly a promising candidate for a commercial dosage form of oral heparin. Further optimization of this oral heparin dosage form will still need a clear understanding of the absorption process mechanisms that is in progress in our group.

Our microparticulate delivery system presents a new dosage form of nadroparin that exhibits sustained plasmatic anti-Xa and anti-IIa activities and anti-Xa/anti-IIa ratios well controlled within the same range as after administration of subcutaneous injection. These levels are clearly clinically satisfactory for the treatment and the prophylaxis of deep venous thrombosis.

5. Bibliography

[1] V. Grabovac, T. Schmitz, F. Foger, A. Bernkop-Schnurch, Papain: an effective permeation enhancer for orally administered low molecular weight heparin. Pharm Res 24(5) (2007) 1001-1006.

[2] M. Thanou, S. Henderson, A. Kydonieus, C. Elson, N-sulfonato-N,O-carboxymethylchitosan: a novel polymeric absorption enhancer for the oral delivery of macromolecules. J Control Release 117(2) (2007) 171-178.

[3] Y. Ito, T. Kusawake, Y.V. Prasad, N. Sugioka, N. Shibata, K. Takada, Preparation and evaluation of oral solid heparin using emulsifier and adsorbent for in vitro and in vivo studies. Int J Pharm 317(2) (2006) 114-119.

[4] S.A. Mousa, F. Zhang, A. Aljada, S. Chaturvedi, M. Takieddin, H. Zhang, L. Chi, M.C. Castelli, K. Friedman, M.M. Goldberg, R.J. Linhardt, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral heparin solid dosage form in healthy human subjects. J Clin Pharmacol 47(12) (2007) 1508-1520.

[5] L.D. Kim SK, Lee E, Lee YK, Kim CY, Moon HT, Byun Y., Absorption study of deoxycholic acid-heparin conjugate as a new form of oral anti-coagulant. J Control Release 120(1-2) (2007) 4-10.

[6] P.Y. Hayes, B.P. Ross, B.G. Thomas, I. Toth, Polycationic lipophilic-core dendrons as penetration enhancers for the oral administration of low molecular weight heparin. Bioorg Med Chem 14(1) (2006) 143-152.

[7] V. Hoffart, A. Lamprecht, P. Maincent, T. Lecompte, C. Vigneron, N. Ubrich, Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. J Control Release 113(1) (2006) 38-42.

[8] Y. Jiao, N. Ubrich, V. Hoffart, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman, P. Maincent, Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. J Pharm Sci 91(3) (2002) 760-768.

[9] J. Choay, Structure and activity of heparin and its fragments: an overview. Semin Thromb Hemost 15(4) (1989) 359-364.

[10] H.C. Hemker, S. Beguin, in: H. Bounameux (Ed.), Low-molecular-weight heparins in prophylaxis and therapy of thromboembolic diseases (fundamental clinical cardiology series), Vol. 19, Editions Medicales Inter-nationales, New York, 1994, pp. 21-42.

[11] E. Gray, B. Mulloy, T.W. Barrowcliffe, Heparin and low-molecular-weight heparin. Thromb Haemost 99(5) (2008) 807-818.

[12] G.T. Gerotziafas, A.D. Petropoulou, E. Verdy, M.M. Samama, I. Elalamy, Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. J Thromb Haemost 5(5) (2007) 955-962.

[13] L. Javot, T. Lecompte, M. Rabiskova, P. Maincent, Encapsulation of low molecular weight heparins: Influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio. J Control Release In press (2009).

[14] A.N. Teien, M. Lie, Evaluation of an amidolytic heparin assay method: increased sensitivity by adding purified antithrombin III. Thromb Res 10(3) (1977) 399-410.

[15] Chernyshera Y.V., Babak V.G., Kildeeva N.R., Boury F., Benoit J.P., Ubrich N., Maincent P., Effect of the type of hydrophobic polymers on the size of nanoparticles obtained by emulsification-solvent evaporation. Mendeleev Communications 2 (2003) 65-68.

[16] I. Capila, R.J. Linhardt, Heparin-protein interactions. Angew Chem Int Ed Engl 41(3) (2002) 391-412.

[17] X. Luan, R. Bodmeier, In situ forming microparticle system for controlled delivery of leuprolide acetate: influence of the formulation and processing parameters. Eur J Pharm Sci 27(2-3) (2006) 143-149.

[18] W. Friess, M. Schlapp, Release mechanisms from gentamicin loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles. J Pharm Sci 91(3) (2002) 845-855.

[19] A. Jaklenec, A. Hinckfuss, B. Bilgen, D.M. Ciombor, R. Aaron, E. Mathiowitz, Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-beta 1 from PLGA microsphere-based scaffolds. Biomaterials 29(10) (2008) 1518-1525.

[20] S. Chhabra, V. Sachdeva, S. Singh, Influence of end groups on in vitro release and biological activity of lysozyme from a phase-sensitive smart polymer-based in situ gel forming controlled release drug delivery system. Int J Pharm 342(1-2) (2007) 72-77.

[21] J. Hirsh, K.A. Bauer, M.B. Donati, M. Gould, M.M. Samama, J.I. Weitz, Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest 133(6 Suppl) (2008) 141-159.

[22] G.R. Hetzel, C. Sucker, The heparins: all a nephrologist should know. Nephrol Dial Transplant 20(10) (2005) 2036-2042.

[23] Y. Jiao, N. Ubrich, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman, T. Lecompte, P. Maincent, In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. Circulation 105(2) (2002) 230-235.

[24] K.A. Jandik, D. Kruep, M. Cartier, R.J. Linhardt, Accelerated stability studies of heparin. J Pharm Sci 85(1) (1996) 45-51.

[25] M.Y. Ahn, K.H. Shin, D.H. Kim, E.A. Jung, T. Toida, R.J. Linhardt, Y.S. Kim, Characterization of a Bacteroides species from human intestine that degrades glycosaminoglycans. Can J Microbiol 44(5) (1998) 423-429.

[26] D.T. O'Hagan, The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery. J Anat 189 (Pt 3) (1996) 477-482.

[27] A. Lamprecht, P. Koenig, N. Ubrich, P. Maincent, D. Neumann, Low molecular weight heparin nanoparticles: mucoadhesion and behaviour in Caco-2 cells. Nanotechnology 17 (2006) 3673–3680.

[28] M.A. Tracy, K.L. Ward, L. Firouzabadian, Y. Wang, N. Dong, R. Qian, Y. Zhang, Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. Biomaterials 20(11) (1999) 1057-1062.

[29] P. Bianchini, G.L. Bergonzini, B. Parma, B. Osima, Relationship between plasma antifactor Xa activity and the antithrombotic activity of heparins of different molecular mass. Haemostasis 25(6) (1995) 288-298.

[30] R. al Dieri, S. Alban, S. Beguin, H.C. Hemker, Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. J Thromb Haemost 2(8) (2004) 1395-1401.

[31] R. Al Dieri, R. Wagenvoord, G.W. van Dedem, S. Beguin, H.C. Hemker, The inhibition of blood coagulation by heparins of different molecular weight is caused by a common functional motif--the C-domain. J Thromb Haemost 1(5) (2003) 907-914.
[32] Monograph 01/2008:2082, Ammonio methacrylate copolymer (type B). European Pharmacopea, 6th Edition (2009).
[33] Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. Prog Polym Sci 32 (2007) 762–98.

DISCUSSION GENERALE

L’héparine, actuellement administrée par voie parentérale, constitue la molécule de référence dans la prévention et le traitement des thromboses veineuses. Principalement en raison de sa masse moléculaire importante et de sa forte charge négative, cette molécule n’est pas absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal lorsqu’elle est administrée par voie orale, sous la forme d’une solution. Cependant, différents systèmes galéniques ont prouvé qu’il est possible d’administrer l’héparine *per os* : une grande majorité de ces systèmes utilise des promoteurs d’absorption permettant une ouverture des jonctions serrées de la muqueuse digestive. Une approche originale à base de particules polymériques a également été développée au sein de notre laboratoire. Ces systèmes présentent l’avantage majeur de n’administrer que des doses faibles d’héparine par comparaison à celles employées par les autres systèmes.

Cependant, toutes les études *in vivo* réalisées jusqu’à présent sur ce sujet évaluent uniquement l’activité anti-Xa plasmatique ou le temps de céphaline activée : aucune étude n’a déterminé l’activité anti-IIa plasmatique. Bien que la dispensation clinique des HBPM se fasse en pratique uniquement en terme d’activité anti-Xa, des études récentes [40, 212] ont démontré l’importance capitale de l’activité anti-IIa dans le processus d’inhibition de la thrombine. En effet, l’activité anti-IIa permet d’inhiber la génération de thrombine. Or ce sont les premières traces de thrombine produites qui sont à l’origine de l’activation et de l’amplification du phénomène de la coagulation. L’activité anti-Xa a un rôle plus modéré et intervient plus en aval : elle permet une modulation de la quantité de thrombine générée au cours de la phase de propagation.

Le rapport d’activité anti-Xa/anti-IIa, qui permet de quantifier l’importance relative des effets anti-Xa et anti-IIa, est un paramètre essentiel pour la caractérisation de l’activité des héparines. Ce paramètre peut être également utilisé afin d’étudier la proportion relative entre chaines courtes et chaines longues actives d’héparines.

En effet, les héparines sont constituées par un mélange hétérogène de chaines glycosaminoglycanes de tailles différentes, actives pour seulement un tiers d’entre elles. Parmi les chaines actives, c'est-à-dire les chaines qui possèdent la structure pentasaccharidique spécifique responsable de la liaison à l’antithrombine, toutes sont capables, par l’intermédiaire de l’antithrombine, d’inhiber le facteur Xa, alors que seules des chaines longues (c'est-à-dire de plus de 18 saccharides) sont capables d’inhiber le facteur IIa. Ainsi on distingue :

- des chaines actives courtes de moins de 18 saccharides (ou chaines BCL en anglais c'est-à-dire « Below the critical Chain Length ») capables de médier uniquement l'inhibition du facteur Xa.
- des chaines actives longues de plus de 18 saccharides (ou chaines ACL en anglais c'est-à-dire « Above the critical Chain Length ») capables de médier l'inhibition du facteur Xa et du facteur IIa.

Pour les HBPM, composées de chaines longues et courtes, le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa est compris entre 1,8 (cas de la tinzaparine) et 8 (cas de la bémiparine) : cela signifie que la proportion relative de chaines courtes/chaines longues est beaucoup plus élevée pour la bémiparine que pour la tinzaparine. En ce qui concerne les HNF, composées exclusivement de chaines longues, la valeur théorique de ce rapport est de 1.

Ainsi, le rapport anti-Xa/anti-IIa illustre les spécificités de chaque HBPM aussi bien en termes de composition que d'activité.

C'est pourquoi, dans le cadre des travaux autour du développement d'une forme orale microparticulaire d'héparine, nous avons choisi d'étudier dans un premier temps les activités anti-Xa et anti-II et de calculer le rapport anti-Xa/anti-IIa *in vitro* qui a été comparé au rapport de la solution commerciale (publication I). Il a ainsi pu être déterminé dans quelle mesure les étapes de fabrication des particules et de relarguage induisent une encapsulation et une libération préférentielle d'un des types de chaines. La comparaison du rapport anti-Xa/anti-IIa libéré par les microparticules à celui de l'héparine commerciale permet ainsi de savoir si les particules constituent une « nouvelle forme » d'HBPM (répartition et libération différentes des chaines ACL et BCL conduisant à un rapport modifié) ou s'il s'agit plutôt de la même HBPM administrée par voie orale (cas d'un rapport identique).

Suite à cette caractérisation qui a donné accès au potentiel réel *in vitro* anti-Xa/anti-IIa de notre forme, une administration *in vivo* a été réalisée afin de déterminer s'il existait une absorption intestinale préférentielle d'un des deux types de chaines (publication II).

Enfin, des études de localisation tissulaire de l'héparine marquée par fluorescence ainsi que des études de passage à travers un modèle *in vitro* d'épithélium basé sur les cellules Caco-2 ont été effectuées afin d'appréhender les mécanismes d'absorption intestinale de l'héparine véhiculée. Ces travaux ont permis de déterminer i) s'il existait une localisation tissulaire préférentielle de l'héparine traversant l'épithélium intestinal, ii) quelle est la perméabilité

apparente de l'héparine sur un modèle d'épithélium et iii) quelles sont les voies cellulaires de passage empruntées par cette molécule.

1. ETUDE IN VITRO

Nous avons préparé des microparticules chargées en HBPM selon une technique d'émulsification et d'extraction de solvant dite par double émulsion. Ces particules ont été fabriquées à partir d'un polymère non biodégradable polycationique (Eudragit® RS) seul ou en mélange avec un polymère biodégradable (copolymère d'acide lactique et glycolique, PLGA) aux ratios suivants : (25 : 75), (50 : 50), (75 : 25). Ces différents ratios de polymères ont été choisis afin de déterminer l'influence de la composition en polymère de la matrice sur l'encapsulation, la libération et l'absorption des chaines ACL et BCL d'héparine.

Deux types de PLGA différents ont été testés: le PLGA H et le PLGA S. Ces PLGA qui possèdent la même viscosité et la même masse moléculaire, différent uniquement par leur groupement terminal. En effet, le PLGA H est un PLGA « un-capped », c'est-à-dire qu'il n'a pas subi de modifications de son extrémité acide. En revanche, le PLGA S est un PLGA « end-capped » c'est-à-dire que son extrémité acide est substituée ; dans notre cas il s'agit d'une substitution par un groupement alkyle qui le rend ainsi plus hydrophobe que le PLGA H. Cette substitution a pour but de ralentir la dégradation du PLGA S en limitant l'entrée d'eau dans les formulations composées à base de ce polymère.

La méthode d'encapsulation par double émulsion (E/H/E) est une des techniques privilégiées permettant l'encapsulation de substances actives hydrophiles telles que les héparines. Une solution aqueuse de substance active est émulsionnée au moyen d'ultrasons dans une solution organique de polymère ce qui permet d'obtenir une première émulsion (E/H). Cette émulsion primaire est ensuite versée sous agitation mécanique dans un volume important d'une phase aqueuse contenant un tensio-actif permettant ainsi la formation de l'émulsion multiple (E/H/E). Les particules solides se forment suite à la précipitation du polymère dans la phase aqueuse après extraction du solvant organique, emprisonnant ainsi la substance active.

Différents points critiques sont à prendre en compte dans la réalisation d'une telle méthode [213] : i) l'émulsion doit être stabilisée afin d'éviter la coalescence des gouttelettes de polymère ii) il faut éviter au maximum la fuite de la substance active de la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe.

Dans notre cas, la stabilisation de l'émulsion passe par l'utilisation de composés aux propriétés tensio-actives (alcool polyvinylique dans la phase aqueuse externe et Eudragit® RS [214] en phase organique) et par l'utilisation de conditions d'agitation mécanique (hélice marine tournant à 1600 rpm durant 1 heure).

L'emprisonnement de la substance active au sein de particules polymériques permet de limiter la fuite de cette dernière vers la phase aqueuse externe. En effet, la phase organique agit comme une barrière qui limite la sortie de la substance active. Cet effet « barrière » est d'autant plus efficace que la substance active possède un faible coefficient de partage vis-à-vis de la phase organique, ce qui est le cas des héparines (coefficient de partage octanol/eau ($K_{o/w}$) d'environs 0,009 [108], correspondant à un log $K_{o/w} \approx -2$).

De plus, l'extraction du solvant organique par la phase aqueuse, qui conduit à la précipitation du polymère et donc à l'encapsulation de la substance active, doit être la plus rapide et totale possible afin d'éviter une fuite trop importante de la substance active vers la phase aqueuse. Dans notre cas, le solvant organique utilisé est l'acétate d'éthyle dont la solubilité dans l'eau est de 10% (v/v). Sachant qu'un volume de 5 mL d'acétate d'éthyle est utilisé lors de la mise en dissolution des polymères, le volume de phase aqueuse minimale nécessaire à son extraction est de 50 mL. Afin d'être dans des conditions non limitantes pour l'extraction et pour des raisons pratiques, un volume de phase externe de 400 mL, placé sous agitation mécanique durant 1 heure, a été utilisé.

Enfin, sur la base de certains travaux ayant démontré que l'administration par voie orale de substances actives peu perméables en présence de polyéthylène glycol (PEG) sous forme de solutions [215] mais également de microparticules [216] ou d'hydrogels [217] permettait une augmentation de leur biodisponibilité, une co-encapsulation de PEG 4000 (concentration de 10 mg/mL) et d'héparine a été réalisée dans des microparticules fabriquées suivant la méthode décrite précédemment, en utilisant le PLGA (H ou S) et l'Eudragit® RS dans un rapport (50 : 50). Ces formulations sont nommées de la façon suivante dans le texte : PLGA H 50% / ERS 50% + PEG et PLGA S 50% / ERS 50% + PEG.

1.1 ETUDE DE LA TAILLE DES MICROPARTICULES

La taille des particules, mesurée par diffraction laser (Mastersizer X, Malvern Instrument), est présentée dans le tableau 1 de la publication I.

La taille des particules sans héparine est inférieure (comprise entre 17 et 63 µm) à celle des microparticules encapsulant de l'héparine (comprise entre 43 à 98 µm). Les propriétés tensioactives de l'Eudragit® RS [214] semblent responsables de la faible taille des microparticules non chargées en héparines. En effet, dans le cas des microparticules chargées, l'existence d'interactions électrostatiques entre les nombreuses charges négatives de l'héparine et les groupements ammonium quaternaire de l'Eudragit® RS est probablement responsable d'une déstabilisation de l'effet tensioactif de cet excipient, conduisant ainsi à l'obtention de particules plus grosses et moins monodisperses.

1.2 TAUX D'ENCAPSULATION

1.2.1 CONSIDERATIONS SUR LES ACTIVITES ANTI-Xa ET ANTI-IIa

Le taux d'encapsulation a été déterminé à la fois par une méthode chimique qui détecte uniquement la présence de chaines de glycosaminoglycanes (actives ou non) et par des méthodes biologiques qui permettent de quantifier l'activité inhibitrice des héparines sur le facteur IIa et le facteur Xa de la cascade de la coagulation.

Il est important de garder en tête que la quantité d'héparine introduite lors de l'étape de fabrication est systématiquement de 5 000 unités anti-Xa pour 250 mg de polymère (soit 20 000 unités anti-Xa/g de polymère). Nous nous sommes basés sur une dose exprimée en unités anti-Xa étant donné que, du point de vue thérapeutique, les héparines sont administrées dans cette unité et non en unités anti-IIa. Ce choix permet aussi une comparaison aisée avec les autres systèmes de délivrance des héparines administrés par voie orale, aucun d'entre eux n'ayant en effet effectué d'évaluation de l'activité anti-IIa.

Cependant, considérant une quantité anti-Xa fixe, les solutions commerciales de nadroparine et de tinzaparine, de part leur rapports anti-Xa/anti-IIa différents (1,8 pour la tinzaparine et 3,5 pour la nadroparine), ne contiennent pas la même quantité d'unités anti-IIa. Ainsi, quand 5 000 unités anti-Xa de la solution de tinzaparine sont utilisées, 5 000 / 1,8 = 2 778 unités anti-IIa sont prélevées. Dans le cas de la nadroparine, seules 5 000 / 3,5 = 1 426 unités anti-IIa sont prélevées. Ainsi, même si on conserve une homogénéité en termes d'unités anti-Xa utilisées lors de la fabrication des microparticules de nadroparine et de tinzaparine, on introduit inévitablement un biais en ce qui concerne les activités anti-IIa. Tout cela est dû à la grande hétérogénéité de composition des héparines en termes de longueur de chaines : la

nadroparine possède une fraction de chaines BCL (c'est-à-dire courtes) plus importante que la tinzaparine. La tinzaparine possède la particularité d'être une HBPM de rapport anti-Xa/anti-IIa très bas : cela signifie que son comportement à tendance à tendre vers celui d'une HNF, de par la présence d'une importante population de chaines ACL (c'est-à-dire longues).

C'est pour toutes ces raisons que les systèmes « microparticules de nadroparine » et « microparticules de tinzaparine » sont à considérer comme deux systèmes galéniques distincts. De ce fait, toute comparaison directe est donc difficile à établir.

Enfin, cela est encore accentué par le fait que les chaines de nadroparine et de tinzaparine, obtenues par des méthodes de préparation différentes (dépolymérisation chimique pour la nadroparine et enzymatique dans le cas de la tinzaparine), possèdent des sucres terminaux spécifiques, à la réactivité chimique potentiellement différente. Ainsi, dans le cas des chaines de nadroparine, un 2,5-anhydro-D-mannose et un acide idopyranosuronique sont présents aux extrémités réductrices et non réductrices, respectivement, alors que dans le cas des chaines de tinzaparine, se trouvent un acide uronique insaturé et une glucosamine.

1.2.2 OBSERVATIONS

Qu'ils soient évalués par méthode biologique ou chimique, les valeurs de taux d'encapsulation sont assez similaires et évoluent selon les mêmes tendances (tableau 1 et 2, publication I). Ainsi, afin de ne pas être redondant, un commentaire des résultats obtenus par méthode biologique, sera uniquement présenté ici (pour plus de détails en ce qui concerne les valeurs des dosages chimiques, se référer à la publication I).

Que ce soit dans le cas de la nadroparine ou de la tinzaparine, **les taux d'encapsulation anti-Xa et anti-IIa sont relativement élevés (excepté dans le cas de la formulation PLGA 75% / ERS 25%)** : ils sont ainsi compris entre 83 et 91% (activité anti-Xa) et 94 et 99% (activité anti-IIa) dans le cas de la nadroparine et entre 70 et 88% (activité anti-Xa) et 84 et 94% (activité anti-IIa) pour la tinzaparine (Tableau 10). La méthode d'encapsulation choisie semble donc efficace. Cela peut être expliqué par i) les différents paramètres de formulation évoqués précédemment (faible $K_{o/w}$) ii) l'établissement d'interactions électrostatiques entre les charges négatives des chaines d'héparines et les charges positives des Eudragit® RS.

Nous avons également constaté que, **pour une même formulation, « l'activité anti-IIa » est systématiquement mieux encapsulée que « l'activité anti-Xa »**. Ainsi, pour les

microparticules ERS 100% de nadroparine, le taux d'encapsulation de l'activité anti-Xa est de 90% contre 99% pour l'activité anti-IIa, conduisant à un rapport anti-Xa/anti-IIa de 3,20 (Tableau 10). Comme l'activité anti-IIa est portée exclusivement par les chaines ACL (c'est-à-dire des chaines longues), et que ces chaines possèdent la même densité de charge que les chaines BCL (c'est-à-dire des chaines courtes), leur charge négative globale est donc plus importante. Cela leur permet de créer probablement des interactions électrostatiques plus fortes et/ou plus nombreuses avec l'Eudragit® RS : elles sont ainsi mieux retenues au niveau de la matrice de polymère lors de l'étape de fabrication des microparticules. Cela permet d'expliquer que le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa retrouvé au sein des microparticules est légèrement diminué par comparaison avec le rapport de la solution commerciale utilisée lors de la préparation.

En ce qui concerne la composition en polymère des microparticules, nous avons montré qu'au sein de la formulation, une **quantité minimale en Eudragit® RS (de 50%) est nécessaire à une forte encapsulation des chaines d'héparines (que ce soit pour la tinzaparine comme pour la nadroparine)**. En effet, comme mentionné précédemment, les taux d'encapsulation obtenus avec les formulations PLGA 75% / ERS 25% sont plus faibles par comparaison avec les taux d'encapsulation issus des autres formulations. Cependant, si la diminution de la quantité d'Eudragit® RS au sein de la matrice, avec en parallèle l'augmentation de la quantité de PLGA, conduit à une diminution très légère de l'encapsulation de la nadroparine (65% pour l'activité anti-Xa et 75% pour l'activité anti-IIa), en revanche dans le cas de la tinzaparine la diminution est beaucoup plus nette (34% pour l'activité anti-Xa et 59% pour l'activité anti-IIa).

TABLEAU 10 : EFFETS DE LA MICROENCAPSULATION DE LA TINZAPARINE ET DE LA NADROPARINE SUR LEURS ACTIVITES ANTI-Xa, ANTI-IIa ET SUR LE RAPPORT ANTI-Xa / ANTI-IIa.

Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne ± écart-type (n=3).

		Nadroparine					Tinzaparine				
Type de PLGA	Composition en polymère des microparticules	Rapport anti-Xa/anti-IIa	Activité anti-Xa		Activité anti-IIa		Rapport anti-Xa/anti-IIa	Activité anti-Xa		Activité anti-IIa	
			TE (%)	Teneur (U. a-Xa/g polymère)	TE (%)	Teneur (U. a-IIa/g polymère)		TE (%)	Teneur (U. a-Xa/g polymère)	TE (%)	Teneur (U. a-IIa/g polymère)
	Solution commerciale*	3,50	-	-	-	-	1,80	-	-	-	-
	ERS 100%	3,20 ± 0,07	90 ± 2	18 052 ± 395	99 ± 0	5 633 ± 12	1,69 ± 0,06	88 ± 3	17 635 ± 534	94 ± 0	10 455 ± 37
PLGA S	PLGA S 25% / ERS 75%	3,13 ± 0,08	87 ± 3	17 377 ± 683	97 ± 1	5 551 ± 70	1,61± 0,04	83 ± 4	16 576 ± 804	92 ± 2	10 260 ± 242
	PLGA S 50% / ERS 50%	3,02 ± 0,16	83 ± 3	16 572 ± 688	94 ± 2	5 503 ± 253	1,51 ± 0,04	72 ± 4	14 499 ± 838	87 ± 3	9 613 ± 314
	PLGA S 75% / ERS 25 %	3,13 ± 0,74	65 ± 5	13 021 ± 1,062	75 ± 12	4 263 ± 703	1,02 ± 0,06	34 ± 4	6 717 ± 848	59 ± 4	6 576 ± 415
PLGA H	PLGA H 25% / ERS 75%	3,25 ± 0,05	91 ± 2	18 185 ± 311	98 ± 0	5 593 ± 23	1,66 ± 0,01	84 ± 1	16 863 ± 232	92 ± 1	10 184 ± 95
	PLGA H 50% / ERS 50%	3,15 ± 0,15	85 ± 3	17 037 ± 600	95 ± 1	5 405 ± 36	1,50 ± 0,00	70 ± 0	13 913 ± 90	84 ± 1	9 295 ± 74
	PLGA H 75% / ERS 25 %	2,94 ± 0,14	72 ± 5	14 381 ± 909	85 ± 2	4 881 ± 107	1s,20 ± 0,19	35 ± 7	6 944 ± 1,376	52 ± 2	5 823 ± 201

TE-taux d'encapsulation
* d'après le fabricant
U.a-Xa (IIa)/g polymère : unités anti-Xa (IIa) par gramme de polymère

Cette différence de comportement marquée entre nadroparine et tinzaparine a permis de mettre en évidence l'existence d'une **affinité différente des chaines de tinzaparine et des chaines de nadroparine pour le PLGA**.

Ainsi les chaines de tinzaparine (en particulier les chaines BCL) semblent avoir une affinité très limitée pour le PLGA. Cela est particulièrement observable dans le cas de la formulation PLGA 75% / ERS 25% : la faible quantité d'Eudragit® RS permet probablement de retenir préférentiellement les chaines ACL, plus chargées, que les chaines BCL. Les chaines BCL non retenues par l'Eudragit® RS ne le sont probablement pas non plus par le PLGA, et ce, indépendamment de la nature du PLGA (H ou S) : cela explique le très faible taux d'encapsulation de l'activité anti-Xa. Cette hypothèse a été confirmée par les tentatives de réalisation de microparticules de formule PLGA 100%, qui bien que décevantes en terme de qualité des microparticules formées (nous avons obtenu des filaments plutôt que des particules sans changer les conditions de fabrication), ont conduit à une absence d'encapsulation totale pour la tinzaparine et à une encapsulation partielle dans le cas de la nadroparine (50% et 52% d'encapsulation pour l'activité anti-Xa pour les formulations PLGA H 100% et PLGA S 100% respectivement).

Ainsi, il semble que les chaines de tinzaparine n'ont qu'une affinité très limitée, voire aucune affinité avec le PLGA : au sein de la formulation PLGA (H ou S) 75% / ERS 25%, il semblerait donc que ce soit l'Eudragit® RS qui soit principalement responsable de l'encapsulation. Au contraire, dans le cas de la nadroparine, les chaines ont une affinité pour le PLGA : il existe donc probablement une répartition des chaines entre le PLGA et l'Eudragit® RS permettant l'obtention de taux d'encapsulation supérieurs à ceux de la tinzaparine, dans le cas spécifique de ce ratio polymérique.

En ce qui concerne la présence de PEG dans la phase aqueuse interne, des taux d'encapsulation des activités anti-Xa et anti-IIa de la nadroparine proches de ceux issus des mêmes formulations sans PEG ont été obtenus. Par exemple, dans le cas de la formulation PLGA S 50% / ERS 50% de nadroparine, un taux d'encapsulation de l'activité anti-Xa de 94 % est observé. En présence de PEG ce taux est alors de 96% (Tableau 12, annexe). **Il ne semble donc pas que la présence de PEG influe sur le processus d'encapsulation** contrairement à ce qui a été montré par Péan et coll. [218]. Cela peut être du à la nature protéique de la substance active utilisée lors de leur étude : en effet, pendant l'encapsulation, le PEG s'adsorbe à l'interface de la phase aqueuse et de la phase organique, ce qui limite alors

la dénaturation de la protéine en empêchant son contact avec la phase organique. Etant donné que notre substance active est non protéique, les taux d'encapsulation observés sont importants en présence ou non de PEG. Dans notre étude, cette molécule n'a pas été sélectionnée dans le but de protéger la substance active mais plutôt pour ses propriétés d'amélioration de l'absorption intestinale.

1.3 CINETIQUES DE LIBERATION

1.3.1. DOSAGE PAR METHODE CHIMIQUE

L'annexe contient des récapitulatifs des profils de libération de la nadroparine et de la tinzaparine des différentes microparticules, dosés par la méthode chimique. Ces résultats peuvent être soit exprimés sous forme de la quantité d'unités d'héparine libérée par gramme de polymère (Figure 55, annexe) ou soit sous forme du pourcentage d'héparine libérée (Figure 56, annexe).

Une partie de ces données (Figure 55 (C et D), annexe), a déjà été présentée dans la publication I (Figure 1) : il s'agit de ceux obtenus avec les microparticules contenant du PLGA S et exprimés en unités libérées/g de polymère.

Les résultats exprimés en **pourcentage de libération** (Figure 56, annexe) montrent qu'il existe une influence forte de la composition en polymère de la forme sur la libération : **plus la quantité d'Eudragit® RS est importante et plus la quantité relative d'héparine libérée est faible.**

Cependant, si ceci est particulièrement flagrant dans le cas de la nadroparine (Figure 56 (A et C)), le phénomène est moins marqué dans le cas de la tinzaparine (Figure 56 (B et D)) : en effet, dans le cas de la tinzaparine un tassement des différentes courbes de libération est constaté. Dans ce cas, les profils de libération sont très semblables et un plateau compris entre 40 et 60% est observé à 24 heures, quelle que soit la formulation (Figure 56, annexe).

Ceci confirme donc l'hypothèse du partage des chaines entre les polymères selon laquelle les chaines de tinzaparine possèdent une affinité très limitée pour le PLGA mais forte pour l'Eudragit® RS : la libération des chaines de tinzaparine s'effectuerait alors principalement par rupture des interactions électrostatiques établies avec l'Eudragit® RS. En revanche, dans le cas de la nadroparine, les chaines se répartissant entre le PLGA et l'Eudragit® RS, la

libération est probablement le résultat de deux phénomènes : la rupture de ces interactions électrostatiques et la diffusion des chaines au sein de la matrice de PLGA.

En ce qui concerne la libération, on peut observer une différence de comportement légère en fonction du type de PLGA utilisé lors de la fabrication. Cette différence est surtout visible dans le cas de la tinzaparine (Figure 56 (B et D), annexe). Il semble en effet que la libération de l'héparine de microparticules contenant du PLGA S soit plus facile et importante que dans le cas des microparticules fabriquées à partir de PLGA H : ainsi, il apparait que les chaines de tinzaparine ont une affinité supérieure pour le PLGA H par comparaison avec le PLGA S. Ceci a déjà été observé dans le cas de formulations contenant une forte proportion en PLGA : en effet, il existe une encapsulation préférentielle des chaines de tinzaparine au sein de microparticules de formulation PLGA H 75% / ERS 25% (39%, tableau 1, publication I) par rapport à la formulation PLGA S 75% / ERS 25% (22%, tableau 1, publication I). Cet effet est observé de façon beaucoup plus modérée pour la nadroparine (Figure 56 (A et C), annexe) : cela s'explique par le fait que l'affinité de la nadroparine pour le PLGA S n'apparait pas comme limitée, contrairement à celle de la tinzaparine, probablement en raison des différences de structures entre chaines de nadroparine et chaines de tinzaparine.

Enfin, la présence de PEG, introduit dans la phase aqueuse interne lors de la fabrication, n'induit pas de différences de profils de libération (Figure 56 (A et C), annexe). Péan et coll. ont démontré que la co-encapsulation de PEG (à une quantité supérieure à celle utilisée dans cette étude) n'affecte pas la structure de microparticules de PLGA également fabriquées selon la méthode de la double émulsion [218]. Il est donc envisageable que les faibles quantités de PEG utilisées dans notre étude ne modifient pas fondamentalement la structure des particules expliquant qu'il n'y ait ni variations de l'encapsulation ni variations de la libération.

1.3.2. DOSAGE PAR METHODE BIOLOGIQUE

Les résultats montrent qu'il existe une différence importante de comportement entre microparticules de nadroparine (Figure 50 pour les formulations à base de PLGA S et Figure 57 (annexe) pour les formulations à base de PLGA H) et microparticules de tinzaparine (Figure 51 pour les formulations à base de PLGA S et Figure 58 (annexe) pour les formulations à base de PLGA H).

Dans le cas de la **nadroparine**, il a été constaté que plus la quantité en PLGA est importante, plus la libération des activités anti-Xa et anti-IIa est élevée (Figure 50 (A et B)). Cependant, il

existe une différence de comportement entre l'activité anti-Xa et l'activité anti-IIa : la présence de quantités importantes d'Eudragit® RS limite fortement la sortie des chaines longues responsables de l'activité anti-IIa (Figure 50 (A)) alors qu'elle assure en parallèle la libération d'une quantité importante d'activité anti-Xa (Figure 50 (B)). Par exemple, pour les microparticules de nadroparine de formulation PLGA S 50% / ERS 50%, une quantité de 8 522 unités anti-Xa/g de polymère et de 2 047 unités anti-IIa/g de polymère est libérée à 24 heures (Figure 50 (A et B)), ce qui correspond respectivement à 50% et 29% des quantités encapsulées. Comme la quantité d'unités anti-Xa libérée est plus importante que la quantité d'unités anti-IIa, nous observons une augmentation du rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa, qui dans cet exemple est de 4,75 (Figure 50 (C)). En revanche, dans le cas de la formulation ERS 100%, bien que la quantité d'unités anti-Xa libérée à 24 heures reste relativement élevée (6 001 unités anti-Xa/g de polymère) on constate en parallèle un effondrement de la libération des unités anti-IIa (145 unités anti-IIa libérées/g de polymère) (Figure 50 (A et B)) ce qui conduit à une augmentation très importante du rapport anti-Xa/anti-IIa à la valeur de 45 (Figure 50 (C)).

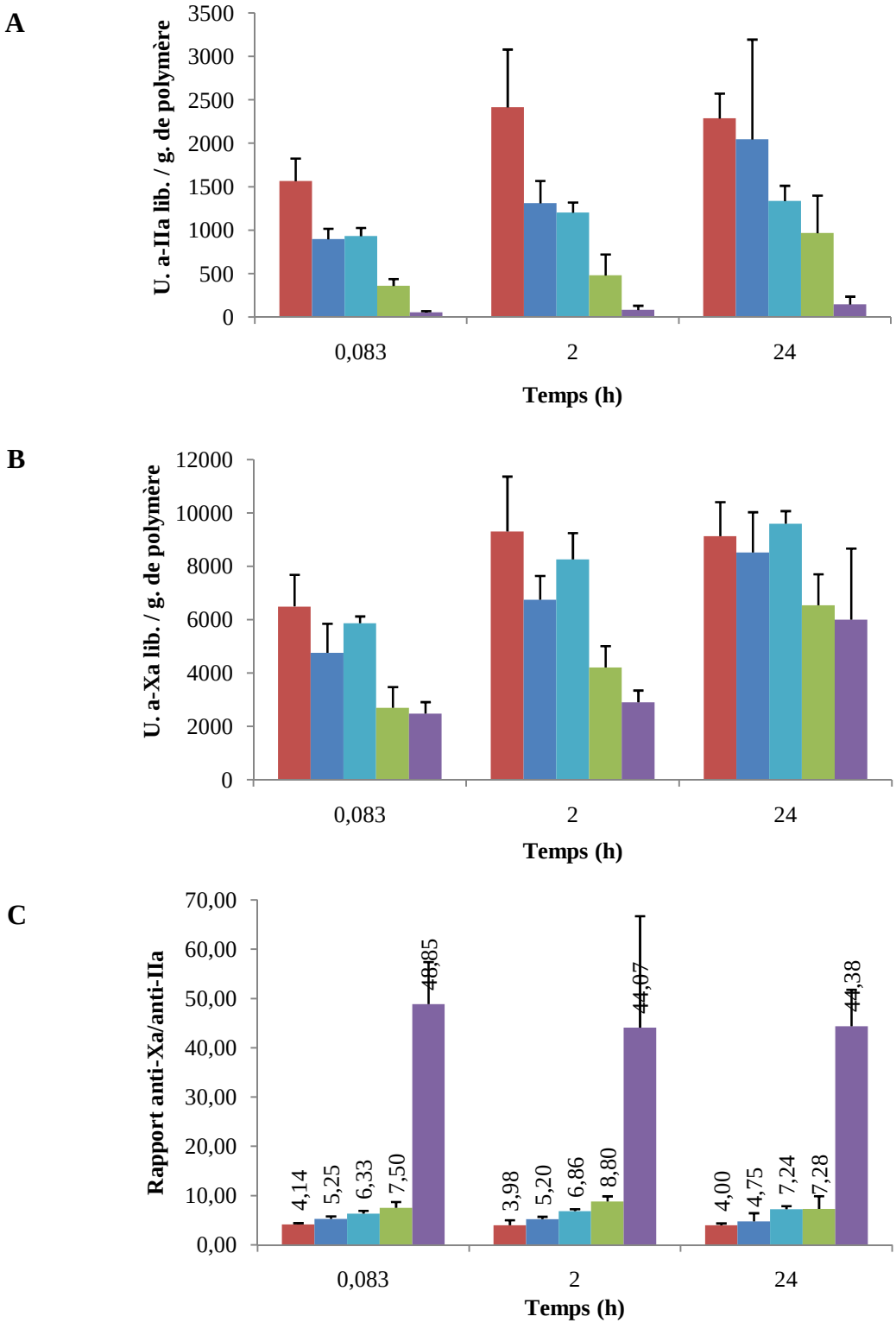


FIGURE 50 : (A) ACTIVITES ANTI-IIa ET (B) ANTI-Xa ET (C) RAPPORT ANTI-Xa/ANTI-IIa LIBERES *IN VITRO* DE MICROPARTICULES DE NADROPARINE FORMULEES A PARTIR D'EUDRAGIT® RS SEUL OU EN MELANGE AVEC DU PLGA S (n=3).

Légende : ■ PLGA S 75% / ERS 25%, ■ PLGA S 50% / ERS 50%, ■ PLGA S 50% / ERS 50% + PEG, ■ PLGA S 25% / ERS 75%, ■ ERS 100%.

Ainsi, les microparticules de nadroparine sont responsables d'une meilleure libération des chaines BCL par rapport aux chaines ACL conduisant à un rapport anti-Xa/anti-IIa augmenté. Cette augmentation du rapport est liée à celle de la quantité d'Eudragit® RS au sein de la formulation. Ainsi dans le cas de la formulation ERS 100%, les chaines ACL de nadroparine sont donc intégralement fixées de façon forte à l'Eudragit® RS, empêchant ainsi leur libération ; alors que les chaines BCL, qui établissent des interactions probablement moins fortes avec ce polymère, de par leur taille et leur charge inférieures, sont libérées en partie. Lors de la diminution de la quantité d'Eudragit® RS au sein de la formulation, comme la quantité d'héparine introduite ne varie pas, l'Eudragit® RS va être saturé : les chaines qui ne vont plus pouvoir être fixées à ce polymère vont alors se retrouver encapsulées dans le PLGA, elles sont ainsi plus aisément libérées. Comme l'Eudragit® RS établit de façon préférentielle des interactions avec les chaines ACL, sa diminution va donc principalement influencer leur libération qui devient plus facile à partir du PLGA : cela explique que quand la quantité d'Eudragit® RS diminue, le rapport anti-Xa/anti-IIa diminue également.

En ce qui concerne l'effet du PEG co-encapsulé avec l'héparine au sein des microparticules, il semble induire une diminution de la libération des chaines ACL par rapport aux formulations sans PEG, conduisant ainsi à une augmentation très modérée du rapport anti-Xa/anti-IIa (Figure 50 (C)). Cependant, au vu des écart-types observés avec les quantités d'activités anti-Xa et anti-IIa libérées des formulations PLGA S 50% / ERS 50% avec et sans PEG (Figure 50 (B et C)), ces différences n'apparaissent pas comme importantes. Comme supposé précédemment, les étapes d'encapsulation et de libération *in vitro* ne semblent pas être influencées par les faibles quantités de PEG utilisées.

Tout comme pour la nadroparine, il a été constaté avec la **tinzaparine** que l'augmentation de la quantité de PLGA est corrélée avec une augmentation de la libération des activités anti-Xa et anti-IIa. Cependant, **si les quantités d'activité anti-Xa libérées sont équivalentes à celles de la nadroparine** (comprise entre 1 327 (ERS 100%, 0,083 h) et 6 830 (PLGA S 50% / ERS 50%, 2h) unités anti-Xa g de polymère), **en revanche les quantités anti-IIa libérées sont supérieures** (comprises entre 308 (ERS 100% 0,083h) et 2 406 (PLGA S 50% / ERS 50%, 24h) unités anti-IIa / g de polymère).

Ainsi, en comparaison du rapport anti-Xa/anti-IIa de la solution commerciale de valeur 1,8, le rapport anti-Xa/anti-IIa de la tinzaparine, libéré dans le milieu de dissolution, est plus élevé (2,76 pour la formulation PLGA S 50% / ERS 50% à 24h, Figure 51 (C)). Cependant,

contrairement à la nadroparine, cette augmentation n'atteint pas des valeurs très importantes car l'activité anti-IIa est toujours libérée en quantités suffisantes, non négligeables, même dans les formulations contenant beaucoup d'Eudragit® RS : ainsi les microparticules d'ERS 100% libèrent 1 667 unités anti-IIa / g de polymère après 24 heures de dissolution alors que celles de nadroparine n'en libèrent que 145.

De plus, il existe un équilibre relatif de la proportion de chaines ACL/BCL qui sont libérées des microparticules de tinzaparine : le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa prend systématiquement des valeurs relativement proches (2,99 ; 2,76 ; 4,03 et 3,62 à 24h pour les formulations PLGA S 75% / ERS 25% ; PLGA S 50% / ERS 50% ; PLGA S 25% / ERS 75% et ERS 100%, respectivement (Figure 51 (C)), bien que les quantités totales libérées exprimées en unités brutes soient différentes d'une formulation à l'autre (Figure 51 (A et B)).

Ainsi, il a été supposé que le mécanisme de sortie des chaines ACL et BCL de tinzaparine des microparticules est identique : il semble que comme les chaines ACL et BCL sont encapsulées principalement au niveau de l'Eudragit® RS, leur libération intervient par un mécanisme similaire (rupture d'interactions électrostatiques).

La libération plus importante des chaines ACL de tinzaparine, par rapport aux chaines ACL de nadroparine, serait due au fait que ces chaines sont introduites en plus grande quantité lors de la fabrication. Ainsi, même si une partie d'entre elles est bien encapsulée au sein de la matrice, une autre partie doit probablement être encapsulée par des interactions moins fortes (comme pour les chaines BCL), ce qui expliquerait leur libération.

Enfin, **la nature du PLGA utilisé (H ou S), n'influence pas la libération de la tinzaparine** (Figure 58 (annexe) et Figure 51) **et de la nadroparine** (Figure 57 (annexe) et Figure 50). Dans la mesure où une substance active n'interagit pas avec le PLGA au niveau de son extrémité acide, des taux de libération supérieurs ont été reportés dans la littérature en ce qui concerne le PLGA « un-capped » (PLGA H) [219-222]. Cependant, ces expériences ont été menées avec des particules formulées selon un procédé différent. Destinées à être formées *in situ* pour des applications parentérales, ces particules ont été testées sur des périodes de plusieurs semaines. La durée limitée de nos expériences de dissolution, calquée sur celle d'un temps de transit intestinal normal de 24 heures, peut expliquer qu'aucune différence n'ait été observée entre ces deux PLGA.

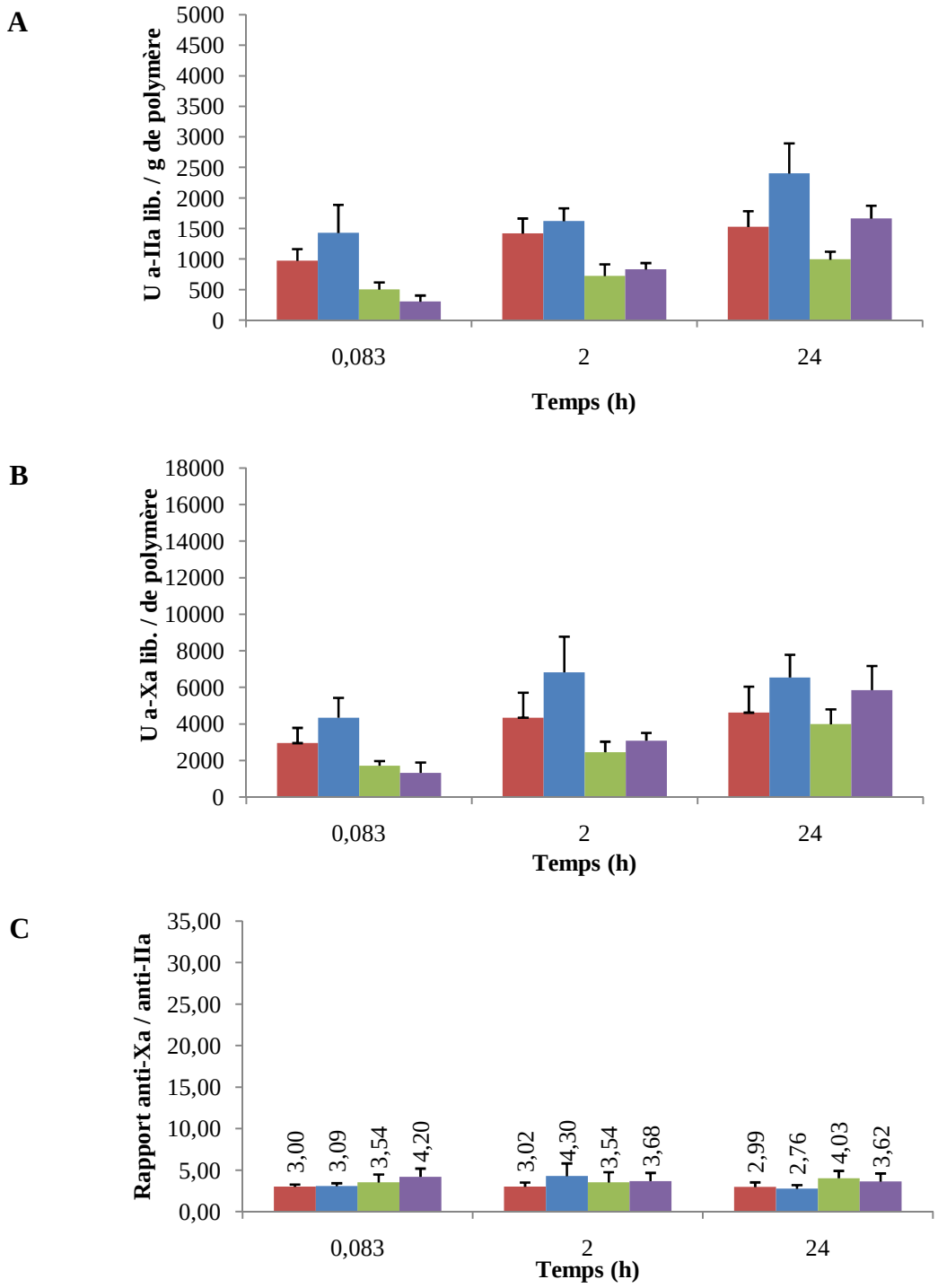


FIGURE 51 : (A) ACTIVITES ANTI-IIa ET (B) ANTI-Xa ET (C) RAPPORT ANTI-Xa/ANTI-IIa LIBERES *IN VITRO* DE MICROPARTICULES DE TINZAPARINE FORMULEES A PARTIR DE L'EUDRAGIT® RS SEUL OU EN MELANGE AVEC LE PLGA S (n=3).

Légende : PLGA S 75% / ERS 25%, PLGA S 50% / ERS 50%, PLGA S 25% / ERS 75%, ERS 100%

2 ETUDE *IN VIVO*

L'étape de caractérisation *in vitro* des nombreuses formulations en termes d'activités anti-Xa, anti-IIa et de rapport anti-Xa/anti-IIa nous a permis de sélectionner certaines d'entre elles pour les études *in vivo*. Le but étant d'étudier l'absorption des chaines BCL et ACL par l'intermédiaire de l'évaluation du rapport anti-Xa/anti-IIa plasmatique, il est apparu important de tester des formulations permettant d'obtenir *in vitro* soit des rapports anti-Xa/anti-IIa très élevés signant une libération quasi-nulle des chaines ACL (cas de la formulation ERS 100% encapsulant la nadroparine) ou au contraire des formulations avec des rapports plutôt bas montrant une libération importante à la fois des chaines BCL et des chaines ACL (cas de la formulation PLGA S 75% / ERS 25% encapsulant de la nadroparine).

Ainsi, nous avons retenu, dans le cas de la nadroparine, les formulations permettant l'obtention de rapports anti-Xa/anti-IIa les plus opposés possibles (ERS 100% et PLGA 75% / ERS 25%) ainsi qu'une formulation donnant des résultats intermédiaires (PLGA 50% / ERS 50%). Cette dernière formulation a également été testée, en présence du PEG en phase interne afin de mettre en évidence un éventuel effet de cet excipent au niveau de l'absorption, comme mentionné dans la littérature [215-217]. L'influence du PLGA a également été étudiée : toutes les formulations ont été réalisées à la fois avec le PLGA S et avec le PLGA H.

Enfin, dans un but comparatif, les formulations précédemment sélectionnées pour l'étude avec la nadroparine ont été retenues dans le cas de la tinzaparine, bien que les rapports anti-Xa/anti-IIa issus des formulations utilisant cette HBPM soient beaucoup plus homogènes.

L'étude de l'absorption des chaines BCL et ACL d'héparine a été réalisée chez le lapin à la dose de 600 unités anti-Xa/kg. Etant donné que l'étape de fabrication induit, en fonction de la composition polymérique, une encapsulation privilégiée des chaines ACL, le rapport d'activité encapsulé est i) inférieur au rapport commercial et ii) dépendant de chaque composition polymérique. Ainsi, l'activité anti-IIa encapsulée varie pour chaque formulation ce qui signifie que l'activité anti-IIa administrée à chaque lapin n'est jamais rigoureusement identique.

Certaines formulations ayant donné de très bons résultats et d'autres n'ayant permis l'obtention d'aucune activité biologique détectable au niveau plasmatique, ce chapitre est divisé en deux parties : dans un premier temps, nous allons discuter des effets des polymères sur l'absorption des chaines ACL et BCL et de l'impact du passage de ces chaines sur le

développement d'une forme *per os* à libération prolongée d'HBPM (publication II) alors que dans un second temps, nous évaluerons quels sont les paramètres potentiellement responsables de l'absence d'activité *in vivo*.

2.1. ACTIVITES ANTI-Xa ET ANTI-IIa *IN VIVO* SUITE A L'ADMINISTRATION ORALE DE MICROPARTICULES DE NADROPARINE

Les formulations qui ont permis l'obtention d'une activité biologique *in vivo* sont uniquement celles encapsulant de la nadroparine, de compositions suivantes:

- PLGA (H ou S) 50% / ERS 50%
- PLGA (H ou S) 50% / ERS 50% + PEG
- ERS 100%

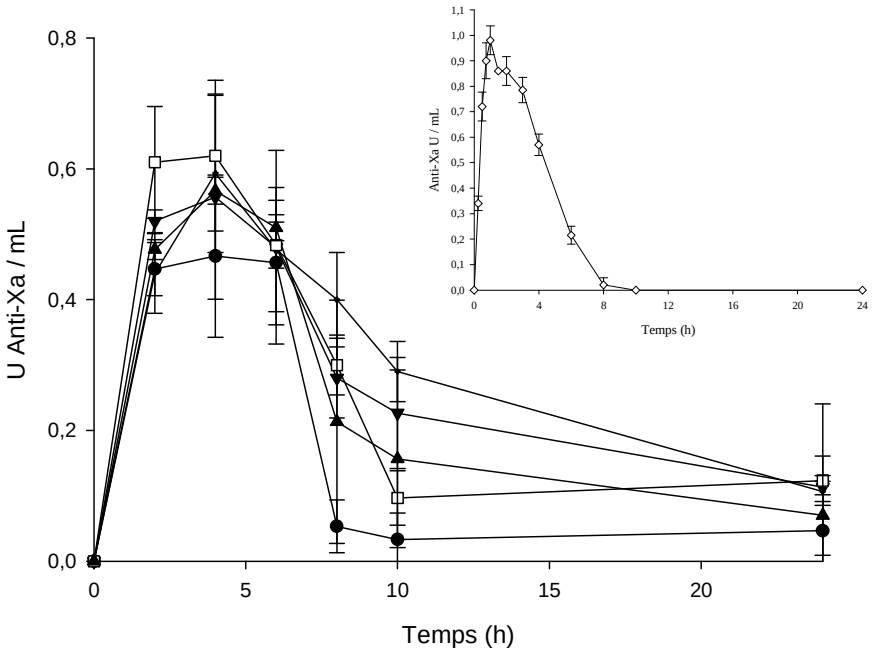
La figure 52 représente l'évolution chronologique des activités anti-Xa et anti-IIa, mesurées dans le plasma sanguin après l'administration orale de ces microparticules (cette figure reprend les données de la publication II en y ajoutant les données obtenues avec les microparticules contenant du PEG). A partir de ces valeurs, les paramètres pharmacocinétiques (Tableau 13, annexe) ainsi que le rapport d'activités anti-Xa/anti-IIa (Figure 59 (B), annexe) ont été calculés. Afin d'être en mesure d'effectuer les calculs de biodisponibilité relative et des comparaisons entre les résultats, une injection sous cutanée de la solution commerciale de nadroparine à la dose de 150 unités anti-Xa/kg a servi de référence. Cette dose a été choisie car elle correspond à celle employée dans le traitement des thromboses veineuses profondes chez l'humain. Une dose 4 fois plus élevée est utilisée lors de l'administration orale car i) toute l'héparine n'est pas libérée des particules en 24 heures et ii) des dégradations (notamment par des enzymes ou le pH) peuvent diminuer la quantité d'héparine présente pour l'absorption.

Les activités anti-Xa et anti-IIa plasmatiques du témoin sont présentées en insert de la figure 52. Le rapport anti-Xa/anti-IIa résultant est présenté dans la figure 59 (A), en annexe. Etant donné qu'une activité anti-IIa qui tend vers 0 conduit à une augmentation artificielle du rapport anti-Xa/anti-IIa, ce rapport a uniquement été calculé pour les temps auxquels les activités anti-Xa et anti-IIa sont respectivement supérieures à 0,2 et 0,02 unité/mL.

Des activités anti-Xa et anti-IIa plasmatiques importantes **suite à l'injection sous-cutanée du témoin** sont retrouvées dès le premier prélèvement (c'est-à-dire 15 minutes après l'injection)

et jusqu'à 8 heures démontrant ainsi la résorption importante des chaines BCL et ACL de nadroparine (inserts de la figure 52). Le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa résultant est stable jusqu'à deux heures (compris entre 7,08 et 7,56) puis il augmente à partir de 3 heures pour atteindre à 6 heures une valeur de 15,50. Ce rapport étant largement supérieur au rapport anti-Xa/anti-IIa de la solution commerciale de nadroparine de valeur 3,5, cela signifie que les chaines BCL sont i) mieux résorbées que les chaines ACL et/ou ii) moins éliminées du plasma. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par les différences de propriétés physicochimiques de ces deux types de chaines. En effet, les chaines BCL, moins longues et chargées que les chaines ACL, d'une part, migrent probablement mieux au sein de l'environnement visqueux sous-cutané et d'autre part, franchissent plus aisément la membrane des capillaires sanguins. De plus, une fois dans le sang, deux mécanismes distincts de clairance éliminent les chaines d'héparine en fonction de leur taille : l'élimination des chaines courtes se fait principalement par un mécanisme rénal lent alors que celle des chaines longues est réalisée par un mécanisme rapide au niveau des cellules endothéliales et des macrophages [27, 223]. Ainsi, **l'absorption plus lente des chaines ACL combinée à leur dégradation plus rapide permet d'expliquer l'augmentation du rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa suite à l'injection sous cutanée de la solution commerciale de nadroparine**. Une augmentation du rapport anti-Xa/anti-IIa plasmatique suite à une infusion intraveineuse d'HBPM chez le lapin a également été publiée dans la littérature [224].

A



B

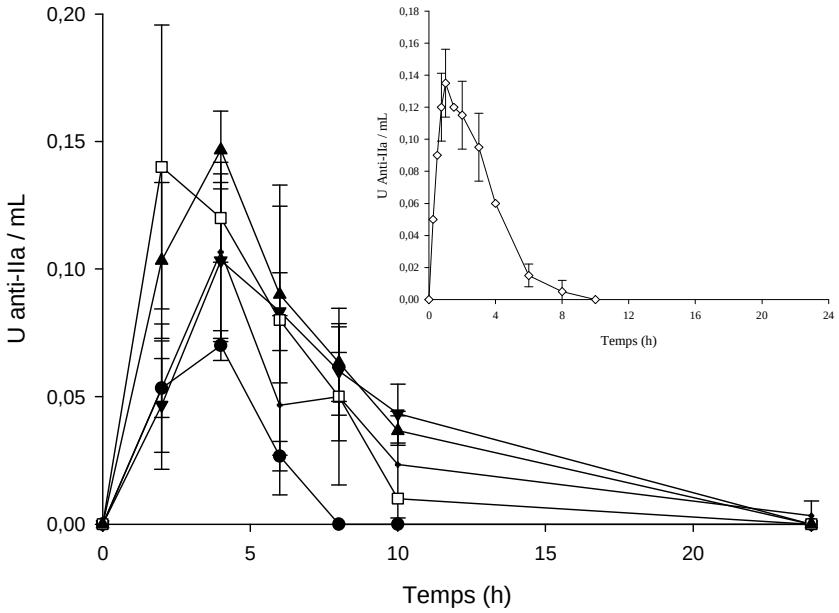


FIGURE 52 : ACTIVITES PLASMATIQUES ANTI-Xa (A) ET ANTI-IIa (B) OBTENUES SUITE A L'ADMINISTRATION A DES LAPINS DE MICROPARTICULES DE NADROPARINE (n=3).

Les microparticules sont administrées à la dose de 600 unités anti-Xa/kg (correspondant à un nombre d'unités anti-IIa/kg compris entre 161 et 170) et sont issues des formulations suivantes : ERS 100% (▼), PLGA S 50% / ERS 50% (•), PLGA S 50% / ERS 50% + PEG (▲), PLGA H 50% / ERS 50% (●) et PLGA H 50% / ERS 50% + PEG (□).

Insert : Activité anti-Xa (A) et activité anti-IIa (B) après une injection sous-cutanée d'une solution de nadroparine (150 unités anti-Xa/kg correspondant à 43 unités anti-IIa/kg).

Suite à l'administration orale, l'obtention d'activités anti-Xa et anti-IIa plasmatiques démontre une libération et une absorption des chaines BCL et ACL au niveau intestinal. Les microparticules, de par leur taille élevée (comprise entre 50 et 100 µm), ne peuvent pas franchir la membrane digestive, excepté par un phénomène appelé persorption. Etant donné que ce mécanisme passif ne survient qu'à une fréquence très faible [152], ce sont donc les chaines d'héparines qui franchissent la membrane digestive et non les microparticules.

L'absorption des chaines d'héparine se révèle relativement importante pour une molécule qui est classiquement considérée comme très peu perméable à travers la membrane intestinale. En effet, des biodisponibilités relatives pouvant atteindre jusqu'à 40 % en ce qui concerne l'activité anti-Xa (formulation ERS 100%, tableau 13, annexe) et 47% en ce qui concerne l'activité anti-IIa (formulation PLGA S 50% / ERS 50% + PEG, tableau 13, annexe) ont été obtenues. Ces résultats semblent dépendre principalement de trois facteurs :

- les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques différentes des chaines ACL et BCL.
- la composition en polymères de la matrice (quantité d'Eudragit® RS et de PLGA).
- la présence de PEG.

Tout d'abord, par comparaison avec les résultats obtenus suite à l'injection sous-cutanée d'une solution de nadroparine (témoin), il a été constaté que l'activité anti-Xa (Figure 52 (A)) est prolongée entre 2 et 6 heures suivant l'administration, de façon indépendante de la formulation, alors que l'activité anti-IIa atteint un pic à 4 heures (Figure 52 (B)). Cela s'explique par les **propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques différentes des chaines BCL et ACL**. En effet, les chaines BCL, plus courtes et moins chargées que les chaines ACL, passent probablement plus aisément la membrane intestinale. De plus, il est établi que la clairance des chaines BCL est plus lente que celle des chaines ACL [27], ce qui explique ainsi que l'effet plasmatique anti-IIa soit moins prolongé.

Si dans toutes les formulations l'absorption et l'élimination de l'activité anti-Xa est toujours supérieure à celle de l'activité anti-IIa, conduisant ainsi à des valeurs de rapports anti-Xa/anti-IIa plus élevées que celle de la solution commerciale, il semble cependant que certaines formulations facilitent plus le passage des chaines ACL que d'autres : c'est le cas des formulations contenant du PEG (PLGA (H ou S) 50% / ERS 50% + PEG) ou avec une forte concentration en Eudragit® RS (ERS 100%). En effet, avec ces formulations des valeurs élevées de biodisponibilités relatives en activités anti-IIa sont obtenues (tableau 13, annexe).

Ainsi, il semble que la **présence d'une quantité d'Eudragit® RS importante** au sein de la matrice ou la **présence de PEG soient les paramètres clefs d'une absorption importante de l'activité anti-IIa**. Les mécanismes pouvant expliquer ces effets sont détaillés dans le paragraphe suivant.

Une telle constatation est d'autant plus surprenante dans le **cas de la formulation ERS 100%** qu'une libération de l'activité anti-IIa quasi-nulle est observée *in vitro* (Figure 50 (A)). Ainsi il apparait que soit i) les conditions *in vivo* (pH, enzymes, présence de tensio-actifs naturels,…) aident à la rupture des interactions entre l'Eudragit® RS et les chaines ACL de nadroparine, soit ii) ce polymère polycationique joue le rôle de promoteur d'absorption pour les chaines de nadroparine, et de façon plus particulière, sur les chaines ACL. En effet, il est bien connu que certains polymères polycationiques tels que la polylysine [225], la polyéthylène imine [225] et le chitosane [95] sont de bons promoteurs d'absorption agissant par ouverture réversible des jonctions serrées. De plus, il a été démontré que l'Eudragit® RS possède également des propriétés muco-adhésives [123] imputées à l'établissement d'interactions avec les charges négatives portées par le mucus. L'addition de PLGA au sein de la matrice (formulations PLGA (H ou S) 50% / ERS 50%) conduit à une diminution des biodisponibilités anti-Xa et anti-IIa (tableau 13, annexe), par rapport aux formulations ERS 100%. Or comme les quantités d'activité anti-Xa et anti-IIa libérées de ces formulations *in vitro* sont supérieures (figure 50 et 57 (A et B)), cela met bien en exergue le rôle de l'Eudragit® RS sur l'absorption.

Enfin, le PEG semble, tout comme l'Eudragit® RS, être à l'origine d'un effet promoteur d'absorption, en particulier pour les chaines ACL. Cela est plutôt surprenant car dans notre étude *in vitro*, **la présence de PEG**, ne favorise pas la libération des chaines ACL par comparaison aux mêmes formulations sans PEG. Bien que les PEG soient des excipients plutôt neutres, l'existence d'un effet promoteur d'absorption de ces composés a déjà été décrit *in vivo* [226], suite à la co-administration orale de cet excipent et d'une substance active, la ranitidine, qui comme l'héparine appartient à la classe III de la BCS (solubilité élevée et perméabilité faible). Cependant, le mécanisme d'action de cet effet reste particulièrement obscur. Différentes pistes ont été avancées telles que i) l'existence d'un effet inhibiteur du PEG sur le cytochrome majoritaire au niveau de l'intestin, le cytochrome P450 3A [227] et sur la P-gp [227, 228] ii) l'effet osmotique des PEG permettrait de retenir l'eau et de maintenir un gradient de concentration à travers la membrane plasmatique plus longtemps et enfin iii) un mécanisme d'ouverture des jonctions serrées. En effet, les PEG peuvent franchir

un épithélium par passage au niveau des jonctions serrées [229] : il est donc envisageable qu'ils puissent interagir sur les composés formant les jonctions serrées et que cette interaction soit à l'origine d'une ouverture de ces dernières. Ainsi, bien que son mécanisme d'action ne soit pas élucidé, le PEG permet une augmentation de l'absorption intestinale des chaines d'héparines qui est particulièrement importante dans le cas des chaines ACL.

Enfin, en ce qui concerne l'**effet du PLGA** au sein des formulations PLGA (H ou S) 50% / ERS 50%, il a été constaté que les rapports d'activité anti-Xa/anti-IIa obtenus *in vivo* à 2 heures sont supérieurs à ceux obtenus *in vitro* au même temps : par exemple le rapport obtenu avec les microparticules fabriquées à partir du ratio de polymère PLGA H 50% / ERS 50% est de 9,53 *in vivo* (figure 59 (B), annexe) contre 6,12 *in vitro* (Figure 57 (C), annexe). Ainsi, **le PLGA semble favoriser l'absorption des chaines BCL**. Ceci est d'ailleurs confirmé par des valeurs de biodisponibilités de l'activité anti-Xa qui sont plus importantes que celles de l'activité anti-IIa (tableau 13, annexe). Ce phénomène peut être expliqué i) par un effet promoteur d'absorption diminué de l'Eudragit® RS qui se trouve présent en quantité plus faible que dans la formulation ERS 100% et/ou ii) des interactions plus réduites avec la mucine qui contribuent à diminuer le gradient de concentration de nadroparine à travers la barrière intestinale.

De plus, des activités anti-Xa et anti-IIa plasmatiques plus prolongées sont obtenues pour les microparticules contenant du PLGA S par rapport à celles contenant du PLGA H (figure 52 (A et B)) : la nature du PLGA constitue donc un paramètre qui influe sur l'absorption des chaines d'héparine. Il a été démontré que le PLGA H se dégrade plus vite que le PLGA S *in vivo* [230]. Bien que ces différences aient généralement été observées lors d'expériences menées sur des durées plus importantes, il est supposé i) que l'affinité plus prononcée du PLGA H pour l'eau pourrait jouer un rôle dans la libération et l'absorption *in vivo* des chaines d'héparine et/ou ii) que la charge négative portée par le groupement acide terminal du PLGA H interagirait avec la charge positive de l'Eudragit® RS, diminuant ainsi les propriétés promoteur d'absorption de ce polymère. Enfin, bien que la présence de PEG au sein des formulations PLGA (H ou S) 50% / ERS 50% atténue un peu les différences de comportement entre ces deux types de PLGA, on observe tout de même une tendance similaire à celle observée précédemment sans PEG : il existe une absorption plus importante des chaines courtes et longues avec la formulation PLGA S 50% / ERS % + PEG par comparaison avec la formulation PLGA H % / ERS % + PEG (Figure 52 (A et B) et tableau 13).

Les résultats de cette étude montrent que toutes les formulations de microparticules étudiées sont de très bonnes candidates pour l'administration par voie orale d'héparine. En effet, la dose administrée (600 unités anti-Xa/kg) est la dose la plus faible utilisée parmi toutes les études ayant été publiées sur l'administration par voie orale de l'héparine [86, 101, 107, 116, 117]. L'activité anti-Xa plasmatique est prolongée pendant plusieurs heures à un niveau supérieur à 0,2 unité anti-Xa/mL, ce qui est le niveau d'activité nécessaire à l'obtention d'une activité anti-thrombotique nette [58] chez l'animal. Enfin, **l'activité anti-IIa**, dont on sait aujourd'hui qu'elle joue un rôle primordial en ce qui concerne la génération de thrombine [40, 212], **se trouve être présente dans la même proportion (par rapport à l'activité anti-Xa) suite à l'administration orale des microparticules que suite à l'injection sous-cutanée témoin** (rapports anti-Xa/anti-IIa compris entre 5 et 15). Ainsi, la forme microparticulaire d'héparine a probablement un potentiel équivalent à la forme commerciale injectable en ce qui concerne l'inhibition de la génération de thrombine.

Cependant, certaines formulations n'ayant pas donné de résultats, il est nécessaire de s'interroger sur les causes de ces résultats non concluants.

2.2. CAUSES DE L'ABSENCE DE RESULTATS *IN VIVO* POUR CERTAINES FORMULATIONS

Une absence de résultats (activité anti-Xa et anti-IIa en dessous du seuil de quantification de la méthode biologique) a été observée avec les formulations suivantes :

- PLGA (H ou S) 75% / ERS 25% encapsulant de la nadroparine ou de la tinzaparine
- ERS 100% encapsulant de la tinzaparine
- PLGA (H ou S) 50% / ERS 50% encapsulant de la tinzaparine

Tout d'abord, il faut signaler que certaines de ces formulations, notamment PLGA (H ou S) 50% / ERS 50% encapsulant de la tinzaparine, ont déjà été testées *in vivo* au laboratoire. Une activité anti-Xa non négligeable ayant été décelée, l'absence d'activité observée au cours de la présente étude est donc surprenante.

Des problèmes de stabilité de la forme microparticulaire peuvent être évoqués. Cependant, comme il a été constaté que les formulations ne fonctionnant pas *in vivo* montrent toujours *in vitro* une libération importante d'activité biologique anti-Xa et anti-IIa, cette hypothèse ne peut pas expliquer cela à elle seule. De plus, des études complémentaires de DSC (résultats

non présentés) n'ont pas montré de changements des propriétés thermiques des polymères testés sous forme de poudre ou au sein des systèmes de délivrance formulés au laboratoire (microparticules, granulés, etc..). Entre ces deux séries d'expériences, le seul paramètre dont nous sommes certains qu'il ait varié correspond aux animaux : en effet, un changement des lapins utilisés pour les tests (contre des lapins de la même espèce et provenant du même fournisseur) est intervenu à ce moment là, remettant en cause le modèle animal utilisé. De plus, tous les paramètres intervenant dans le dosage (appareillage, kits, …) ont été parallèlement mis hors de cause.

Or, le lapin présente des particularités anatomiques, notamment en ce qui concerne le tractus gastro-intestinal. Ainsi, il possède un estomac particulièrement volumineux qui, du fait de la cæcotrophie (ingestion de crottes molles en période nocturne), est toujours plein : il est impossible de mettre réellement l'animal à jeun [231]. Ainsi, les particules et l'héparine peuvent interagir avec les nombreuses substances présentes dans l'estomac du lapin, modifiant ainsi l'activité et / ou le passage intestinal de l'héparine. De plus, tout changement dans l'alimentation peut avoir des répercussions importantes étant donné que les aliments sont constamment en contact direct avec les microparticules.

En revanche, la longueur relative du tractus gastro-intestinal de cet animal par rapport à la longueur totale du corps est relativement proche de celle retrouvée chez l'humain ce qui est favorable à une évaluation des formes à libération prolongée destinées à l'humain sur ce modèle.

3. ETUDES DE PASSAGE

En parallèle des études *in vivo*, des études de passage ont été réalisées dans le but i) de localiser la zone tissulaire préférentielle de l'absorption de l'héparine, ii) de déterminer la perméabilité *in vitro*, sur un modèle cellulaire, des activités anti-Xa et anti-IIa et iii) d'identifier le mécanisme responsable du passage des chaines d'héparine au niveau cellulaire.

3.1. PASSAGE TISSULAIRE

Cette étude a été mise en place afin de localiser le passage tissulaire des héparines au niveau de l'intestin grêle. En effet, différents systèmes de délivrance de l'héparine *per os* ont montré que l'héparine était absorbée au niveau de l'intestin grêle. Nous avons cherché à savoir si une

absorption préférentielle avait lieu soit au niveau du duodénum, du jéjunum, de l'iléon ou enfin au niveau des plaques de Peyer suite à l'administration par voie orale des microparticules.

Pour la méthodologie, nous nous sommes basés sur une étude réalisée précédemment au laboratoire, qui concernait le passage intestinal chez le rat de l'insuline encapsulée dans des nanoparticules [232].

3.1.1. METHODOLOGIE DE L'ETUDE

Afin d'étudier le passage tissulaire, nous avons choisi de marquer la molécule d'héparine par fluorescence au moyen de la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Ce marqueur possède une longueur d'excitation de 490 nm et d'émission de 515 nm (selon les données du fabricant). Le protocole de marquage a été réalisé selon une méthode décrite précédemment [233]: il s'agit d'une conjugaison intervenant au niveau des groupements amines portés par l'unité glucosamine de l'héparine [234]. Comme la procédure de marquage entraine une précipitation de la tinzaparine (sel sodique), seule la nadroparine (sel calcique) a été marquée et a servi pour l'étude.

La nadroparine-FITC a été incorporée dans des microparticules (PLGA S 75% / ERS 25% ou PLGA S 50% / ERS 50% ou ERS 100%) formulées et administrées de manière identique à celles utilisées pour les études *in vivo*. Des témoins tels que solution d'héparine-FITC ou microparticules vierges ont été réalisés. L'évaluation d'une formulation a nécessité trois lapins, sacrifiés respectivement à 2, 4 ou 6 heures après l'administration orale. Ces temps ont été choisis car ils correspondent au maximum d'activité anti-Xa observé *in vivo*.

Une fois l'animal sacrifié, différents prélèvements de tissus intestinaux sont réalisés au niveau du duodénum, du jéjunum et de l'iléon. Des plaques de Peyer sont également prélevées au niveau du jéjunum et de l'iléon. Les prélèvements se présentent sous forme de tronçons d'intestin d'une longueur d'environ 0,5 cm que l'on ouvre et que l'on congèle immédiatement après les avoir déposés dans un support contenant un milieu propice à la conservation du tissu à températures négatives (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Japon). Ce milieu, de par la présence de PVA et de PEG permet de préserver l'échantillon de la dessiccation et de l'oxydation. De plus, ce milieu liquide à température ambiante à la propriété de durcir lorsque la température diminue ce qui nous a permis ensuite de réaliser des coupes d'une épaisseur de 20 µm grâce à un cryostat (Zeiss Microm, HM 505 E) qui ont ensuite été montées dans un milieu approprié

entre lame et lamelle afin de pouvoir être observées en microscopie confocale. Le milieu de montage choisi est le Fluoromount G (SouthernBiotech, USA) qui permet de limiter le phénomène dit de « fading » (perte de signal) du fluorophore.

3.1.2. RESULTATS

Les observations en microscopie confocale ne nous ont pas permis de déceler la nadroparine dans les tissus intestinaux de lapin. En effet, une autofluorescence des tissus très importante, retrouvée de façon variable entre les individus, couvre le signal émis par la nadroparine couplée à la fluorescéine.

Les tissus des lapins témoins n'ayant pas reçu d'héparine marquée présentent une fluorescence importante visible sur le tableau 14 (A). Cela signifie donc qu'il existe une autofluorescence naturelle importante au niveau des tissus intestinaux du lapin. Il est connu qu'une autofluorescence est apportée par différents composés, notamment végétaux de part la présence de molécules telles que la chlorophylle, la coumarine ou la flavine [235]. Des composés cellulaires tels que le collagène, l'élastine, la kératine, le NADH, l'oxy- et la déoxyhémoglobine sont pourvoyeurs d'autofluorescence [236]. De plus, l'autofluorescence est souvent aggravée par le stress de la cellule et la mortalité [236].

Pour tenter de dégager le signal émis par la nadroparine, l'autofluorescence est éteinte sur l'échantillon du lapin témoin (Tableau 14 (B)), n'ayant pas reçu d'héparine (mais mis à jeun avant l'expérience comme les autres individus).

Malgré cette démarche, une autofluorescence peut persister comme le montre la photo C du tableau 14, représentant une coupe d'intestin (après avoir fait « le blanc ») d'un autre lapin témoin ayant reçu par voie orale des microparticules vierges. Ces mêmes observations ont été constatées sur l'ensemble du tractus intestinal (données non présentées). Tout ceci nous amène à penser qu'il existe une grande variation interindividuelle en ce qui concerne l'autofluorescence rendant ainsi la mise au point de la lame témoin particulièrement difficile. De ce fait, lors de l'observation des échantillons, il est très difficile de dire si la fluorescence observée provient de l'autofluorescence des tissus ou s'il s'agit de l'héparine en solution (Tableau 14 (D)) ou véhiculée par les microparticules (Tableau 14 (D, E, F)) ayant été absorbée au niveau de la lumière intestinale.

Afin de pallier à ces biais, différentes stratégies peuvent être envisagées, le but final étant d'augmenter le rapport signal/bruit pour mieux détecter le signal par rapport au bruit de fond. Pour cela nous pouvons soit diminuer le bruit de fond ou soit augmenter le signal.

Afin de **diminuer le bruit de fond**, il est possible de laver davantage les échantillons (au moyen de solutions salines telles que le NaCl 0,9% [237] ou de solutions tamponnées telles que le PBS [238]) afin de s'affranchir d'un plus grand nombre de débris présents au niveau intestinal et pouvant être une source d'interférences. De plus, comme la préparation des tissus peut être un facteur aggravant de l'auto-fluorescence de part le stress cellulaire généré, une autre technique de fixation/inclusion en deux temps (fixation puis inclusion) pourrait être envisagée. Cependant, il semble que la fixation, du fait du temps de diffusion du fixateur au sein du tissu, n'ait d'intérêt que dans le cas des coupes relativement fines [239], ce qui n'est pas le cas de nos coupes.

Pour **augmenter le signal**, le choix d'un autre fluorophore devrait être envisagé. En effet, dans une étude cherchant à évaluer le passage de l'héparine sur culture cellulaire en présence d'un promoteur d'absorption [210], un marquage par Alexa Fluor® 488 a été réalisé. Le fluorophore est fixé de façon covalente avec les groupes carboxyles des acides uroniques de l'héparine [234]. Ce marqueur appartient à une famille de marqueurs : les Alexa Fluor®. Il s'agit de fluorophores de nouvelle génération plus stables et plus brillants que les marqueurs traditionnellement utilisés et dont les spectres d'excitation et d'émission sont plus étroits. Enfin, ils sont généralement plus indépendants de l'environnement. Cependant, en ce qui concerne notre étude, étant donné que l'Alexa Fluor® 488 présente des longueurs d'onde d'excitation et d'émission relativement proches de celles de la FITC (495 nm et 519 nm), le choix d'un autre fluorophore aux propriétés d'excitations et d'émission très différentes de celles de la FITC pourrait se révéler comme étant le choix le plus approprié. Sachant que d'une part les Alexa Fluor® forment une famille de fluorophores très vaste, aux longueurs d'onde d'absorption et d'émission très étendues (comprises entre 346 et 679 nm pour l'absorption, et entre 442 et 702 nm pour l'émission) et que d'autre part, le principe de greffage de ces composés sur la molécule à étudier est le même, le choix d'un de ces fluorophores constituerait une des solutions permettant la suite de cette étude.

D'autres techniques *in vivo* pourraient également être utilisées telles que les boucles intestinales. Par comparaison à notre technique consistant en une administration sur l'animal entier, cette technique permettrait de concentrer la substance active couplée au fluorophore au

niveau du segment intestinal d'intérêt, augmentant ainsi la probabilité de détecter un signal clair au niveau de la zone d'absorption. Cependant, une telle démarche introduit un biais au niveau des concentrations utilisées et nous détourne de l'objectif premier à savoir localiser et déceler, lors d'une administration orale, le site préférentiel d'absorption des héparines.

En conclusion, il ne nous a pas été possible de localiser le ou les sites d'absorption de la nadroparine avec la technique de microscopie confocale utilisée. Cependant, une optimisation est envisageable.

3.2. PASSAGE CELLULAIRE

Parallèlement à l'étude tissulaire, afin de permettre l'étude du passage des molécules à l'échelle de la cellule, des modèles de barrières intestinales issus de la culture cellulaire, ont été élaborés. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le modèle le plus couramment décrit, les cellules Caco-2. Bien qu'issu d'un adénocarcinome colonique humain, ce clone de cellules possède la propriété de se différencier après 3 semaines de culture en des cellules qui présentent de grandes similarités avec les entérocytes polarisés de l'intestin grêle [179] : forme similaire, présence de microvillosités, de jonctions serrées, d'enzymes et de transporteurs. Ce modèle a été utilisé précédemment aussi bien dans le cadre d'études de passage de substances actives de différentes natures encapsulées au sein de microparticules [240-243] que pour des études de passage de l'héparine en présence de différents promoteurs d'absorption [77, 92, 98, 114, 117]. Les études les plus complètes et abouties dans ce cas sont celles utilisant le SNAC et des conjugués héparine-acide déoxycholique [105, 210]. Nous nous sommes basés sur la méthodologie employée par ces différents articles comme point de départ.

Dans un premier temps, la cytotoxicité des microparticules a été évaluée par un test colorimétrique utilisant le MTT, un sel de tétrazolium. Les résultats de cette étude ont permis de définir des conditions d'étude dans lesquelles la toxicité générée par les particules est limitée pour les cellules. Ainsi, dans un second temps, des études de passage sur Transwell® ont pu être effectuées en se plaçant dans les conditions définies comme non cytotoxiques pour les cellules.

3.2.1. ETUDES DE CYTOTOXICITE

3.2.1.1. METHODOLOGIE

Le test utilisé est un test colorimétrique utilisant le MTT [244], un sel de tétrazolium (de nom chimique (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl) tétrazolium bromide). Ce sel, de couleur jaune, est oxydé par les déshydrogénases mitochondriales présentes dans les cellules vivantes (et donc métaboliquement actives) en formazan de couleur bleue [76]. Comme la membrane des cellules viables est imperméable aux cristaux de formazan, ils s'accumulent donc au sein de la cellule. La solubilisation des membranes cellulaires par l'addition d'un détergent (sodium dodécyl sulfate ou SDS) entraine la libération et la solubilisation des cristaux. Etant donné que les cellules mortes ou endommagées ne présentent pas d'activité réductrice ou de déshydrogénases, le MTT n'est pas transformé en composé bleu : la quantité de formazan produit est donc directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Le but de l'étude de toxicité est de définir si les paramètres que l'on souhaite utiliser lors de l'étude du transport cellulaire (étude du passage sur Transwell®) génèrent ou non une toxicité pour les cellules. Il faut donc que les conditions de l'étude cytotoxique se rapprochent au maximum des conditions de l'étude de passage.

Ainsi, comme les cellules Caco-2 se présentent sous forme d'un épithélium totalement différencié en une durée de 14 à 21 jours suite à leur culture sur un système d'insert de type Transwell® [175], les études de cytotoxicité ont été réalisées sur une couche de cellules jointives obtenues après 7 jours de culture, plus résistantes que des cellules indifférenciées et non jointives (obtenues 24 à 48 heures après ensemencement, temps classiquement utilisé lors des tests MTT). Une démarche similaire a été entreprise par l'équipe de Peppas et coll. lors des tests de cytotoxicité de microparticules [240, 245]. Afin d'obtenir à 7 jours un tapis de cellules jointives ne présentant pas de façon visible des cellules mortes, la concentration de cellules à ensemencer a été optimisée à 2.10^4 cellules / cm^2 (plaques 24 puits Cellstar®, Greiner bio-one GmbH, Allemagne ; surface de culture = 1,9 cm^2).

Ces études ont été menées avec des microparticules vierges et chargées en nadroparine ou en tinzaparine, toutes de formulation PLGA S 50% / ERS 50%. Cette formulation a été sélectionnée pour ce test car elle libère *in vitro* comme *in vivo* des activités anti-Xa et anti-IIa relativement importantes.

Les quantités de microparticules déposées pour ce test sont similaires à celles utilisées lors de l'étude du passage. Différents critères ont guidé le choix de cette quantité mais le plus important d'entre eux est issu de considérations analytiques. En effet, les activités anti-Xa et anti-IIa doivent être libérées en quantité suffisante afin d'être détectables par la méthode analytique. Cependant, la quantité de microparticules déposée ne peut également pas être trop importante : elle est limitée au vu de la surface et du volume faible des puits. Finalement, des concentrations de 1, 5 ou 10 mg de particules par cm^2 ont été retenues pour les tests cellulaires.

Les temps d'incubation des microparticules sur les cellules sont les temps pour lesquels une activité anti-Xa plasmatique importante a été observée *in vivo*, c'est-à-dire 2, 4 et 6 heures. La cytotoxicité a également été évaluée après 24 heures d'incubation.

Enfin, comme les études de passage se déroulent dans un milieu salin relativement semblable au PBS, le « Hank's Balanced Sodium Salt » (ou HBSS), les études de cytotoxicité ont été menées dans ce même milieu. Cependant, un témoin « milieu de culture seul » a également été réalisé en plus d'un témoin « HBSS seul ».

3.2.1.2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de cytotoxicité sont présentés en annexe (Figure 60) sous forme d'histogrammes représentant la viabilité cellulaire (%) à différents temps d'incubation (2, 4, 6 ou 24 heures). Chaque histogramme montre le pourcentage de viabilité cellulaire obtenu avec les témoins (milieu de culture et HBSS) ainsi qu'avec les formulations testées aux concentrations de 1, 5 ou 10 mg/cm^2 (microparticules vierges, microparticules de nadroparine, et microparticules de tinzaparine).

Des écart-types élevés peuvent être obtenus malgré le nombre important d'expériences effectuées (9 puits répartis sur 3 manipulations différentes). Nous nous sommes attachés à utiliser des passages cellulaires différents qui peuvent entrainer une certaine variabilité mais garantissent la véracité des résultats.

Les résultats issus de cette étude montrent que les **microparticules en suspension dans l'HBSS apportent une légère toxicité à des temps d'incubation de 2, 4 ou 6 heures** (Figure 60 (A, B et C), annexe). Cette toxicité n'est pas à relier à la quantité de microparticules déposée sur les cellules, ni à la présence d'héparine. Elle semble dépendante des conditions de l'étude comme l'indique les témoins HBSS qui atteignent, quelque soit le

temps, des valeurs de viabilité cellulaire proches (70% à 6 heures) de celles des microparticules (respectivement 85%, 75% et 62 % pour des microparticules vierges, chargées en tinzaparine et chargées en nadroparine, pour une concentration de 10 mg/cm^2 à 6 heures).

Le même phénomène s'observe également à 24 heures entrainant environs 40% de mortalité en présence d'HBSS, de microparticules vierges ou chargées. En effet, la viabilité des cellules dans l'HBSS chute à 56% tout comme celle des cellules au contact des particules, qui est comprise entre 47% (microparticules de nadroparine, 10 mg/cm^2) et 68 % (microparticules vierges, 1 mg/cm^2). Tout comme pour les autres temps d'incubation, il semble que la composition (microparticules vierges ou chargées) ainsi que les concentrations en microparticules (comprises entre 1 et 10 mg/cm^2) ne soient pas des paramètres déterminants de la cytotoxicité.

Lorsque la viabilité cellulaire atteint une valeur comprise entre 60 et 90%, la toxicité est considérée comme légère [246] et des études de passages peuvent alors être réalisées. Ainsi, seuls les temps d'incubation de 2, 4 et 6 heures ont été retenus pour la suite de l'étude car ils permettent l'obtention d'une viabilité cellulaire satisfaisante (> 60%), ce qui n'est pas le cas du temps 24 heures. De plus comme à ces temps d'incubation, aucune des concentrations testées ne génère une diminution de la viabilité cellulaire de plus de 40% ; des concentrations en microparticules allant jusqu'à 10 mg/cm^2 ont été utilisées lors des études de passage.

3.2.2. ETUDE DE PASSAGE SUR INSERTS DE TYPE TRANSWEEL®

3.2.2.1. METHODOLOGIE

Les études de passage ont été menées sur des inserts de type Transwell® 12 puits (Transwell® permeable Supports, Corning, USA). Les puits de ces plaques contiennent chacun un insert permettant de délimiter un compartiment donneur (dit apical (AP)) et un compartiment receveur (dit basolatéral (BL)) grâce à la présence d'une membrane sur laquelle les cellules se multiplient jusqu'à former un épithélium. La surface de culture développée est de 1,12 cm^2. Dans notre étude, la matière qui constitue la membrane est du polycarbonate. Elle présente une très forte densité de pores (1.10^8 pores/cm^2) ce qui rend les observations par microscopie optique délicates, mais laisse la substance active étudiée gagner le compartiment BL une fois le tapis cellulaire franchi. En revanche, la faible taille des pores sélectionnée (0,4 µm) permet

d'éviter la colonisation de la face basolatérale de la membrane par les cellules, permettant ainsi l'obtention d'un tapis homogène.

L'intégrité de l'épithélium a été vérifié en utilisant la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) [184] et la mesure de la perméabilité d'un composé test, très hydrophile, imperméable vis-à-vis de l'épithélium de cellules Caco-2, la fluorescéine [196, 247, 248]. La littérature reporte que la valeur de TEER augmente avec le temps de culture jusqu'à atteindre un maximum en 10 à 15 jours, compris entre 150 et 1000 $\Omega.cm^2$ [184], puis elle commence à décroitre. Cependant, comme un temps de culture plus prolongé est nécessaire à l'expression de certains transporteurs [179], les études de passages sont généralement menées à des temps de culture plus tardifs, compris entre 16 et 21 jours.

Afin de se placer dans les conditions optimales d'établissement de l'épithélium, la valeur de TEER a été évaluée durant 21 jours (données non présentées). Le TEER, dans ce cas, chute à partir du 16ème jour de culture à des valeurs inférieures à 300 $\Omega.cm^2$ ce qui démontre une altération de l'épithélium : par conséquent, les études de passage ont été menées après 16 jours de culture, ce qui constitue un bon compromis entre la durée ou un épithélium intègre est présent et celle nécessaire à l'expression suffisante des transporteurs. Le suivi de TEER sur les plaques ayant servi pour les études de passage est présenté-ci dessous (Figure 53) :

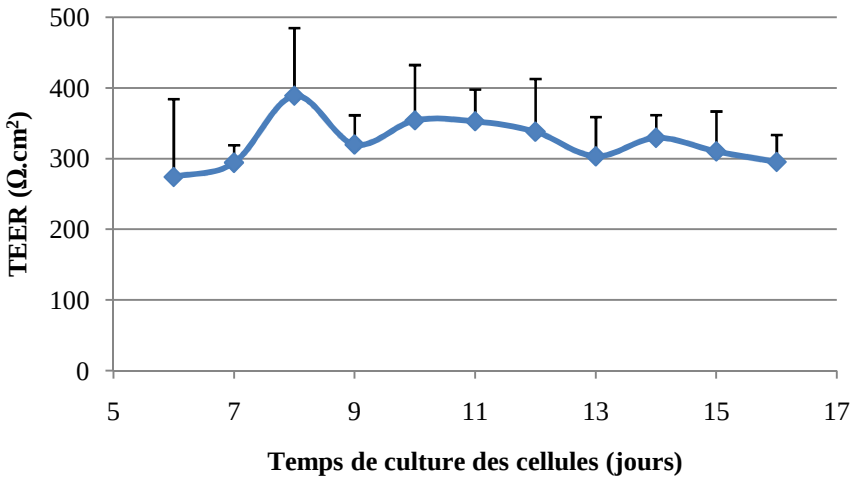


FIGURE 53 : RESISTANCE ELECTRIQUE TRANSEPITHELIALE DES CELLULES CACO-2 CULTIVEES SUR TRANSWEEL® EN FONCTION DU TEMPS DE CULTURE.

Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne ± écart-type, (n= 77 puits).

Les valeurs obtenues, de l'ordre de 300 $\Omega.cm^2$, appartiennent aux valeurs rapportées dans la littérature, comprises généralement entre 150 et 1 000 $\Omega.cm^2$. La perméabilité apparente de la fluorescéine sur un tel épithélium est de $1,22.10^{-6}$ cm/s après deux heures d'incubation. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature [249].

Ainsi, l'établissement d'un modèle d'épithélium étant vérifié, différentes études de passage ont ainsi pu être menées. Durant les études de passage, l'intégrité de l'épithélium a également été suivie par la mesure de TEER avant chaque prélèvement ainsi que par la détermination de la perméabilité de l'épithélium à la fluorescéine réalisée en fin d'étude : après les 6 heures de l'étude de passage, la fluorescéine a été ajoutée durant 2 heures à la concentration de 10 µM au niveau du pôle apical, suite au rinçage des puits et à l'élimination des microparticules présentes.

Les premières études de passage ont été menées avec la nadroparine car nous possédons à la fois les résultats des études *in vitro* et *in vivo* pour cette HBPM, ce qui n'est pas le cas de la tinzaparine. La formulation PLGA S 50% / ERS 50% qui permet la libération d'une quantité importante d'unités anti-Xa et anti-IIa a été retenue. Dans un but comparatif, la formulation ERS 100%, au comportement *in vitro* spécifique (libération d'une activité anti-IIa quasi-nulle), a également été évaluée.

Le milieu utilisé pour l'étude du passage est le milieu salin tamponné HBSS qui contient notamment du glucose. Bien que légèrement délétère en terme de viabilité cellulaire comme l'ont montré les études de cytotoxicité, il s'agit d'un milieu de composition simple par comparaison avec le milieu de culture. L'utilisation de l'HBSS facilite nettement le traitement analytique des échantillons. En effet, le milieu de culture est très riche de par la supplémentation en de nombreux composés (acides aminés, protéines issues du sérum de veau fœtal, antibiotiques…). Ces nombreux constituants risquent donc d'interagir d'une part avec le dosage biologique de l'héparine et d'autre part avec l'héparine elle-même, puisque l'héparine se lie fortement aux protéines plasmatiques [27]. C'est d'ailleurs pour ces raisons que l'ajout d'albumine n'a pas été réalisé. Généralement cet ajout est effectué dans le but d'augmenter le partage des molécules présentes dans l'épithélium en faveur du compartiment basolatéral, tel que cela se passe *in vivo* dans les conditions « sink » [207].

Un volume de 700 µL a été prélevé au pôle basolatéral aux temps 2, 4 et 6 heures, suite au dépôt des particules. Il est remplacé par de l'HBSS frais. Au niveau du pôle apical, très concentré en particules et donc en héparine et de volume total faible (500 µL), un prélèvement

d'un volume de 100 µL est effectué uniquement à 6 heures, afin de ne pas trop diluer ce compartiment (ce qui diminuerait le gradient de concentration en héparine) et de ne pas biaiser le test en prélevant des particules dès les premiers temps de l'étude.

Comme les concentrations en héparine sont très faibles au niveau du pôle basolatéral, une gamme dans des concentrations en héparine basses a été réalisée (entre 0,03 et 0,20 unité anti-Xa (r = -0,998) ou anti-IIa/mL (r = -0,997) alors qu'une gamme utilisant des concentrations plus importantes en héparine (0,1 à 0,7 unité anti-Xa (r = -0,999) ou anti-IIa/mL (r = -0,999)) a servi pour le dosage des échantillons issus du pôle apical, beaucoup plus concentrés en héparine.

Les concentrations utilisées en microparticules testées ont été choisies afin qu'en pratique on soit en présence, au pôle apical, d'une concentration d'héparine libre à 6 heures de 50, 100 ou 200 unités anti-Xa/puits (soit respectivement 100, 200 et 400 unités anti-Xa/mL soit environs 2,5 ; 5 et 10 mg/cm^2 de microparticules). Ces concentrations sont désignées dans la suite de la discussion uniquement par la dénomination « microparticules 50, 100 ou 200 ». Pour chaque concentration testée, différents témoins ont été réalisés (solution d'héparine seule à la même concentration et microparticules vierges en présence d'une solution d'héparine à la même concentration). Ainsi dans le cas des microparticules 100 de nadroparine, un témoin solution de nadroparine à 100 unités anti-Xa/puits ainsi qu'un témoin microparticules vierges suspendues dans une solution de nadroparine à 100 unités anti-Xa/puits, ont été réalisés.

3.2.2.2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs cumulées d'activités anti-Xa présentes au pôle basolatéral, suite au dépôt des microparticules 100 au niveau du pôle apical du Transwell® sont présentées dans la figure 54.

Les résultats d'activités anti-IIa n'ont pas été représentés car quelle que soit la formulation ou le témoin testé, la valeur en activité anti-IIa présente dans le compartiment basolatéral est inférieure au seuil de quantification de la méthode de 0,03 unités anti-IIa/mL. La perméabilité apparente de l'activité anti-IIa n'a donc pas été déterminée. En revanche, une activité anti-Xa non négligeable est retrouvée au pôle basolatéral aussi bien avec les témoins qu'avec les microparticules chargées en nadroparine. Nous pouvons donc supposer que le passage **des chaines ACL de nadroparine est quasi-nul alors que le passage des chaines BCL est relativement important**. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'activité anti-IIa libre au niveau du pôle apical était inférieure à l'activité anti-Xa, conduisant ainsi à un gradient

d'activité anti-IIa de part et d'autre de l'épithélium inférieur au gradient d'activité anti-Xa. En effet, dans le cas des témoins, l'activité anti-IIa déposée est 3,5 fois plus faible que l'activité anti-Xa et est encore plus basse dans le cas des microparticules, de façon dépendante de la composition en polymère utilisée. Cependant, ceci n'explique pas de façon satisfaisante les différences, apparemment contradictoires, observées avec les résultats *in vivo*. En effet, lors de l'étude *in vivo*, les mêmes particules étant employées, le gradient en activité anti-IIa doit être également inférieur au gradient anti-Xa. Ce sont donc plutôt les conditions physiologiques qui seraient responsables de l'absorption importante des chaines ACL. D'ailleurs, il faut se rappeler que certaines formulations, libérant *in vitro* des activités anti-IIa quasi-nulles lors des essais de dissolution, avaient conduit *in vivo* à l'obtention d'une activité anti-IIa plasmatique très importante, démontrant ainsi le rôle capital des conditions physiologiques (présence de mucus, d'agitation, de tensio-actifs naturels, pH intestinal) sur l'absorption des chaines longues.

L'analyse des résultats de passage de l'activité anti-Xa de part et d'autre de l'insert nous permet de constater qu'une activité importante est observée au pôle basolatéral des Transwell®, quelle que soit la formulation testée (figure 54). Après 6 heures d'incubation, elle est comprise entre 0,06 unités anti-Xa/mL (microparticules chargées en nadroparine de formule ERS 100%) et 0,41 unité anti-Xa/mL (microparticules vierges en présence d'une solution de nadroparine).

Si on compare les perméabilités apparentes (cf section 4.3.2. de la bibliographie pour le calcul) obtenues (tableau 11), c'est **avec les microparticules PLGA S 50% / ERS 50% de nadroparine que la perméabilité apparente en activité anti-Xa la plus élevée** (de $28{,}26.10^{-8}$ cm/s) **est obtenue**, ce qui conduit par comparaison à celle du témoin « solution de nadroparine » (de $6{,}14.10^{-8}$ cm/s) à une augmentation de 4,60 fois. Avec le témoin « microparticules vierges de même composition (PLGA S 50% / ERS 50%) mises en suspension dans une solution de nadroparine » une augmentation plus modérée de la perméabilité apparente de l'activité anti-Xa de l'héparine, d'un facteur 2,80 par comparaison au témoin « solution d'héparine » est observée.

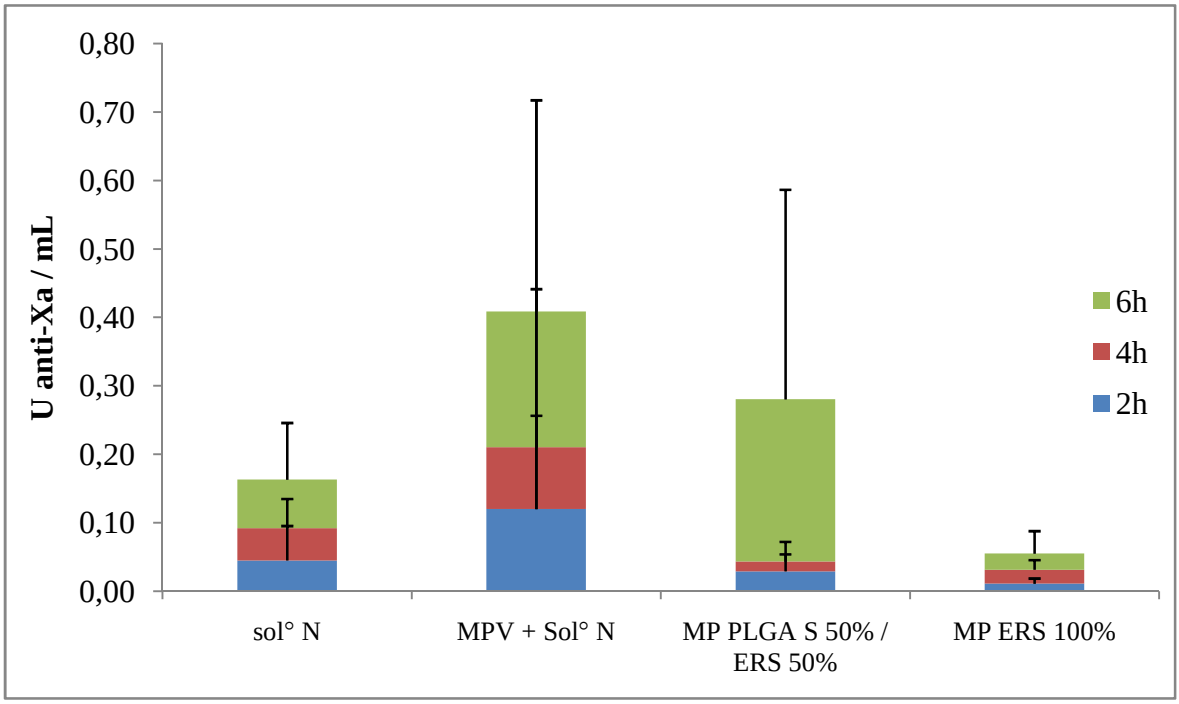


FIGURE 54 : ACTIVITE ANTI-Xa PRESENTE AU POLE BASOLATERAL, EXPRIMEE SOUS FORME CUMULEE, SUITE AU DEPOT DES TEMOINS OU DES MICROPARTICULES 100 CHARGEES EN NADROPARINE, N ∈ [4-9] PUITS.

Témoins : solution de nadroparine 100 unités anti-Xa/puits et microparticules vierges en présence d'une solution de nadroparine 100 unités anti-Xa/puits.

Microparticules : microparticules chargées en nadroparine issues des formulations PLGA S 50% / ERS 50% et ERS 100%.

Enfin, les microparticules composées uniquement d'Eudragit® RS pur permettent également une élévation de la perméabilité apparente de l'activité anti-Xa du témoin « solution de nadroparine » de 2,67 fois.

L'augmentation de la perméabilité observée en présence de microparticules chargées ou non, montre que la présence des polymères (PLGA S et Eudragit® RS) aide l'héparine à franchir l'épithélium intestinal. De plus, cet effet des polymères est d'autant plus important lorsque l'héparine est encapsulée au sein des microparticules.

Enfin, une légère ouverture des jonctions serrées semble être parfois mise en évidence par une diminution très modérée du TEER au cours des 6 heures d'expérience (compris entre 205 et

455 $\Omega.cm^2$) ainsi que par une augmentation de la perméabilité apparente de la fluorescéine à la fin de l'expérience (de 1,31 à $6,43.10^{-6}$ cm/s). Il a été noté qu'en présence d'EGTA (chélateur des ions Ca^{2+}, ions nécessaires au maintien des jonctions serrées) cette perméabilité atteint 1,64 à $5,04.10^{-5}$ cm/s. Ceci nous amène à penser que l'épithélium conserve des jonctions serrées et donc une certaine intégrité.

Par comparaison aux valeurs de perméabilité apparente présentées dans les autres études (voir le tableau 9 de la bibliographie présentant un résumé de ce sujet), la perméabilité apparente anti-Xa de notre témoin est plutôt faible, de valeur comparable à celle trouvée dans une étude portant sur l'administration d'héparine en présence de thiomères [100]. Il est connu que des composés présentant une perméabilité apparente de l'ordre de 1.10^{-7} cm/s sont des composés peu perméables [188, 189]. En revanche quand la perméabilité apparente atteint une valeur comprise entre 1 et 10.10^{-6} cm/s, les substances actives sont alors considérées comme modérément absorbées [188, 189], on peut donc considérer que le système microparticulaire rend « l'activité anti-Xa » perméable à l'épithélium cellulaire.

TABLEAU 11 : PERMEABILITE APPARENTE DES ACTIVITES ANTI-Xa ET ANTI-IIa DE LA NADROPARINE SUR UN EPITHELIUM DE CELLULES CACO-2, N ∈ [4,9].

		Papp a. anti-Xa (AP → BL) $\times 10^{-8}$ (cm/s)	ER a. anti-Xa (adim.)	Papp a. anti-IIa (AP → BL) $\times 10^{-8}$ (cm/s)
Témoins	S° nadro.100 U anti-Xa/puits	6,14 ± 3,56	1	-
	MPs vierges + S° nadro 100 U anti-Xa/puits	17,22 ± 12,66	2,80	-
Formulations	PLGA S 50% / ERS 50%	28,26 ± 36,71	4,60	-
	ERS 100%	16,40 ± 5,37	2,67	-

Papp : perméabilité apparente
ER : enhanced ratio
U : unités
S° nadro. : solution de nadroparine
AP : apical
BL : basolatéral
Adim. : adimensionnel
MPs : microparticules

Les valeurs d'activité anti-IIa obtenues au pôle basolatéral étant inférieures au seuil de quantification de la méthode de dosage, les perméabilités apparentes de l'activité anti-IIa n'ont donc pas pu être calculées.

Pour affiner le mécanisme de passage de l'héparine délivré par notre système microparticulaire au sein du modèle d'épithélium, l'effet de composés modulant certaines

voies de passage tels que l'azide de sodium (inhibiteur des phénomènes actifs), la colchicine (inhibiteur de l'endocytose) ou l'EGTA (chélateur du Ca^{++} permettant une ouverture des jonctions serrées) ont été testés.

Cependant, aucun autre résultat de ces études n'a pu être exploité soit pour des problèmes d'interférence au niveau des dosages d'activités anti-Xa et anti-IIa dans le cas de l'EGTA ou soit pour des problèmes de reproductibilité des résultats d'une expérience à l'autre. Ces études préliminaires nécessiteraient d'être reproduites.

Le problème de reproductibilité est un problème récurrent de nos études de passage, ce qui nous amène donc à nuancer nos conclusions : il existe en effet dans cette étude une très grande hétérogénéité des résultats, mise en évidence par des écart-types importants. Par exemple, les microparticules de PLGA S 50% / ERS 50% déposées dans 9 inserts différents conduisent à un écart-type de 0,31 unités anti-Xa/mL à 6 heures (figure 54). En effet, au niveau du compartiment basolatéral de ces inserts, des activités anti-Xa s'échelonnant de 0,03 à 0,89 unité anti-Xa/mL ont été mesurées (résultats non présentés). La quantité d'activité anti-Xa traversant l'épithélium et rejoignant le compartiment basolatéral est donc fortement variable, aussi bien en ce qui concerne deux puits de la même plaque que pour des puits issus de plaques différentes **: les études de passage ne sont donc pas reproductibles** malgré le grand nombre d'échantillons dosés. Le même problème a été évoqué par Brayden et coll. dans la première étude qui a cherché a élucider les mécanismes de passage de l'héparine en présence de SNAC, un promoteur d'absorption [84]. Malgré des concentrations importantes en héparine déposées au pôle apical (comprises entre 500 et 1 000 UI/mL), une variabilité considérable dans les flux d'héparine est observée en présence du promoteur d'absorption (10 mg/mL) : ainsi les valeurs de perméabilité apparente variaient entre 5.10^{-8} cm/s et $2{,}9.10^{-6}$ cm/s avec une moyenne à $2{,}0.10^{-7}$ cm/s. Ce n'est qu'avec des concentrations en SNAC très élevées (50 mg/mL), alors cytotoxiques, qu'un flux reproductible d'héparine a été observé. Après avoir écarté une séquestration de l'héparine par les entérocytes, les auteurs ont conclu que la concentration en promoteur non cytotoxique n'était pas suffisante pour l'obtention d'un flux suffisamment important et reproductible. Nous nous sommes proposés de tester d'autres concentrations en microparticules qui permettent d'obtenir des activités de 50 et 200 unités anti-Xa/puits après 6 heures de libération. Dans le cas des microparticules 50, il ne nous a pas été possible de détecter l'héparine au pôle basolatéral au temps 6 heures. Contrairement à Brayden et coll., les essais issus de l'emploi de concentrations en particules plus importantes (microparticules 200) n'ont pas été plus concluants que les essais avec les microparticules

100. Dans notre étude, la quantité de microparticules ne serait donc peut être pas encore suffisante à la visualisation d'un passage reproductible de l'héparine. Cependant, vu la difficulté d'un point de vue pratique à travailler avec de telles concentrations de particules (remise en suspension, hétérogénéité des dépôts de microparticules,…), il semble qu'il faille plutôt envisager d'autres solutions afin d'élucider le passage de l'héparine. Deux options sont envisageables :

- **une mise en place d'études par microscopie confocale**. Etant donné que les quantités d'héparine qui passent l'épithélium de cellules Caco-2 sont très faibles, il pourrait être intéressant, au lieu de quantifier l'héparine, de la visualiser au sein de l'épithélium. Cet aspect qualitatif pourrait également permettre d'observer les effets du système galénique sur la membrane plasmique ou sur les jonctions serrées. Tout d'abord, un marquage de l'héparine par un composé fluorescent permettrait de visualiser, suite à une incubation des cellules en présence des microparticules, la présence de l'héparine au sein des cellules. L'utilisation d'un fluorophore tel que le YOYO-1, un marqueur du noyau imperméable à la membrane cytoplasmique des cellules, constituerait une méthode pour savoir s'il y a une perméabilisation de la membrane plasmique [210]. Enfin, l'emploi de composés comme la phalloïdine, capable de se lier avec les filaments d'actine, serait un moyen de vérifier l'intégrité des jonctions serrées. En effet, étant donné que les filaments d'actine sont associés avec les protéines responsables de la formation et du maintien des jonctions serrées, une déstabilisation des jonctions se traduit alors par une redistribution des filaments d'actine [210].
- **une amélioration du modèle cellulaire, par développement d'un modèle de Caco-2 comportant une couche de mucine à son pôle apical**. En effet, il a été remarqué qu'au cours de ces études, les particules directement au contact des cellules, adhèrent très fortement à ces dernières. Afin de se rapprocher des conditions *in vivo*, une mise en place d'un modèle de Caco-2 comportant de la mucine serait incontestablement un avantage pour cette étude. En effet, en plus de protéger les cellules du contact direct avec les particules, le mucus a montré qu'il était à l'origine d'une augmentation de la quantité d'HBPM ayant été absorbé par les cellules, probablement en favorisant la libération de l'HBPM par un mécanisme de rupture des interactions entre microparticules et héparine [123]. Cette même équipe a également étudié le passage de l'héparine au sein de ces

nanoparticules formulées par double émulsion à base d'un mélange de PLGA et d'Eudragit® RS. Le passage de l'héparine suite au dépôt des nanoparticules semblerait se faire plutôt par un mécanisme actif que par voie paracellulaire ou transcellulaire passive. Cependant, bien qu'à l'heure actuelle, un transporteur spécifique de l'héparine n'ait pas été identifié, une étude a en revanche démontré qu'*in vitro* il existe une internalisation de l'héparine par un mécanisme d'endocytose sur un modèle de cellules endothéliales [250]. De plus, les héparanes sulfate, molécules de structure très proches de celle des héparines, sont trouvées de façon ubiquitaire au sein de l'organisme. Elles sont impliquées dans de très nombreux phénomènes biologiques [28] (adhésion cellulaire, régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire, coagulation sanguine, liaison de la lipoprotéine lipase à la surface cellulaire, invasion virale, cancer). Ces molécules permettent également de protéger les protéines de la dégradation, de réguler leur transport à travers les membranes basales et jouent un rôle dans leur internalisation [25]. Par exemple, elles présentent et transportent certaines chimiokines et facteurs de croissance impliqués dans les processus d'inflammation. Il est donc probable que des récepteurs de ces molécules soient présents sur les cellules ou que, tout du moins, un phénomène d'endocytose ait lieu. Dans le cas des phénomènes de transport actifs, le modèle Caco-2 peut être un bon modèle d'étude, à la condition qu'il exprime suffisamment le transporteur mis en jeu.

Ainsi, bien que ces études n'aient pas permis de mettre en évidence le mécanisme de passage à travers l'épithélium de l'héparine administrée par voie orale sous forme de microparticules, elles constituent cependant une base pour le choix de la méthodologie à employer lors des études à venir (concentration de cellules déposées dans les puits, temps de culture, concentration en microparticules à tester, valeurs de TEER et de perméabilité apparente de la fluorescéine,…). En effet, il existe très peu d'étude de passage de molécules microencapsulées. Enfin des valeurs clefs telles que la perméabilité apparente de l'activité anti-Xa de la nadroparine et la valeur cumulée de cette activité au pôle basolatéral ont été définies.

4. ETUDES DE STABILITE

4.1. METHODOLOGIE ET BUT DE L'ETUDE

Des problèmes de stabilité de l'héparine encapsulée au sein des microparticules et des nanoparticules fabriquées à partir de PLGA et d'Eudragit® RS ont été rencontrés au laboratoire. En effet, une forte diminution de l'activité de l'héparine a été observée au cours du temps. Ainsi, quand des microparticules de nadroparine de formulations identiques à celles testées *in vivo* dans cette étude sont administrées par voie orale à des lapins 1 mois après leur fabrication, une activité anti-Xa plasmatique très faible, inférieure à 0,1 unité anti-Xa/mL est mesurée (données non présentées). Pour mémoire, des valeurs d'activité anti-Xa pouvant atteindre jusqu'à 0,62 unités anti-Xa avaient été quantifiées lors de l'administration de microparticules « fraiches » d'héparine (figure 52 (A)).

L'héparine est une molécule relativement stable en solution et elle peut être conservée plusieurs années à température ambiante : c'est donc probablement la forme pharmaceutique qui est responsable de cette chute de l'activité. Or le PLGA qui se dégrade par un mécanisme d'hydrolyse, produit des monomères acides (acide lactique et acide glycolique) [251] : ainsi différentes études ont montré qu'au sein de microparticules de PLGA un environnement fortement acide se développe, d'un pH d'environ 2 à 3 [252]. Comme un pH trop acide peut être à l'origine d'une diminution de l'activité de l'héparine [253], une évaluation du pH à l'intérieur des microparticules a été réalisée. La méthode employée est simple et consiste en l'encapsulation d'un indicateur de pH.

A cet effet, deux indicateurs universels de pH (avec une zone de virage s'étendant de pH 0 à 5 pour le premier et de 3 à 10 pour le second) ont été employés afin de balayer toute la gamme des pH acides (c'est-à-dire de 0 à 7) pouvant être rencontrés au sein des microparticules. Des particules de formulation ERS 100%, PLGA (H ou S) 50% / ERS 50%, PLGA (H ou S) 75% / ERS 25% vierges et chargées en nadroparine ont été réalisées suivant la procédure décrite précédemment. La seule différence provient de l'ajout de la solution d'indicateur de pH en phase aqueuse interne (volume de 0,20 mL) mais également en phase aqueuse externe (volume de 16 mL).

Comme il est connu que le principal facteur qui contrôle la vitesse de dégradation du PLGA est la pénétration de l'eau au sein du polymère [254], il a été choisi de réaliser des études de

dégradation accélérées avec une humidité relative élevée mais à température ambiante. Ainsi, une humidité relative d'environ 75% à 25°C a été obtenue en plaçant une solution saturée de NaCl dans un dessiccateur [255]. Une fraction de l'échantillon des microparticules est placée en conditions accélérées alors qu'une autre fraction, laissée à température ambiante et dans des conditions d'humidité relative ambiante, sert de témoin. Une évaluation visuelle du pH ainsi que des photographies ont été réalisées à intervalles de temps réguliers (chaque mois), durant 8 mois (dans le cas des microparticules placées en conditions accélérées) ou 2 ans (cas des microparticules placées en conditions « ambiantes »).

4.2. RESULTATS ET DISCUSSION

Comme des valeurs de pH supérieures à 5 ont été obtenues, seuls les résultats avec l'indicateur de pH 3-10 sont présentés (tableau 15, annexe) aux temps 0, 2, 4, 8 mois et 2 ans.

Suite à l'étape de fabrication, une différence nette de coloration, indépendante de la composition en polymère, apparait entre microparticules vierges et microparticules chargées. En effet, l'indicateur de pH montre qu'il existe au sein des microparticules vierges un pH compris entre 7 et 8 (indicateur de couleur verte) alors que les microparticules chargées en nadroparine possèdent un pH beaucoup plus acide, aux alentours de 4 (indicateur de couleur orange). Ceci s'explique notamment par le fait que les microparticules chargées sont préparées à partir de la solution commerciale dont le pH est ajusté au moyen d'acide entre 4,5 et 7,5 (données fournisseur). Une mesure expérimentale au moyen de papier pH indique que le pH de la solution utilisée se situe entre 4 et 5.

En conditions de stabilité accélérée (température ambiante, humidité relative de 75%)**, le pH à l'intérieur des microparticules chargées ne varie pas ou peu au cours du temps alors que le pH des formulations vierges diminue beaucoup au cours de l'étude.**

En présence d'humidité relative à 75%, les diminutions les plus importantes de pH sont observées avec les microparticules vierges de PLGA (H ou S) 50% / ERS 50% : ainsi toutes les particules passent d'un pH compris de 6 à 8 à un pH de 4 à 5 en deux mois (Tableau 15, annexe). De façon surprenante, une diminution importante du pH au sein des microparticules vierges d'ERS 100% est également notée à deux mois : en effet, la moitié des particules présente un pH de 6, alors que le pH initial était de 8.

En revanche, en conditions normales, le pH des microparticules vierges ne varie pas durant cette période de temps : il faut en effet attendre 4 mois pour que les premières traces d'une diminution de pH puissent être observées (tableau 15, annexe).

Ainsi, il semble que la dégradation des PLGA mais également celle de l'Eudragit® RS génèrent une acidité importante au sein des particules vierges. Il est probable que le même phénomène se produise au sein des particules chargées, mais étant donné que le pH à l'intérieur des particules est déjà acide, le phénomène n'est pas visualisable.

D'un point de vue chimique, le PLGA est un copolymère d'acide lactique et glycolique. Cependant, on distingue différents types de PLGA en fonction i) de la nature de l'acide lactique employé et ii) de la proportion entre les unités acides lactiques et les unités acides glycoliques. En effet, l'acide lactique est une molécule chirale, qui existe sous deux formes optiquement actives : l'acide L-lactique et l'acide D-lactique. Dans cette étude, le PLGA utilisé est un acide 50/50 (D,L-lactique-co-glycolique). Ce mélange, de nature amorphe (vérification établie par DSC, données non présentées), est connu pour être plus instable à la dégradation que les homopolymères : sa dégradation intervient en seulement 1 à 2 mois environ par un mécanisme d'érosion dans la masse suite à une hydrolyse des liaisons esters [251].

Le fait que la production d'acidité au sein des formulations vierges contenant du PLGA ne soit détectée qu'après 4 mois en conditions normales, ne signifie pas pour autant que la dégradation du polymère n'a pas commencé avant. En effet, dans ce type d'érosion, c'est tout à la fin du processus de dégradation que les oligomères deviennent assez petits pour migrer hors de la matrice [256]. Ainsi, il est possible que l'acidité générée durant les tous premiers mois de l'étude de stabilité soit insuffisante pour être détectée par l'indicateur de pH. En effet, cette méthode donne uniquement une indication qualitative sur la variation du pH.

La génération d'acidité au sein des particules d'Eudragit® RS pures, lors des études de stabilité accélérée, est inattendue étant donné que ce polymère est considéré comme stable du point de vue chimique (présence d'un squelette carboné) [257]. Les études de stabilité menées avec les polymère de cette famille ont montré qu'ils sont peu sensibles à l'hydrolyse : ils n'absorbent en effet qu'une quantité très limitée d'eau (inférieure à 10%) lorsqu'ils sont placés dans une atmosphère dont l'humidité relative est de 75% [257]. De plus, l'Eudragit® RS est le type d'Eudragit le moins hygroscopique de tous, en raison de sa teneur plus faible en groupements ammonium quaternaire [257]. Malgré ces études, la génération d'acide au sein

des microparticules vierges composées uniquement d'Eudragit® RS est relativement importante, elle pourrait notamment provenir des groupements ammonium quaternaire.

Pour conclure, la méthode de fabrication des microparticules, à partir de solutions commerciales d'héparine de pH acide, génère un pH intraparticulaire d'environ 4. Ce pH ne varie ensuite pas de façon significative au cours d'une durée de 8 mois. Etant donné que des problèmes de stabilité sont observés dès le premier mois de fabrication, il ne semble pas que ce soit le pH au sein des microparticules qui soit le responsable direct de cette baisse de stabilité. En revanche des réactions entre les produits de dégradation issus des polymères et la substance active (type complexation) pourraient être à l'origine de cette perte d'activité.

CONCLUSION

Des microparticules d'héparine ont été préparées par la méthode de la double émulsion suivie d'une extraction du solvant organique à partir d'un polymère non biodégradable polycationique l'Eudragit® RS utilisé seul ou en mélange avec un polymère biodégradable, l'acide poly(lactique-co-glycolique). Deux héparines de bas poids moléculaire (HBPM) de rapport anti-Xa/anti-IIa différents (l'un élevé et l'autre bas) ont été encapsulées : la nadroparine de rapport 3,5 et la tinzaparine de rapport 1,8.

Le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa, caractéristique de chaque HBPM, en plus de quantifier de façon simple l'importance relative des activités anti-Xa et anti-IIa, donne accès à la proportion de chaines actives courtes (BCL) par rapport aux chaines actives longues (ACL).

L'objectif de ce travail fut, au travers de l'évaluation du rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa, de déterminer dans un premier temps si des microparticules polymériques d'héparine permettent d'encapsuler et de libérer *in vitro* de façon préférentielle un des types de chaines actives de l'héparine (courtes c'est-à-dire BCL ou longues c'est-à-dire ACL). Dans un second temps, l'évaluation du passage des chaines d'héparine libérées des microparticules à travers une barrière épithéliale (*in vitro* sur culture cellulaire ou *in vivo* chez le lapin) a permis de déterminer i) s'il existe une absorption facilitée d'un des types de chaine et ii) si le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa retrouvé au niveau du plasma des lapins est d'un ordre de grandeur similaire à celui issu de l'injection sous-cutanée de la solution commerciale.

Il a été démontré que les microparticules d'héparine, indépendamment de l'HBPM utilisée, favorisent i) une encapsulation préférentielle des chaines ACL au sein de la matrice polymérique par comparaison aux chaines BCL (diminution du rapport anti-Xa/anti-IIa) ii) une libération *in vitro* des chaines BCL, plus courtes et moins chargées que les chaines ACL qui sont retenues au sein de la matrice (augmentation du rapport anti-Xa/anti-IIa). Cette augmentation du rapport anti-Xa/anti-IIa varie (cas de la nadroparine) ou non (cas de la tinzaparine) en fonction de la composition polymérique. Cette différence de comportement s'explique principalement par la capacité de l'Eudragit® RS à retenir fortement les chaines ACL de nadroparine.

Les études *in vivo* ont montré que suite à l'administration *per os* à des lapins de certaines formulations de microparticules de nadroparine (ERS 100%, PLGA (H ou S) 50 % / ERS 50% avec ou sans PEG), une absorption des chaines BCL et ACL est observée. Si l'absorption des chaines BCL est plutôt homogène d'une formulation à l'autre, l'absorption importante des chaines ACL est liée à la présence de PEG ou à une composition de la matrice

exclusive en Eudragit® RS. L'absorption hétérogène des chaines ACL d'une formulation à l'autre conduit à l'obtention de rapports anti-Xa/anti-IIa plasmatiques différents mais tous compris entre 5 et 15, zone de valeur des rapports anti-Xa/anti-IIa plasmatiques issus de l'injection sous-cutanée. La forme microparticulaire d'héparine constitue donc un substitut de la forme commerciale relativement proche en terme d'activité anti-Xa/anti-IIa mais avec de surcroit une action prolongée pendant plusieurs heures.

Des études par microscopie confocale ont cherché à localiser le lieu d'absorption préférentiel des héparines au niveau intestinal suite à l'administration orale à des lapins de microparticules contenant de la nadroparine marquée par fluorescence. Cependant, des problèmes techniques n'ont pas permis de déboucher sur des résultats exploitables.

Enfin, suite à des études qui ont démontré la faible cytotoxicité du système microparticulaire, le passage de l'héparine à travers un épithélium de cellules Caco-2 a été évalué suite au dépôt des microparticules. Si l'absorption des chaines ACL est nulle sur un tel épithélium, il existe en revanche un passage des chaines BCL. Ces résultats, contredisant ceux obtenus *in vivo*, sont néanmoins à nuancer et à confirmer compte tenu de leur faible reproductibilité (écarts-types importants). De plus, le mécanisme responsable du passage cellulaire des chaines BCL reste à identifier. Il serait intéressant pour cela de mener les études de passage intestinal sur un modèle *ex-vivo* d'intestin perfusé qui permettrait de s'affranchir de certaines limites des modèles de culture cellulaire et de se rapprocher des conditions physiologiques (présence de mucus, d'enzymes, de transporteurs, d'une membrane basale et jonctions serrées plus lâches).

Ainsi la détermination de la zone intestinale d'absorption préférentielle et la connaissance du mécanisme d'absorption cellulaire des chaines d'héparine permettrait d'améliorer encore la forme pharmaceutique proposée. En effet, il pourrait être envisagé, à la lumière de ces informations, de concevoir un vecteur ciblant très précisément la zone d'absorption préférentielle et ayant la capacité d'agir au niveau cellulaire sur le mécanisme de passage proprement dit (greffage de ligands spécifiques).

ANNEXES

TABLEAU 12 : CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES MICROPARTICULES DE NADROPARINE FABRIQUEES EN UTILISANT DU PEG EN PHASE INTERNE (n=3).

	Tailles (µm)	**Taux d'encapsulation moyen**		**Rapport anti-Xa/anti-IIa**	**Activité anti-Xa**		**Activité anti-IIa**	
		TE (%)	Teneur (U/g de poly)	adimentionnel	TE (%)	Teneur (U a-Xa/g de poly.)	TE (%)	Teneur (U a-IIa/g de poly.)
PLGA H 50% / ERS 50% + PEG	62 ± 31	88 ± 3	17 569 ± 668	3,26 ± 0,04	89 ± 3	17 911 ± 590	96 ± 2	5489 ± 116
PLGA S 50% / ERS 50% + PEG	91 ± 32	82 ± 4	16 312 ± 709	3,14 ± 0,02	85 ± 1	17 062 ± 269	95 ± 1	5435 ± 50

TE-taux d'encapsulation

U : unités

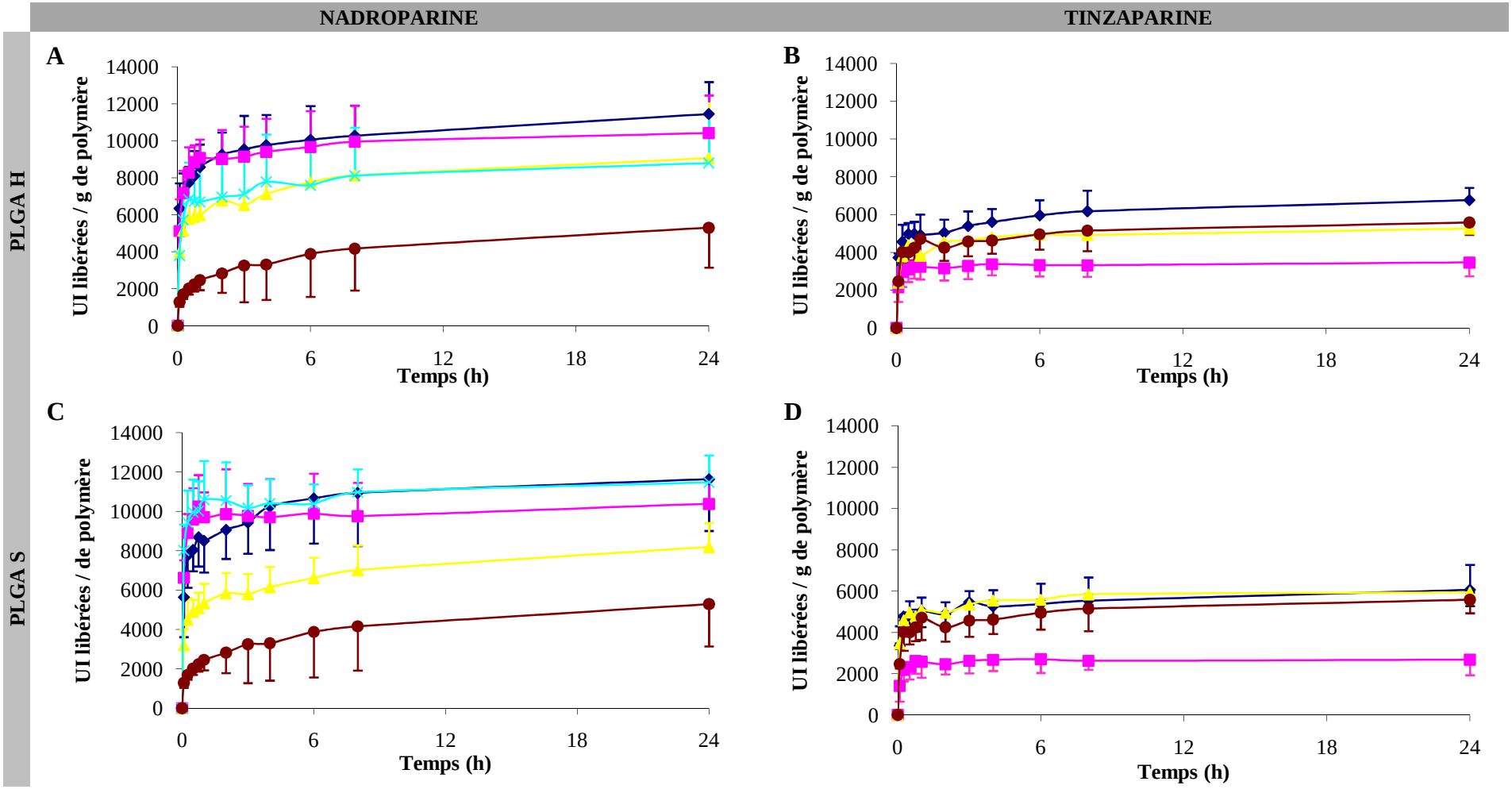


FIGURE 55: PROFILS DE LIBERATION *IN VITRO* (EXPRIMES EN UNITES LIBEREES/G DE POLYMERE) DE LA NADROPARINE (A ET C) ET DE LA TINZAPARINE (B ET D) A PARTIR DE MICROPARTICULES DE FORMULES : ■ PLGA (H OU S) 75% / ERS 25%, ◆PLGA (H OU S) 50% / ERS 50%, × PLGA (H OU S) 50% / ERS 50% + PEG, ▲ PLGA (H OU S) 25% / ERS 75%, ● ERS 100% (n=3).

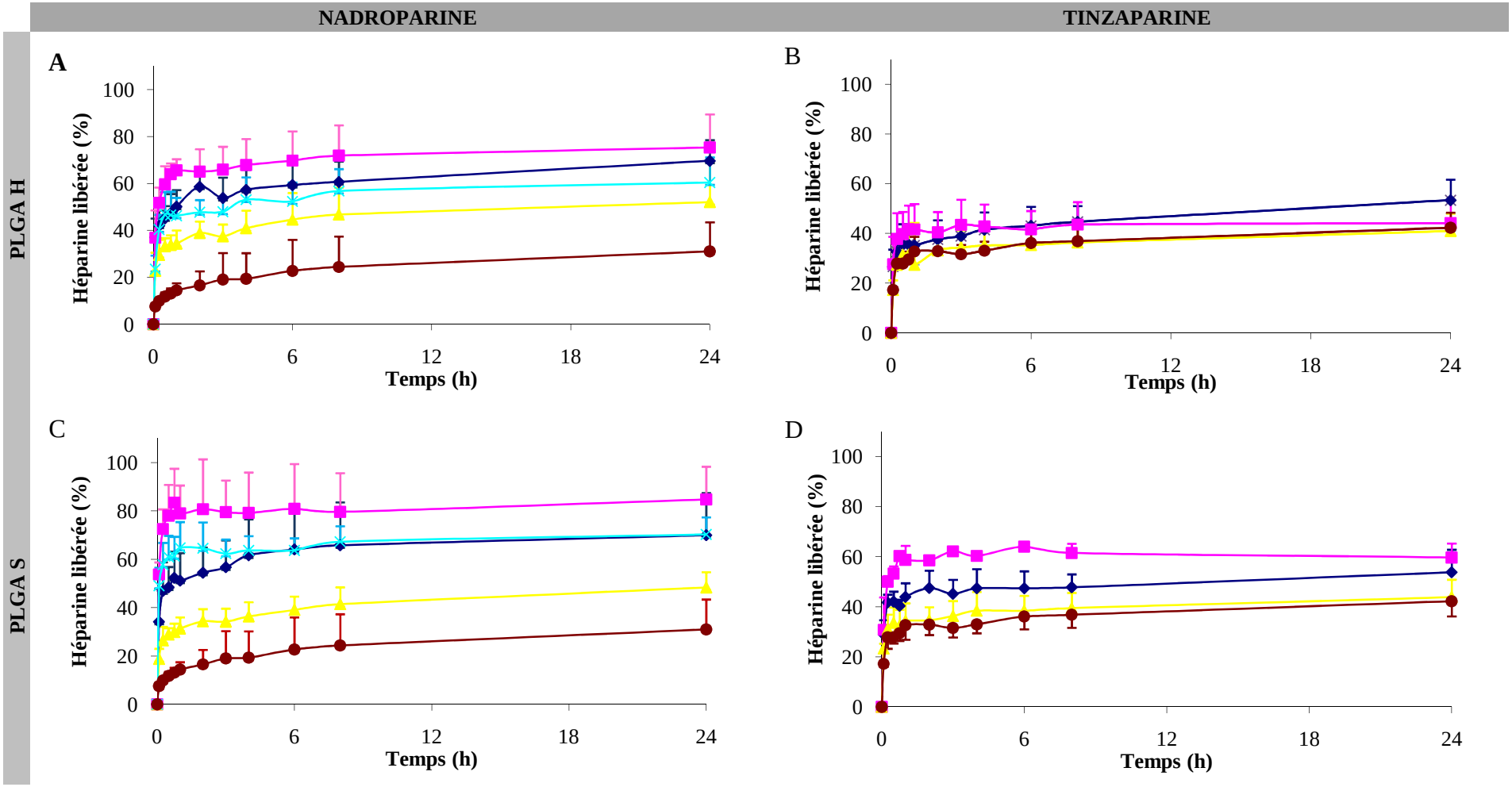


FIGURE 56 : PROFILS DE LIBERATION *IN VITRO* (EXPRIMES EN POURCENTAGES) DE LA NADROPARINE (A ET C) ET DE LA TINZAPARINE (B ET D) A PARTIR DE MICROPARTICULES DE FORMULES : ■ PLGA (H OU S) 75% / ERS 25%, ◆ PLGA (H OU S) 50% / ERS 50%, × PLGA (H OU S) 50% / ERS 50% + PEG, ▲ PLGA (H OU S) 25% / ERS 75%, ● ERS 100% (n=3).

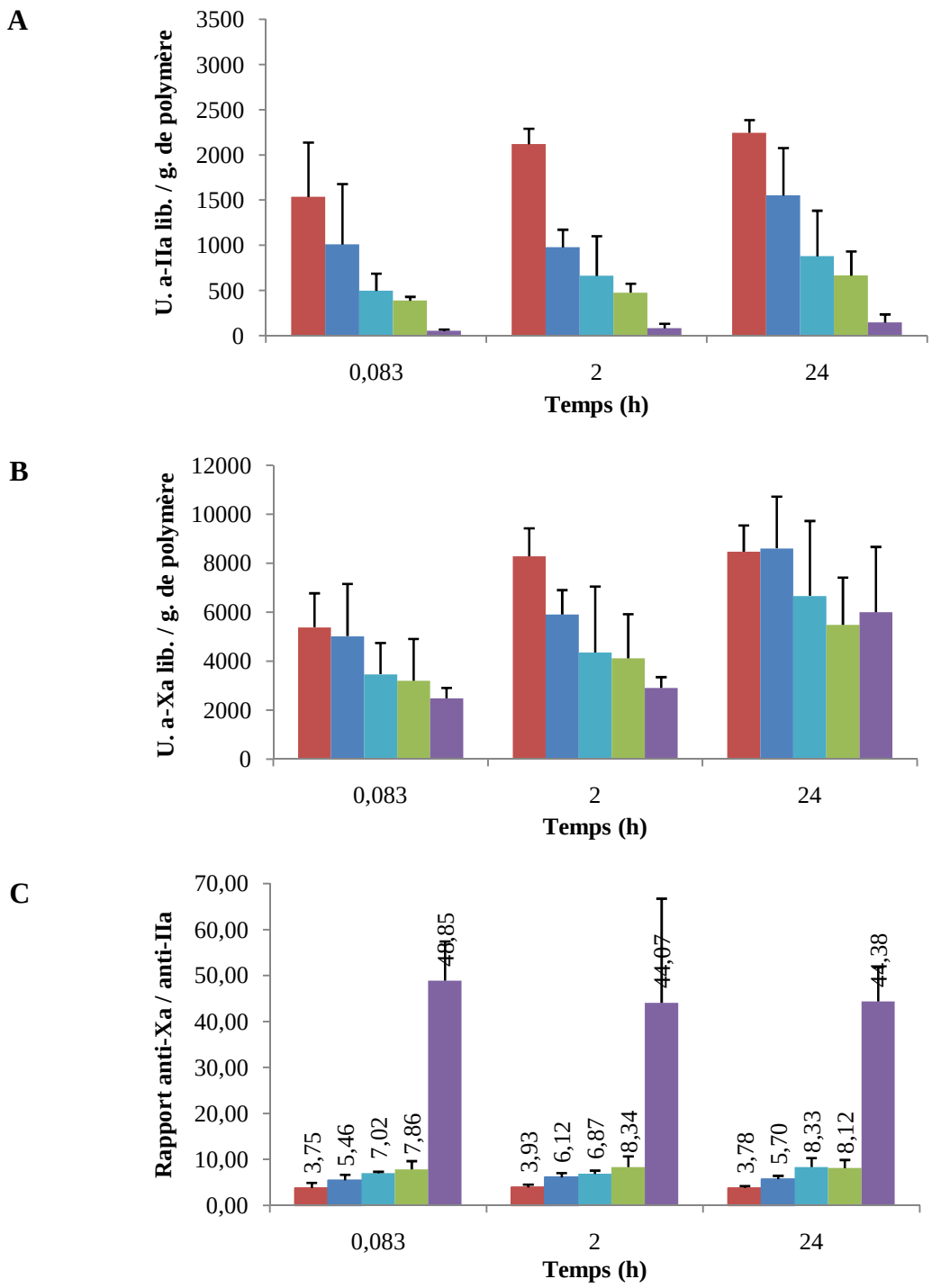


FIGURE 57 : (A) ACTIVITES ANTI-IIa ET (B) ANTI-Xa ET (C) RAPPORT ANTI-Xa/ANTI-IIa LIBERES *IN VITRO* DE MICROPARTICULES DE NADROPARINE FORMULEES A PARTIR DE L'EUDRAGIT® RS SEUL OU EN MELANGE AVEC LE PLGA H (n=3).

Légende : ■ PLGA H 75% / ERS 25%, ■ PLGA H 50% / ERS 50%, ■ PLGA H 50% / ERS 50% + PEG, ■ PLGA H 25% / ERS 75%, ■ ERS 100%.

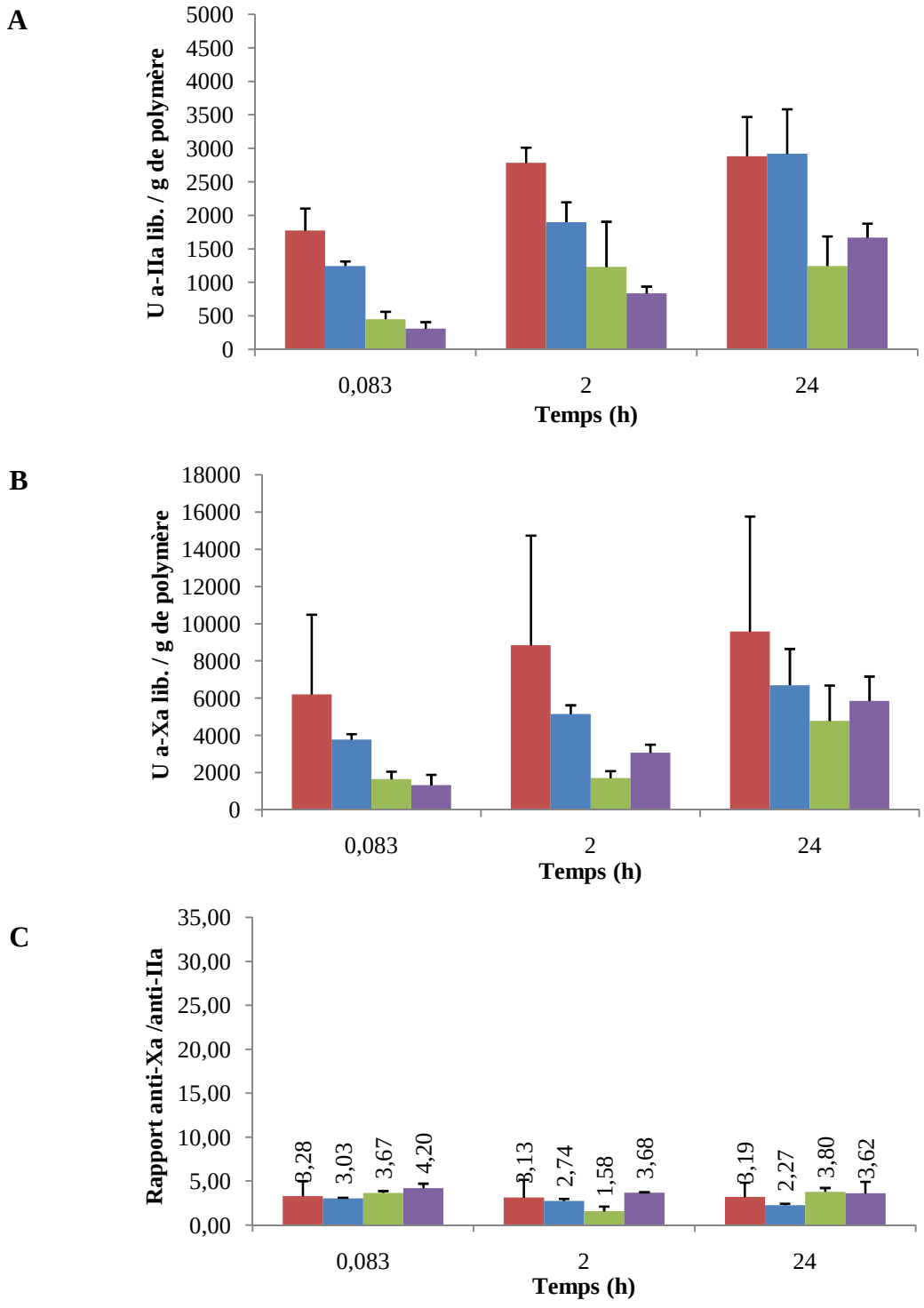
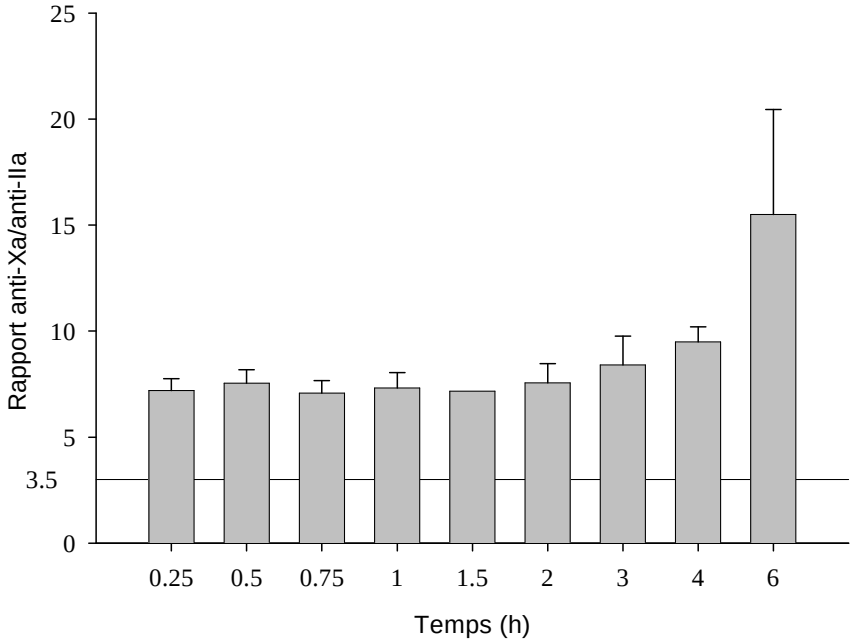


FIGURE 58 : (A) ACTIVITES ANTI-IIa ET (B) ANTI-Xa ET (C) RAPPORT ANTI-Xa/ANTI-IIa LIBERES *IN VITRO* DE MICROPARTICULES DE TINZAPARINE FORMULEES A PARTIR D'EUDRAGIT® RS SEUL OU EN MELANGE AVEC LE PLGA H (n=3).

Légende : PLGA H 75% / ERS 25%, PLGA H 50% / ERS 50%, PLGA H 25% / ERS 75%, ERS 100%

A



B

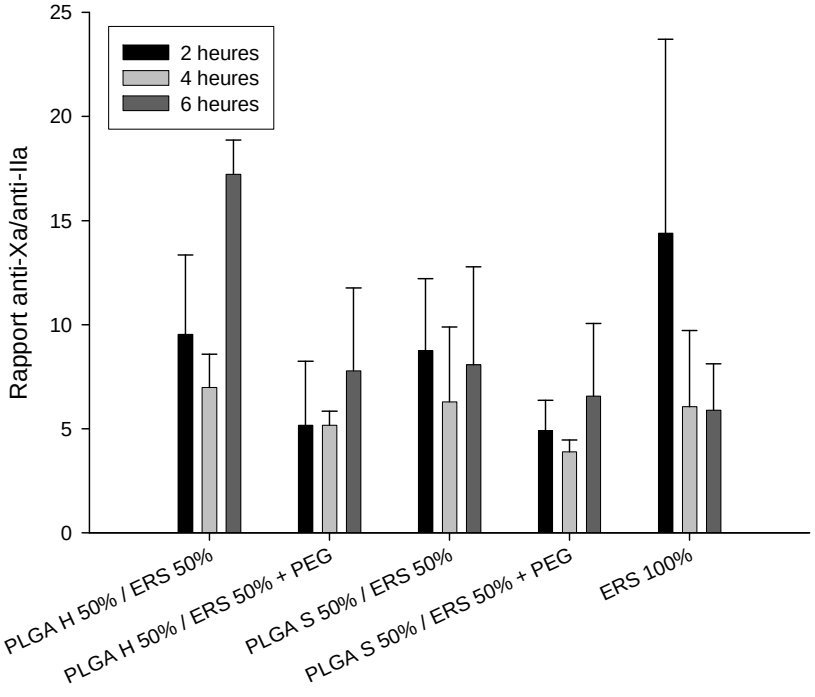


FIGURE 59 : RAPPORT ANTI-Xa/ANTI-IIa OBTENUS CHEZ LE LAPIN SUITE (A) A L'INJECTION SOUS CUTANEE DE LA SOLUTION COMMERCIALE DE NADROPARINE (150 UNITES ANTI-Xa/kg) OU (B) A L'ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE DE MICROPARTICULES DE NADROPARINE A LA DOSE DE 600 UNITES ANTI-Xa/kg (n=3).

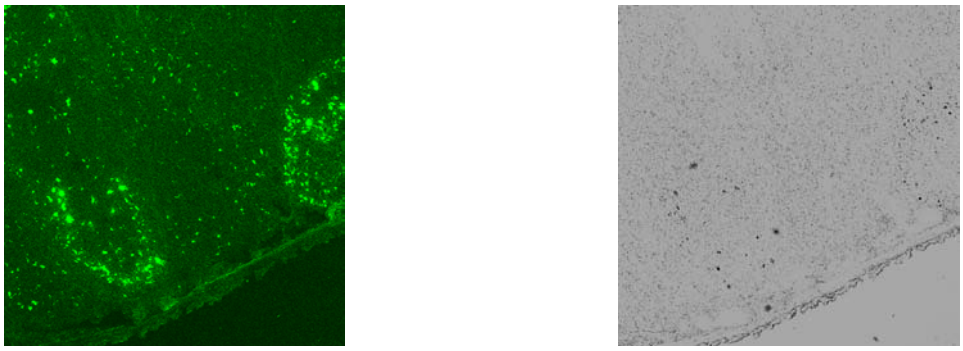
TABLEAU 13 : PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES OBTENUS SUITE A L'ADMINISTRATION ORALE DE MICROPARTICULES DE NADROPARINE (A LA DOSE DE 600 UNITES ANTI-Xa/kg) OU SUITE A L'INJECTION SOUS-CUTANEE DE LA SOLUTION COMMERCIALE DE NADROPARINE (A LA DOSE DE 150 UNITES ANTI-Xa/kg), (n=3).

		Unités	Sous-cutanée	PLGA H 50% / ERS 50%	PLGA S 50% / ERS 50%	PLGA H 50% / ERS 50% + PEG	PLGA S 50% / ERS 50% + PEG	ERS 100%
Activité anti-Xa	**C_{max}**	U anti-Xa/mL	0,98 +/- 0,06	0,47 +/- 0,12	0,59 +/- 0,12	0,62 +/- 0,12	0,57 +/- 0,02	0,56 +/- 0,16
	t_{max}	h	1	4	4	4	4	4
	AUC/kg $_{0\text{-}24h}$	U anti-Xa.h.mL^{-1}.kg^{-1}	1,11 +/- 0,05	0,83 +/- 0,32	1,67 +/- 0,28	1,46 +/- 0,27	1,49 +/- 0,53	1,76 +/- 0,27
	Biodisponibilité relative	%	100	19 +/- 7	38 +/- 6	33 +/- 6	33 +/- 12	40 +/- 6
Activité anti-IIa	**C_{max}**	U anti-IIa/mL	0,14 +/- 0,02	0,07 +/- 0,01	0,11 +/- 0,04	0,14 +/- 0,06	0,15 +/- 0,02	0,10 +/- 0,03
	t_{max}	h	1	4	4	2	4	4
	AUC/kg $_{0\text{-}24h}$	U anti-IIa.h.mL^{-1}.kg^{-1}	0,16 +/- 0,00	0,06 +/- 0,01	0,18 +/- 0,05	0,24 +/- 0,03	0,31 +/- 0,05	0,26 +/- 0,01
	biodisponibilité relative	%	100	10 +/- 2	27 +/- 8	36 +/- 4	47+/- 8	40 +/- 2

TABLEAU 14 : PHOTOGRAPHIES DE COUPES D'INTESTIN DE LAPIN DE 20 µM (PLAQUES DE PEYER) OBSERVEES PAR MICROSCOPIE CONFOCALE, GROSSISSEMENT X10.

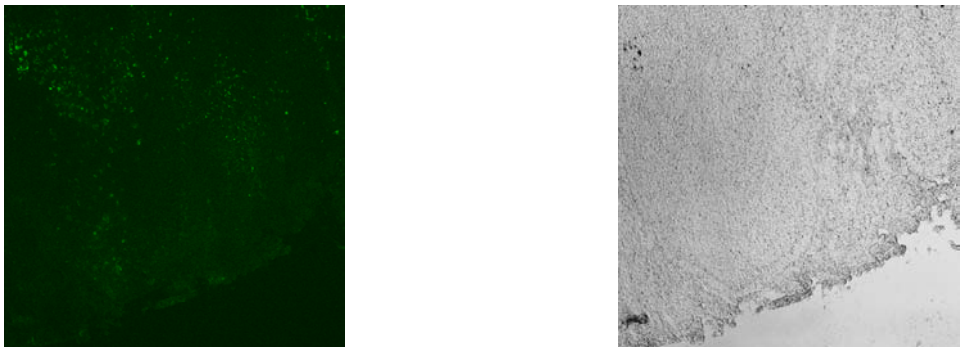
A gauche : observation confocale et à droite : observation optique.

A



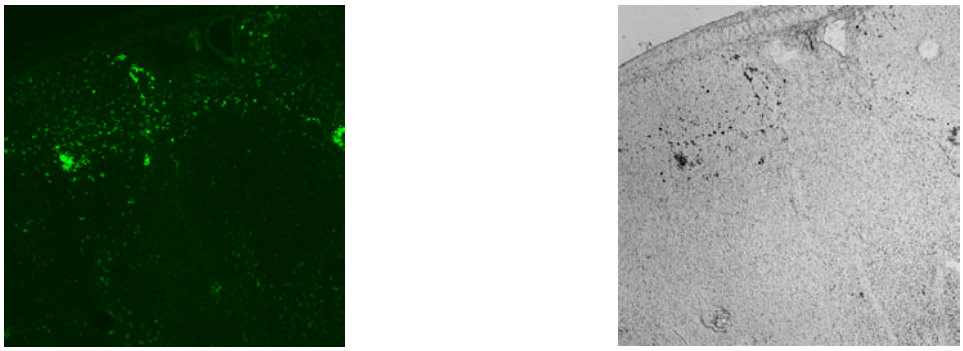
(A) Témoin « tissu » sans réglages, c'est-à-dire sans éteindre l'autofluorescence naturelle des tissus.

B



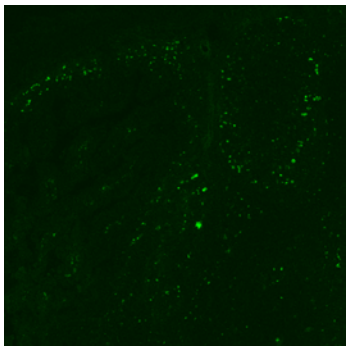
(B) Témoin « tissu » après réglages c'est-à-dire en éteignant l'autofluorescence des tissus

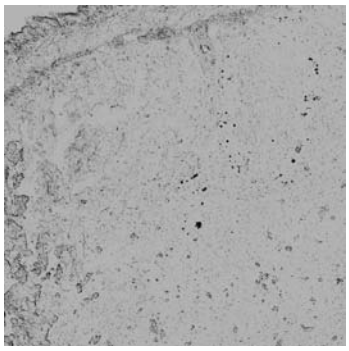
C



(C) Témoin « microparticules vierges » après réglages

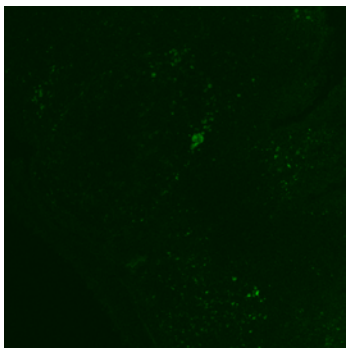
D

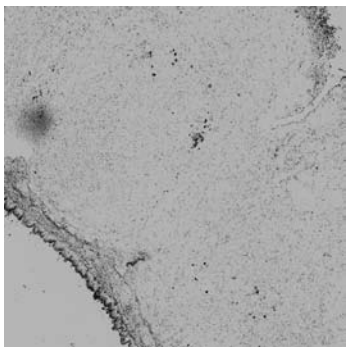




(D) Témoin « solution de nadroparine », après réglages.

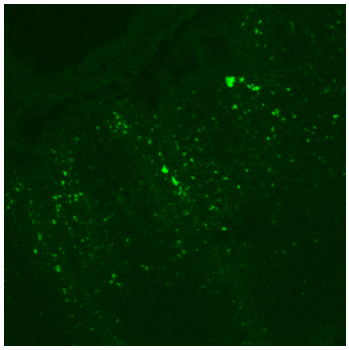
E

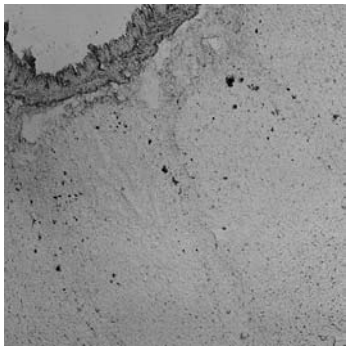




(E) Microparticules de nadroparine (formulation PLGA S 50% / ERS 50%) après réglages.

F





(F) Microparticules de nadroparine (formulation ERS 100%) après réglages.

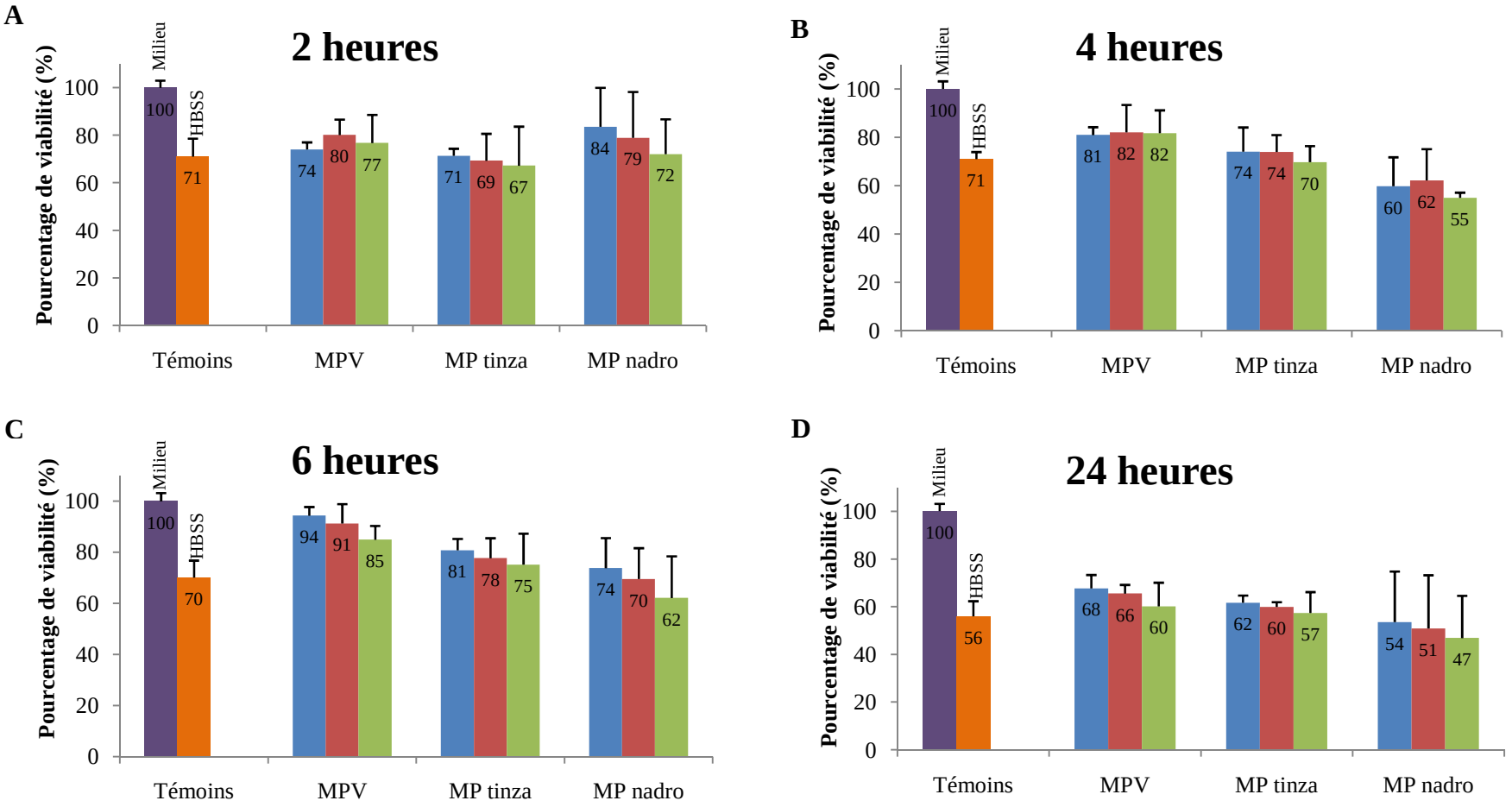
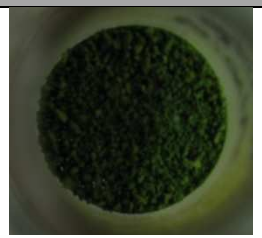


FIGURE 60 : VIABILITE DES CELLULES CACO-2 (EXPRIMEE EN POURCENTAGE), SUITE A LEUR EXPOSITION DURANT 2(A), 4(B), 6(C) OU 24 (D) HEURES A DES MICROPARTICULES VIERGES, CHARGEES EN NADROPARINE OU EN TINZAPARINE A DES CONCENTRATIONS DE 1 (■), 5 (■) OU 10 (■)MG/CM^2. DES TEMOINS MILIEU DE CULTURE (■) ET HBSS (■) ONT EGALEMENT REALISES (n=9).

TABLEAU 15 : PHOTOGRAPHIES DE MICROPARTICULES ENCAPSULANT UN INDICATEUR DE PH ET SOUMISES A UNE ETUDE DE STABILITE ACCELEREE.

Formulations		Fabrication	T = 2 mois	T = 3 mois	T = 4 mois	T = 8 mois	T= 2 ans
MPV ERS 100%	Cdt amb.						NR
	Cdt acc.	-					NR
MPC ERS 100%	Cdt amb.						NR
	Cdt acc.	-					NR

Formulations		Fabrication	T = 2 mois	T = 3 mois	T = 4 mois	T = 8 mois	T= 2 ans
MPV PLGA S 50% / ERS 50%	Cdt amb.						
	Cdt acc.	-					NR
MPC PLGA S 50% / ERS 50%	Cdt amb.						
	Cdt acc.	-					NR

Formulations		Fabrication	T = 2 mois	T = 3 mois	T = 4 mois	T = 8 mois	T= 2 ans
MPV PLGA H 50% / ERS 50%	Cdt amb.						
	Cdt acc.	-					NR
MPC PLGA H 50% / ERS 50%	Cdt amb.						
	Cdt acc.	-					NR

Abréviations

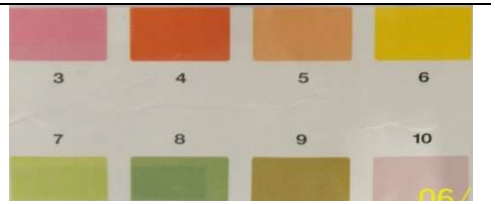
MPC : microparticules chargées en nadroparine

MPV : Microparticules vierges

Cdt acc. : conditions accélérées de dégradation

Cdt amb. : conditions ambiantes

Correspondance entre couleur et pH :



BIBLIOGRAPHIE

[1] T. De revel, K. Doghmi, Physiologie de l'hémostase. EMC-Dentisterie 1 (2004) 71-81.
[2] J.C. Rau, L.M. Beaulieu, J.A. Huntington, F.C. Church, Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. J Thromb Haemost 5 Suppl 1 (2007) 102-115.
[3] D.S. Mirors, Haemostasis, blood platelets and coagulation. anaesthesia and intensive care medecine 8(5) (2007) 214-216.
[4] R.K. Andrews, M.C. Berndt, Platelet physiology and thrombosis. Thromb Res 114(5-6) (2004) 447-453.
[5] M.L. Rand, R. Leung, M.A. Packham, Platelet function assays. Transfus Apher Sci 28(3) (2003) 307-317.
[6] R.F. van der Putten, J.F. Glatz, W.T. Hermens, Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes. Clin Chim Acta 371(1-2) (2006) 37-54.
[7] M. Mathias, R. Liesner, understanding haemostasis. Paediatr Child Health 17(8) (2007) 317-321.
[8] R. Ajjan, P.J. Grant, Coagulation and atherothrombotic disease. Atherosclerosis 186(2) (2006) 240-259.
[9] A.H. Schmaier, Assembly, activation, and physiologic influence of the plasma kallikrein/kinin system. Int Immunopharmacol 8(2) (2008) 161-165.
[10] T. Sugi, T. Makino, Plasma contact system, kallikrein-kinin system and antiphospholipid-protein antibodies in thrombosis and pregnancy. J Reprod Immunol 47(2) (2000) 169-184.
[11] A.S. Wolberg, Thrombin generation and fibrin clot structure. Blood Rev 21(3) (2007) 131-142.
[12] D. Gailani, T. Renne, The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? J Thromb Haemost 5(6) (2007) 1106-1112.
[13] K. Gomez, J.H. McVey, E. Tuddenham, Inhibition of coagulation by macromolecular complexes. Haematologica 90(11) (2005) 1570-1576.
[14] D.M. Tollefsen, Heparin Cofactor II Modulates the Response to Vascular Injury. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27 (2007) 454-460.
[15] D. O'Keeffe, S.T. Olson, N. Gasiunas, J. Gallagher, T.P. Baglin, J.A. Huntington, The heparin binding properties of heparin cofactor II suggest an antithrombin-like activation mechanism. J Biol Chem 279(48) (2004) 50267-50273.
[16] H.C. Hemker, S. Beguin, in: H. Bounameux (Ed.), Low-molecular-weight heparins in prophylaxis and therapy of thromboembolic diseases (fundamental clinical cardiology series), Vol. 19, Editions Medicales Inter-nationales, New York, 1994, pp. 21-42.
[17] N.S. Quinsey, A.L. Greedy, S.P. Bottomley, J.C. Whisstock, R.N. Pike, Antithrombin: in control of coagulation. Int J Biochem Cell Biol 36(3) (2004) 386-389.
[18] W. Li, D.J. Johnson, C.T. Esmon, J.A. Huntington, Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. Nat Struct Mol Biol 11(9) (2004) 857-862.
[19] S.T. Olson, Y.J. Chuang, Heparin activates antithrombin anticoagulant function by generating new interaction sites (exosites) for blood clotting proteinases. Trends Cardiovasc Med 12(8) (2002) 331-338.
[20] W. Ageno, F. Dentali, Venous thromboembolism and arterial thromboembolism. Many similarities, far beyond thrombosis per se. Thromb Haemost 100(2) (2008) 181-183.
[21] M. Berruyer, M. Hanss, P. Ffrench, M. Dechavanne, Anomalies constitutionnelles de l'hémostase impliquées dans la thrombose veineuse. Revue Française des Laboratoires 339 (2002) 45-52.
[22] A. Armand-Perrouxa, M.-T. Barrellier, La thrombose veineuse : quoi de neuf ? Réanimation 17 (2008).

[23] C. Kearon, S.R. Kahn, G. Agnelli, S. Goldhaber, G.E. Raskob, A.J. Comerota, Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest 133(6 Suppl) (2008) 454S-545S.
[24] M. Samama, A. Babinet-Berthier, [The new heparins]. J Mal Vasc 17(2) (1992) 91-106.
[25] D.L. Rabenstein, Heparin and heparan sulfate: structure and function. Nat Prod Rep 19(3) (2002) 312-331.
[26] M. Samama, D. P., Pharmacologie des héparines de bas poids moléculaire. Médecine Thérapeutique 2(5) (1996) 395-402.
[27] J. Hirsh, K.A. Bauer, M.B. Donati, M. Gould, M.M. Samama, J.I. Weitz, Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest 133(6 Suppl) (2008) 141S-159S.
[28] N. Gandhi, R. Mancera, The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. Chem Biol Drug Des 72 (2008) 455-482.
[29] I. Capila, R.J. Linhardt, Heparin-protein interactions. Angew Chem Int Ed Engl 41(3) (2002) 391-412.
[30] M. Petitou, J.P. Herault, A. Bernat, P.A. Driguez, P. Duchaussoy, J.C. Lormeau, J.M. Herbert, Synthesis of thrombin-inhibiting heparin mimetics without side effects. Nature 398(6726) (1999) 417-422.
[31] D.A. Lane, J. Denton, A.M. Flynn, L. Thunberg, U. Lindahl, Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. Biochem J 218(3) (1984) 725-732.
[32] E. Gray, B. Mulloy, T.W. Barrowcliffe, Heparin and low-molecular-weight heparin. Thromb Haemost 99(5) (2008) 807-818.
[33] K.A. Tanaka, J.H. Levy, Regulation of thrombin activity--pharmacologic and structural aspects. Hematol Oncol Clin North Am 21(1) (2007) 33-50.
[34] B. Casu, I. Vlodavsky, R. Sanderson, Non-Anticoagulant Heparins and Inhibition of Cancer. Pathophysiol Haemost Thromb 08(36) (2007) 195-203.
[35] J. Choay, Structure and activity of heparin and its fragments: an overview. Semin Thromb Hemost 15(4) (1989) 359-364.
[36] L.H. Lam, J.E. Silbert, R.D. Rosenberg, The separation of active or inactive forms of heparin. Biochem Biophys Res Commun 69(2) (1976) 570-577.
[37] R.L. Bick, E.P. Frenkel, J. Walenga, J. Fareed, D.A. Hoppensteadt, Unfractionated heparin, low molecular weight heparins, and pentasaccharide: basic mechanism of actions, pharmacology, and clinical use. Hematol Oncol Clin North Am 19(1) (2005) 1-51, v.
[38] D. Buzzega, F. Maccari, N. Volpi, Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis for the determination of molecular mass of heparins and low-molecular-weight (LMW) heparins. Electrophoresis 29(20) (2008) 4192-4202.
[39] H.M. Wang, D. Loganathan, R.J. Linhardt, Determination of the pKa of glucuronic acid and the carboxy groups of heparin by 13C-nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. Biochem J 278 (Pt 3) (1991) 689-695.
[40] R. al Dieri, S. Alban, S. Beguin, H.C. Hemker, Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. J Thromb Haemost 2(8) (2004) 1395-1401.
[41] D. Massignon, Les limites du bilan standard d'hémostase. Revue Française des Laboratoires 370 (2005) 33-40.
[42] B. Boneu, F. Nguyen, J. Cambus, Difficultés et pièges de la surveillance des traitements par l'héparine. Sang Thrombose Vaisseaux 15(3) (2003) 131-134.
[43] A.N. Teien, M. Lie, Evaluation of an amidolytic heparin assay method: increased sensitivity by adding purified antithrombin III. Thromb Res 10(3) (1977) 399-410.

[44] M. Sobel, P.M. McNeill, P.L. Carlson, J.C. Kermode, B. Adelman, R. Conroy, D. Marques, Heparin inhibition of von Willebrand factor-dependent platelet function in vitro and in vivo. J Clin Invest 87(5) (1991) 1787-1793.
[45] I. Elalamy, M.H. Horellou, M. Samama, Caractéristiques Pharmacologiques des héparines. Sem Hôp Paris 71(13-14) (1995) 389-400.
[46] M.M. Samama, G.T. Gerotziafas, Comparative pharmacokinetics of LMWHs. Semin Thromb Hemost 26 Suppl 1 (2000) 31-38.
[47] B.I. Eriksson, K. Soderberg, L. Widlund, B. Wandeli, L. Tengborn, B. Risberg, A comparative study of three low-molecular weight heparins (LMWH) and unfractionated heparin (UH) in healthy volunteers. Thromb Haemost 73(3) (1995) 398-401.
[48] A.M. Frydman, L. Bara, Y. Le Roux, M. Woler, F. Chauliac, M.M. Samama, The antithrombotic activity and pharmacokinetics of enoxaparine, a low molecular weight heparin, in humans given single subcutaneous doses of 20 to 80 mg. J Clin Pharmacol 28(7) (1988) 609-618.
[49] F. Collignon, A. Frydman, H. Caplain, M.L. Ozoux, Y. Le Roux, J. Bouthier, J.J. Thebault, Comparison of the pharmacokinetic profiles of three low molecular mass heparins--dalteparin, enoxaparin and nadroparin--administered subcutaneously in healthy volunteers (doses for prevention of thromboembolism). Thromb Haemost 73(4) (1995) 630-640.
[50] M. Azizi, C. Veyssier-Belot, M. Alhenc-Gelas, G. Chatellier, E. Billaud-Mesguish, J.N. Fiessinger, M. Aiach, Comparison of biological activities of two low molecular weight heparins in 10 healthy volunteers. Br J Clin Pharmacol 40(6) (1995) 577-584.
[51] J.C. Stiekema, J.M. Van Griensven, T.G. Van Dinther, A.F. Cohen, A cross-over comparison of the anti-clotting effects of three low molecular weight heparins and glycosaminoglycuronan. Br J Clin Pharmacol 36(1) (1993) 51-56.
[52] P.C. Pedersen, P.B. Ostergaard, U. Hedner, D. Bergqvist, T. Matzsch, Pharmacokinetics of a low molecular weight heparin, logiparin, after intravenous and subcutaneous administration to healthy volunteers. Thromb Res 61(5-6) (1991) 477-487.
[53] F. Depasse, M.J. Gonzalez de Suso, I. Lagoutte, J. Fontcuberta, M. Borrell, M.M. Samama, Comparative study of the pharmacokinetic profiles of two LMWHs--bemiparin (3500 IU, anti-Xa) and tinzaparin (4500 IU, anti-Xa)--administered subcutaneously to healthy male volunteers. Thromb Res 109(2-3) (2003) 109-117.
[54] G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res 12(3) (1995) 413-420.
[55] C. Doutremepuich, F. Toulemonde, M.C. Kuttler, A. Masse, M.O. Maury, F. Bousquet, J.C. Lormeau, R. Quilichini, [Oral administration of heparin and low molecular weight heparin fractions in rabbits]. Therapie 39(2) (1984) 147-152.
[56] O. Horwitz, W.T. Johnson, J.J. Sayen, B. Roberts, A.F. Whereat, Heparin for oral use: preliminary studies. Trans Am Clin Climatol Assoc 104 (1993) 94-102; discussion 102-103.
[57] M. Dryjski, D.E. Schneider, P. Mojaverian, B.S. Kuo, T.D. Bjornsson, Investigations on plasma activity of low molecular weight heparin after intravenous and oral administrations. Br J Clin Pharmacol 28(2) (1989) 188-192.
[58] P. Bianchini, G.L. Bergonzini, B. Parma, B. Osima, Relationship between plasma antifactor Xa activity and the antithrombotic activity of heparins of different molecular mass. Haemostasis 25(6) (1995) 288-298.
[59] L.B. Jaques, L.M. Hiebert, S.M. Wice, Evidence from endothelium of gastric absorption of heparin and of dextran sulfates 8000. J Lab Clin Med 117(2) (1991) 122-130.
[60] L.M. Hiebert, S.M. Wice, N.M. McDuffie, L.B. Jaques, The heparin target organ--the endothelium. Studies in a rat model. Q J Med 86(5) (1993) 341-348.
[61] L.M. Hiebert, S.M. Wice, L.B. Jaques, Antithrombotic activity of oral unfractionated heparin. J Cardiovasc Pharmacol 28(1) (1996) 26-29.

[62] L.M. Hiebert, S.M. Wice, T. Ping, Tissue distribution of the low molecular weight heparin, tinzaparin, following administration to rats by the oral route. Biomed Pharmacother 58(6-7) (2004) 372-380.
[63] L.M. Hiebert, T. Ping, S.M. Wice, Enhanced antithrombotic effects of unfractionated heparin in rats after repeated oral doses and its relationship to endothelial heparin concentration. Br J Pharmacol 153(6) (2008) 1177-1184.
[64] L.M. Hiebert, S.M. Wice, T. Ping, D. Herr, V. Laux, Antithrombotic efficacy in a rat model of the low molecular weight heparin, reviparin sodium, administered by the oral route. Thromb Haemost 85(1) (2001) 114-118.
[65] L.M. Hiebert, T. Ping, S.M. Wice, Antithrombotic activity of orally administered low molecular weight heparin (Logiparin) in a rat model. Haemostasis 30(4) (2000) 196-203.
[66] B. Moazed, L.M. Hiebert, Movement of heparins across rat gastric mucosa is dependent on molecular weight and pH. Pharm Res 26(1) (2009) 189-195.
[67] L.M. Hiebert, S.M. Wice, T. Abdelhameed, Evidence for the absorption of heparin by rat stomach. Biomed Pharmacother 61(1) (2007) 68-74.
[68] L.M. Hiebert, S.M. Wice, T. Ping, Increased plasma anti-Xa activity and recovery of heparin from urine suggest absorption of orally administered unfractionated heparin in human subjects. J Lab Clin Med 145(3) (2005) 151-155.
[69] C.S. Tidball, R.I. Lipman, Enhancement of jejunal absorption of heparinoid by sodium ethylenediaminetetraacetate in the dog. Proc Soc Exp Biol Med 111 (1962) 713-715.
[70] T.Y. Koh, K.R. Bharucha, Intestinal absorption of stable heparinic acid complexes. J Lab Clin Med 80(1) (1972) 47-55.
[71] R.H. Engel, S.J. Riggi, Intestinal absorption of heparin facilitated by sulfated or sulfonated surfactants. J Pharm Sci 58(6) (1969) 706-709.
[72] K. Whitehead, S. Mitragotri, Mechanistic analysis of chemical permeation enhancers for oral drug delivery. Pharm Res 25(6) (2008) 1412-1419.
[73] Monographie 01/2002:1184, Macrogolglycérides caprylocapriques. Pharmacopée Européenne, 2002, pp. 1628-1629.
[74] Y.V. Rama Prasad, T. Minamimoto, Y. Yoshikawa, N. Shibata, S. Mori, A. Matsuura, K. Takada, In situ intestinal absorption studies on low molecular weight heparin in rats using labrasol as absorption enhancer. Int J Pharm 271(1-2) (2004) 225-232.
[75] Y. Ito, T. Kusawake, Y.V. Prasad, N. Sugioka, N. Shibata, K. Takada, Preparation and evaluation of oral solid heparin using emulsifier and adsorbent for in vitro and in vivo studies. Int J Pharm 317(2) (2006) 114-119.
[76] X. Sha, G. Yan, Y. Wu, J. Li, X. Fang, Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junctions in Caco-2 cells. Eur J Pharm Sci 24(5) (2005) 477-486.
[77] N.A. Motlekar, K.S. Srivenugopal, M.S. Wachtel, B.B. Youan, Oral delivery of low-molecular-weight heparin using sodium caprate as absorption enhancer reaches therapeutic levels. J Drug Target 13(10) (2005) 573-583.
[78] A. Leone-Bay, K.K. Ho, R. Agarwal, R.A. Baughman, K. Chaudhary, F. DeMorin, L. Genoble, C. McInnes, C. Lercara, S. Milstein, D. O'Toole, D. Sarubbi, B. Variano, D.R. Paton, 4-[4-[(2-Hydroxybenzoyl)amino]phenyl]butyric acid as a novel oral delivery agent for recombinant human growth hormone. J Med Chem 39(13) (1996) 2571-2578.
[79] A. Leone-Bay, H. Leipold, R. Agarwal, T.M. Rivera, R.A. Baughman, The evolution of an oral heparin dosing solution. Drugs Future 22(8) (1997) 885-891.
[80] K. Salartash, M.D. Gonze, A. Leone-Bay, R. Baughman, W.C. Sternbergh, 3rd, S.R. Money, Oral low-molecular weight heparin and delivery agent prevents jugular venous thrombosis in the rat. J Vasc Surg 30(3) (1999) 526-531.

[81] M.D. Gonze, J.D. Manord, A. Leone-Bay, R.A. Baughman, C.L. Garrard, W.C. Sternbergh, 3rd, S.R. Money, Orally administered heparin for preventing deep venous thrombosis. Am J Surg 176(2) (1998) 176-178.
[82] A. Leone-Bay, D.R. Paton, B. Variano, H. Leipold, T. Rivera, J. Miura-Fraboni, R.A. Baughman, N. Santiago, Acylated non-alpha-amino acids as novel agents for the oral delivery of heparin sodium, USP. J Control Release 50(1-3) (1998) 41-49.
[83] T.M. Rivera, A. Leone-Bay, D.R. Paton, H.R. Leipold, R.A. Baughman, Oral delivery of heparin in combination with sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate: pharmacological considerations. Pharm Res 14(12) (1997) 1830-1834.
[84] D. Brayden, E. Creed, A. O'Connell, H. Leipold, R. Agarwal, A. Leone-Bay, Heparin absorption across the intestine: effects of sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate in rat in situ intestinal instillations and in Caco-2 monolayers. Pharm Res 14(12) (1997) 1772-1779.
[85] R.A. Baughman, S.C. Kapoor, R.K. Agarwal, J. Kisicki, F. Catella-Lawson, G.A. FitzGerald, Oral delivery of anticoagulant doses of heparin. A randomized, double-blind, controlled study in humans. Circulation 98(16) (1998) 1610-1615.
[86] E. Arbit, M. Goldberg, I. Gomez-Orellana, S. Majuru, Oral heparin: status review. Thromb J 4 (2006) 6.
[87] G.F. Pineo, R.D. Hull, V.J. Marder, in: A. A. Sasahara and J. Loscalzo (Eds.), New therapeutic agents in thrombosis and thrombolysis, Informa Health Care, 2002, pp. 273-279.
[88] S.A. Mousa, F. Zhang, A. Aljada, S. Chaturvedi, M. Takieddin, H. Zhang, L. Chi, M.C. Castelli, K. Friedman, M.M. Goldberg, R.J. Linhardt, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral heparin solid dosage form in healthy human subjects. J Clin Pharmacol 47(12) (2007) 1508-1520.
[89] K. Salartash, M. Lepore, M.D. Gonze, A. Leone-Bay, R. Baughman, W.C. Sternbergh, 3rd, J.C. Bowen, S.R. Money, Treatment of experimentally induced caval thrombosis with oral low molecular weight heparin and delivery agent in a porcine model of deep venous thrombosis. Ann Surg 231(6) (2000) 789-794.
[90] A. Leone-Bay, C. O'Shaughnessy, R. Agarwal, T. Rivera-Schaub, C. Rosado-Gray, L. Gerspach, R.A. Baughman, Oral Low Molecular Weight Heparin Absorption. Pharmaceutical Technology (2002) 38-46.
[91] V. Grabovac, T. Schmitz, F. Foger, A. Bernkop-Schnurch, Papain: an effective permeation enhancer for orally administered low molecular weight heparin. Pharm Res 24(5) (2007) 1001-1006.
[92] V. Grabovac, A. Bernkop-Schnurch, Improvement of the intestinal membrane permeability of low molecular weight heparin by complexation with stem bromelain. Int J Pharm 326(1-2) (2006) 153-159.
[93] M. Thanou, J.C. Verhoef, M.T. Nihot, J.H. Verheijden, H.E. Junginger, Enhancement of the intestinal absorption of low molecular weight heparin (LMWH) in rats and pigs using Carbopol 934P. Pharm Res 18(11) (2001) 1638-1641.
[94] N.G. Schipper, S. Olsson, J.A. Hoogstraate, A.G. deBoer, K.M. Varum, P. Artursson, Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. Pharm Res 14(7) (1997) 923-929.
[95] M. Thanou, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. Adv Drug Deliv Rev 52(2) (2001) 117-126.
[96] N.G. Schipper, K.M. Varum, P. Artursson, Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Pharm Res 13(11) (1996) 1686-1692.
[97] M. Thanou, M.T. Nihot, M. Jansen, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low

molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo. J Pharm Sci 90(1) (2001) 38-46.
[98] M. Thanou, S. Henderson, A. Kydonieus, C. Elson, N-sulfonato-N,O-carboxymethylchitosan: a novel polymeric absorption enhancer for the oral delivery of macromolecules. J Control Release 117(2) (2007) 171-178.
[99] A. Bernkop-Schnurch, C.E. Kast, D. Guggi, Permeation enhancing polymers in oral delivery of hydrophilic macromolecules: thiomer/GSH systems. J Control Release 93(2) (2003) 95-103.
[100] C.E. Kast, D. Guggi, N. Langoth, A. Bernkop-Schnurch, Development and in vivo evaluation of an oral delivery system for low molecular weight heparin based on thiolated polycarbophil. Pharm Res 20(6) (2003) 931-936.
[101] T. Schmitz, V.M. Leitner, A. Bernkop-Schnurch, Oral heparin delivery: design and in vivo evaluation of a stomach-targeted mucoadhesive delivery system. J Pharm Sci 94(5) (2005) 966-973.
[102] Y. Lee, J.H. Nam, H.C. Shin, Y. Byun, Conjugation of low-molecular-weight heparin and deoxycholic acid for the development of a new oral anticoagulant agent. Circulation 104(25) (2001) 3116-3120.
[103] Y. Lee, S.H. Kim, Y. Byun, Oral delivery of new heparin derivatives in rats. Pharm Res 17(10) (2000) 1259-1264.
[104] Y. Lee, H.T. Moon, Y. Byun, Preparation of slightly hydrophobic heparin derivatives which can be used for solvent casting in polymeric formulation. Thromb Res 92(4) (1998) 149-156.
[105] L.D. Kim SK, Lee E, Lee YK, Kim CY, Moon HT, Byun Y., Absorption study of deoxycholic acid-heparin conjugate as a new form of oral anti-coagulant. J Control Release 120(1-2) (2007) 4-10.
[106] S.K. Kim, E.H. Lee, B. Vaishali, S. Lee, Y.K. Lee, C.Y. Kim, H.T. Moon, Y. Byun, Tricaprylin microemulsion for oral delivery of low molecular weight heparin conjugates. J Control Release 105(1-2) (2005) 32-42.
[107] S.K. Kim, D.Y. Lee, C.Y. Kim, J.H. Nam, H.T. Moon, Y. Byun, A newly developed oral heparin derivative for deep vein thrombosis: non-human primate study. J Control Release 123(2) (2007) 155-163.
[108] S.K. Kim, B. Vaishali, E. Lee, S. Lee, Y.K. Lee, T.S. Kumar, H.T. Moon, Y. Byun, Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation. Thromb Res 117(4) (2006) 419-427.
[109] C.Y. Kim, J. Kim, K. Han, S. Kim, K. Park, Y. Byun, Toxicity screening after repeated dose of a newly developed oral heparin derivative in male cynomolgus monkeys. J Toxicol Sci 32(4) (2007) 411-420.
[110] D.Y. Lee, J. Lee, S. Lee, S.K. Kim, Y. Byun, Liphophilic complexation of heparin based on bile acid for oral delivery. J Control Release 123(1) (2007) 39-45.
[111] G. Zoppetti, I. Caramazza, Y. Murakami, T. Ohno, Structural requirements for duodenal permeability of heparin-diamine complexes. Biochim Biophys Acta 1156(1) (1992) 92-98.
[112] G. Andriuoli, M. Bossi, I. Caramazza, G. Zoppetti, Heparin by alternative routes of administration. Haemostasis 20 Suppl 1 (1990) 154-158.
[113] G. Andriuoli, I. Caramazza, G. Galimberti, G. Zoppetti, F. Benedini, A. Sala, P. Del Soldato, Intraduodenal absorption in the rabbit of a novel heparin salt. Haemostasis 22(3) (1992) 113-116.
[114] N.A. Motlekar, K.S. Srivenugopal, M.S. Wachtel, B.B. Youan, Modulation of gastrointestinal permeability of low-molecular-weight heparin by L-arginine: in-vivo and in-vitro evaluation. J Pharm Pharmacol 58(5) (2006) 591-598.
[115] D.A. Tomalia, The dendritic state Materialstoday 8(3) (2005) 34-46.
[116] P.Y. Hayes, B.P. Ross, B.G. Thomas, I. Toth, Polycationic lipophilic-core dendrons as penetration enhancers for the oral administration of low molecular weight heparin. Bioorg Med Chem 14(1) (2006) 143-152.

[117] N.A. Motlekar, A. Fasano, M.S. Wachtel, B.B. Youan, Zonula occludens toxin synthetic peptide derivative AT1002 enhances in vitro and in vivo intestinal absorption of low molecular weight heparin. J Drug Target 14(5) (2006) 321-329.
[118] A. Lamprecht, N. Ubrich, M. Hombreiro Perez, C. Lehr, M. Hoffman, P. Maincent, Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. Int J Pharm 184(1) (1999) 97-105.
[119] Y.Y. Jiao, N. Ubrich, V. Hoffart, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman, P. Maincent, Preparation and characterization of heparin-loaded polymeric microparticles. Drug Dev Ind Pharm 28(8) (2002) 1033-1041.
[120] Y. Jiao, N. Ubrich, V. Hoffart, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman, P. Maincent, Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. J Pharm Sci 91(3) (2002) 760-768.
[121] Y. Jiao, N. Ubrich, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman, T. Lecompte, P. Maincent, In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. Circulation 105(2) (2002) 230-235.
[122] V. Hoffart, A. Lamprecht, P. Maincent, T. Lecompte, C. Vigneron, N. Ubrich, Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. J Control Release 113(1) (2006) 38-42.
[123] A. Lamprecht, P. Koenig, N. Ubrich, P. Maincent, D. Neumann, Low molecular weight heparin nanoparticles: mucoadhesion and behaviour in Caco-2 cells. Nanotechnology 17 (2006) 3673-3680.
[124] J. Scala-Bertola, M. Rabiskova, T. Lecompte, F. Bonneaux, P. Maincent, Granules in the improvement of oral heparin bioavailability. Int J Pharm 374(1-2) (2009) 12-16.
[125] V. Hoffart, N. Ubrich, A. Lamprecht, K. Bachelier, C. Vigneron, T. Lecompte, M. Hoffman, P. Maincent, Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers. Drug Deliv 10(1) (2003) 1-7.
[126] Y.K. Lee, S.K. Kim, D.Y. Lee, S. Lee, C.Y. Kim, H.C. Shin, H.T. Moon, Y. Byun, Efficacy of orally active chemical conjugate of low molecular weight heparin and deoxycholic acid in rats, mice and monkeys. J Control Release 111(3) (2006) 290-298.
[127] A.L. Daugherty, R.J. Mrsny, Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier Part one. Pharm Sci Technolo Today 4(2) (1999) 144-151.
[128] D. Massey-Harroche, Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. Microsc Res Tech 49(4) (2000) 353-362.
[129] Y.R. Mahida, Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses. Best Pract Res Clin Gastroenterol 18(2) (2004) 241-253.
[130] M.E. Smith, D.G. Morton, in: C. Livingston (Ed.), The digestive system, 2001, pp. 111-127.
[131] T. Kucharzik, N. Lugering, K. Rautenberg, A. Lugering, M.A. Schmidt, R. Stoll, W. Domschke, Role of M cells in intestinal barrier function. Ann N Y Acad Sci 915 (2000) 171-183.
[132] E. Ramiro-Puig, F.J. Perez-Cano, C. Castellote, A. Franch, M. Castell, [The bowel: a key component of the immune system]. Rev Esp Enferm Dig 100(1) (2008) 29-34.
[133] S.K. Lai, Y.Y. Wang, D. Wirtz, J. Hanes, Micro- and macrorheology of mucus. Adv Drug Deliv Rev 61(2) (2009) 86-100.
[134] S.K. Lai, Y.Y. Wang, J. Hanes, Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. Adv Drug Deliv Rev 61(2) (2009) 158-171.
[135] K. Khanvilkar, M.D. Donovan, D.R. Flanagan, Drug transfer through mucus. Adv Drug Deliv Rev 48(2-3) (2001) 173-193.
[136] R.A. Cone, Barrier properties of mucus. Adv Drug Deliv Rev 61(2) (2009) 75-85.
[137] Y. Cu, W.M. Saltzman, Mathematical modeling of molecular diffusion through mucus. Adv Drug Deliv Rev 61(2) (2009) 101-114.

[138] C.M. Lehr, F.G.J. Poelma, H.E. Junginger, J.J. Tukker, An estimate of turnover time of intestinal mucus gel layer in the rat in situ loop. Int J Pharm 70(3) (1991) 235-240.
[139] L. Szentkuti, Light microscopical observations on luminally administered dyes, dextrans, nanospheres and microspheres in the pre-epithelial mucus gel layer of the rat distal colon. J Control Release 46 (1997) 233-242.
[140] H. Chiba, M. Osanai, M. Murata, T. Kojima, N. Sawada, Transmembrane proteins of tight junctions. Biochim Biophys Acta 1778(3) (2008) 588-600.
[141] L. Gonzalez-Mariscal, R. Tapia, D. Chamorro, Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. Biochim Biophys Acta 1778(3) (2008) 729-756.
[142] B.N. Giepmans, S.C. van Ijzendoorn, Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. Biochim Biophys Acta 1788(4) (2009) 820-831.
[143] L. Guillemot, S. Paschoud, P. Pulimeno, A. Foglia, S. Citi, The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. Biochim Biophys Acta 1778(3) (2008) 601-613.
[144] K. Ebnet, Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. Histochem Cell Biol 130(1) (2008) 1-20.
[145] D. Garrod, M. Chidgey, Desmosome structure, composition and function. Biochim Biophys Acta 1778(3) (2008) 572-587.
[146] J. Waschke, The desmosome and pemphigus. Histochem Cell Biol 130(1) (2008) 21-54.
[147] L.S. Kaminsky, Q.Y. Zhang, The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. Drug Metab Dispos 31(12) (2003) 1520-1525.
[148] V.J. Wacher, L. Salphati, L.Z. Benet, Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. Adv Drug Deliv Rev 46 (2001) 89-102.
[149] M. Takano, R. Yumoto, T. Murakami, Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. Pharmacol Ther 109(1-2) (2006) 137-161.
[150] L.M. Chan, S. Lowes, B.H. Hirst, The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. Eur J Pharm Sci 21(1) (2004) 25-51.
[151] A. Angelini, C. Di Febbo, G. Ciofani, M. Di Nisio, G. Baccante, C. Di Ilio, F. Cuccurullo, E. Porreca, Inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by unfractionated heparin: a new potential chemosensitizer for cancer therapy. Cancer Biol Ther 4(3) (2005) 313-317.
[152] D.T. O'Hagan, The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery. J Anat 189 (Pt 3) (1996) 477-482.
[153] G. Volkheimer, Passage of particles through the wall of the gastrointestinal tract. Environ Health Perspect 9 (1974) 215-225.
[154] M. Yuji, M. Tsubata, K. Chin, S. Onishi, T. Inamoto, W.M. Qi, K. Warita, T. Yokoyama, N. Hoshi, H. Kitagawa, Persorption of luminal antigenic molecule and its specific antibody via apoptotic epithelial cells of intestinal villi and Peyer's patches into peripheral blood in rats. J Vet Med Sci 68(12) (2006) 1297-1305.
[155] M. Yuji, M. Fujimoto, H. Miyata, T. Inamoto, W.M. Qi, K. Yamamoto, K. Warita, T. Yokoyama, N. Hoshi, H. Kitagawa, Persorption mechanisms of luminal antigenic particulates via apoptotic epithelial cells of intestinal villi into systemic blood circulation in orally immunized rats. J Vet Med Sci 69(4) (2007) 339-346.
[156] M. Doyle-McCullough, S.H. Smyth, S.M. Moyes, K.E. Carr, Factors influencing intestinal microparticle uptake in vivo. Int J Pharm 335(1-2) (2007) 79-89.
[157] M.P. Desai, V. Labhasetwar, G.L. Amidon, R.J. Levy, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. Pharm Res 13(12) (1996) 1838-1845.
[158] S.M. Moyes, S.H. Smyth, A. Shipman, S. Long, J.F. Morris, K.E. Carr, Parameters influencing intestinal epithelial permeability and microparticle uptake in vitro. Int J Pharm 337(1-2) (2007) 133-141.
[159] M. Gaumet, R. Gurny, F. Delie, Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: the influence of particle size. Eur J Pharm Sci 36(4-5) (2009) 465-473.

[160] S. McClean, E. Prosser, E. Meehan, D. O'Malley, N. Clarke, Z. Ramtoola, D. Brayden, Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. Eur J Pharm Sci 6(2) (1998) 153-163.
[161] S.H. Smyth, S. Feldhaus, U. Schumacher, K.E. Carr, Uptake of inert microparticles in normal and immune deficient mice. Int J Pharm 346(1-2) (2008) 109-118.
[162] M.P. Desai, V. Labhasetwar, E. Walter, R.J. Levy, G.L. Amidon, The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. Pharm Res 14(11) (1997) 1568-1573.
[163] P. Artursson, K. Palm, K. Luthman, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. Adv Drug Deliv Rev 46(1-3) (2001) 27-43.
[164] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Deliv Rev 46(1-3) (2001) 3-26.
[165] J. Blanchette, N. Kavimandan, N.A. Peppas, Principles of transmucosal delivery of therapeutic agents. Biomed Pharmacother 58(3) (2004) 142-151.
[166] M. Morishita, N.A. Peppas, Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? Drug Discov Today 11(19-20) (2006) 905-910.
[167] H. Lv, G. Wang, X. Wu, L. Xie, C. Huang, H. Li, Y. Liang, H. Hao, J. Sun, Transport characteristics of ginkgolide B by Caco-2 cells and examination of ginkgolide B oral absorption potential using rat in situ intestinal loop method. Int J Pharm 351(1-2) (2008) 31-35.
[168] M. Takano, Y. Koyama, H. Nishikawa, T. Murakami, R. Yumoto, Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine. Eur J Pharmacol 502(1-2) (2004) 149-155.
[169] I. Tamai, A. Saheki, R. Saitoh, Y. Sai, I. Yamada, A. Tsuji, Nonlinear intestinal absorption of 5-hydroxytryptamine receptor antagonist caused by absorptive and secretory transporters. J Pharmacol Exp Ther 283(1) (1997) 108-115.
[170] P.V. Balimane, S. Chong, R.A. Morrison, Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. J Pharmacol Toxicol Methods 44(1) (2000) 301-312.
[171] F. Meriani, N. Coceani, C. Sirotti, D. Voinovich, M. Grassi, In vitro nimesulide absorption from different formulations. J Pharm Sci 93(3) (2004) 540-552.
[172] H. Li, D.N. Sheppard, M.J. Hug, Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. J Cyst Fibros 3 Suppl 2 (2004) 123-126.
[173] M.E. Taub, L. Kristensen, S. Frokjaer, Optimized conditions for MDCK permeability and turbidimetric solubility studies using compounds representative of BCS classes I-IV. Eur J Pharm Sci 15(4) (2002) 331-340.
[174] J.D. Irvine, L. Takahashi, K. Lockhart, J. Cheong, J.W. Tolan, H.E. Selick, J.R. Grove, MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. J Pharm Sci 88(1) (1999) 28-33.
[175] A. Ungell, Caco-2 replace or refine? Drug Discov Today 1(4) (2004) 423-430.
[176] P. Matsson, C.A. Bergstrom, N. Nagahara, S. Tavelin, U. Norinder, P. Artursson, Exploring the role of different drug transport routes in permeability screening. J Med Chem 48(2) (2005) 604-613.
[177] P.V. Balimane, S. Chong, Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. Drug Discov Today 10(5) (2005) 335-343.
[178] S. Tavelin, J. Taipalensuu, L. Soderberg, R. Morrison, S. Chong, P. Artursson, Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers. Pharm Res 20(3) (2003) 397-405.
[179] P. Shah, V. Jogani, T. Bagchi, A. Misra, Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. Biotechnol Prog 22(1) (2006) 186-198.

[180] Y. Sambuy, I. De Angelis, G. Ranaldi, M.L. Scarino, A. Stammati, F. Zucco, The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biol Toxicol 21(1) (2005) 1-26.
[181] G. Cornaire, J.E. Woodley, G. Houin, Influence des transporteurs d'efflux sur le passage intestinal des médicaments. Revue Française des Laboratoires 339 (2002) 33-37.
[182] S. Yamashita, T. Furubayashi, M. Kataoka, T. Sakane, H. Sezaki, H. Tokuda, Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. Eur J Pharm Sci 10(3) (2000) 195-204.
[183] I. Behrens, T. Kissel, Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? Eur J Pharm Sci 19(5) (2003) 433-442.
[184] B. Press, D. Di Grandi, Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. Curr Drug Metab 9(9) (2008) 893-900.
[185] J.D. Soderholm, L. Hedman, P. Artursson, L. Franzen, J. Larsson, N. Pantzar, J. Permert, G. Olaison, Integrity and metabolism of human ileal mucosa in vitro in the Ussing chamber. Acta Physiol Scand 162(1) (1998) 47-56.
[186] H. Lennernas, K. Palm, U. Fagerholm, P. Artursson, Comparison between active and passive drug transport in human intestinal (Caco-2) cells in vitro and human jejunem in vivo. Int J Pharm 127 (1996) 103-107.
[187] D. Sun, H. Lennernas, L.S. Welage, J.L. Barnett, C.P. Landowski, D. Foster, D. Fleisher, K.D. Lee, G.L. Amidon, Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs. Pharm Res 19(10) (2002) 1400-1416.
[188] J. Gao, E.D. Hugger, M.S. Beck-Westermeyer, R.T. Borchardt, in: S. J. Enna, M. Williams, J. W. Ferkany, T. Kenakin and R. E. Porsolt (Eds.), Curr Protoc Pharmacol, Vol. Suppl. 8, Wiley–VCH, New York, 1998, pp. 7.2.1–7.2.23.
[189] S. Yee, In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. Pharm Res 14(6) (1997) 763-766.
[190] D.A. Volpe, Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. J Pharm Sci 97(2) (2008) 712-725.
[191] M. Markowska, R. Oberle, S. Juzwin, C.P. Hsu, M. Gryszkiewicz, A.J. Streeter, Optimizing Caco-2 cell monolayers to increase throughput in drug intestinal absorption analysis. J Pharmacol Toxicol Methods 46(1) (2001) 51-55.
[192] C. Bailey, B. P., W. Malick, The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. Adv Drug Deliv Rev 22(85-103) (1996).
[193] P. Shah, V. Jogani, P. Mishra, A.K. Mishra, T. Bagchi, A. Misra, Modulation of ganciclovir intestinal absorption in presence of absorption enhancers. J Pharm Sci 96(10) (2007) 2710-2722.
[194] D.S. Cox, S. Raje, H. Gao, N.N. Salama, N.D. Eddington, Enhanced permeability of molecular weight markers and poorly bioavailable compounds across Caco-2 cell monolayers using the absorption enhancer, zonula occludens toxin. Pharm Res 19(11) (2002) 1680-1688.
[195] R.M. Catalioto, A. Triolo, S. Giuliani, M. Altamura, S. Evangelista, C.A. Maggi, Increased paracellular absorption by bile salts and P-glycoprotein stimulated efflux of otilonium bromide in Caco-2 cells monolayers as a model of intestinal barrier. J Pharm Sci 97(9) (2008) 4087-4100.
[196] M. Koljonen, K.S. Hakala, T. Ahtola-Satila, L. Laitinen, R. Kostiainen, T. Kotiaho, A.M. Kaukonen, J. Hirvonen, Evaluation of cocktail approach to standardise Caco-2 permeability experiments. Eur J Pharm Biopharm 64(3) (2006) 379-387.
[197] P.F. Augustijns, S.C. Brown, D.H. Willard, T.G. Consler, P.P. Annaert, R.W. Hendren, T.P. Bradshaw, Hydration changes implicated in the remarkable temperature-dependent membrane permeation of cyclosporin A. Biochemistry 39(25) (2000) 7621-7630.
[198] C. Menez, M. Buyse, C. Dugave, R. Farinotti, G. Barratt, Intestinal absorption of miltefosine: contribution of passive paracellular transport. Pharm Res 24(3) (2007) 546-554.

[199] B.S. Anand, J. Patel, A.K. Mitra, Interactions of the dipeptide ester prodrugs of acyclovir with the intestinal oligopeptide transporter: competitive inhibition of glycylsarcosine transport in human intestinal cell line-Caco-2. J Pharmacol Exp Ther 304(2) (2003) 781-791.
[200] H.L. Chua, S. Jois, M.K. Sim, M.L. Go, Transport of angiotensin peptides across the Caco-2 monolayer. Peptides 25(8) (2004) 1327-1338.
[201] B. Zodl, D. Schmid, G. Wassler, C. Gundacker, V. Leibetseder, T. Thalhammer, C. Ekmekcioglu, Intestinal transport and metabolism of acrylamide. Toxicology 232(1-2) (2007) 99-108.
[202] V. Kansara, D. Paturi, S. Luo, R. Gaudana, A.K. Mitra, Folic acid transport via high affinity carrier-mediated system in human retinoblastoma cells. Int J Pharm 355(1-2) (2008) 210-219.
[203] K. Lee, D.R. Thakker, Saturable transport of H2-antagonists ranitidine and famotidine across Caco-2 cell monolayers. J Pharm Sci 88(7) (1999) 680-687.
[204] P. Goncalves, J.R. Araujo, M.J. Pinho, F. Martel, Modulation of butyrate transport in Caco-2 cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 379(4) (2009) 325-336.
[205] G.T. Knipp, N.F. Ho, C.L. Barsuhn, R.T. Borchardt, Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. J Pharm Sci 86(10) (1997) 1105-1110.
[206] J. Karlsson, P. Artursson, A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. Int J Pharm 71(1-2) (1991) 55-64.
[207] F.M. Ingels, P.F. Augustijns, Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2. J Pharm Sci 92(8) (2003) 1545-1558.
[208] S. Neuhoff, A.L. Ungell, I. Zamora, P. Artursson, pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. Pharm Res 20(8) (2003) 1141-1148.
[209] N.A. Motlekar, K.S. Srivenugopal, M.S. Wachtel, B.B. Youan, Evaluation of the Oral Bioavailability of Low Molecular Weight Heparin Formulated With Glycyrrhetinic Acid as Permeation Enhancer. Drug Dev Res 67(2) (2006) 166-174.
[210] D. Malkov, H.Z. Wang, S. Dinh, I. Gomez-Orellana, Pathway of oral absorption of heparin with sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino] caprylate. Pharm Res 19(8) (2002) 1180-1184.
[211] L. Bode, C. Salvestrini, P.W. Park, J.P. Li, J.D. Esko, Y. Yamaguchi, S. Murch, H.H. Freeze, Heparan sulfate and syndecan-1 are essential in maintaining murine and human intestinal epithelial barrier function. J Clin Invest 118(1) (2008) 229-238.
[212] G.T. Gerotziafas, A.D. Petropoulou, E. Verdy, M.M. Samama, I. Elalamy, Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. J Thromb Haemost 5(5) (2007) 955-962.
[213] S. Freitas, H.P. Merkle, B. Gander, Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. J Control Release 102(2) (2005) 313-332.
[214] Chernyshera Y.V., Babak V.G., Kildeeva N.R., Boury F., Benoit J.P., Ubrich N., Maincent P., Effect of the type of hydrophobic polymers on the size of nanoparticles obtained by emulsification-solvent evaporation. Mendeleev Communications 2 (2003) 65-68.
[215] D.A. Ashiru, R. Patel, A.W. Basit, Polyethylene glycol 400 enhances the bioavailability of a BCS class III drug (ranitidine) in male subjects but not females. Pharm Res 25(10) (2008) 2327-2333.
[216] K.A. Howard, X.W. Li, S. Somavarapu, J. Singh, N. Green, K.N. Atuah, Y. Ozsoy, L.W. Seymour, H.O. Alpar, Formulation of a microparticle carrier for oral polyplex-based DNA vaccines. Biochim Biophys Acta 1674(2) (2004) 149-157.

[217] N.A. Peppas, Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery. Int J Pharm 277(1-2) (2004) 11-17.
[218] J.M. Pean, F. Boury, M.C. Venier-Julienne, P. Menei, J.E. Proust, J.P. Benoit, Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres? Pharm Res 16(8) (1999) 1294-1299.
[219] X. Luan, R. Bodmeier, In situ forming microparticle system for controlled delivery of leuprolide acetate: influence of the formulation and processing parameters. Eur J Pharm Sci 27(2-3) (2006) 143-149.
[220] W. Friess, M. Schlapp, Release mechanisms from gentamicin loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles. J Pharm Sci 91(3) (2002) 845-855.
[221] A. Jaklenec, A. Hinckfuss, B. Bilgen, D.M. Ciombor, R. Aaron, E. Mathiowitz, Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-beta 1 from PLGA microsphere-based scaffolds. Biomaterials 29(10) (2008) 1518-1525.
[222] S. Chhabra, V. Sachdeva, S. Singh, Influence of end groups on in vitro release and biological activity of lysozyme from a phase-sensitive smart polymer-based in situ gel forming controlled release drug delivery system. Int J Pharm 342(1-2) (2007) 72-77.
[223] G.R. Hetzel, C. Sucker, The heparins: all a nephrologist should know. Nephrol Dial Transplant 20(10) (2005) 2036-2042.
[224] D. Carrie, C. Caranobe, B. Boneu, A comparison of the antithrombotic effects of heparin and a low molecular weight heparins with increasing antifactor Xa/antifactor IIa ratio in the rabbit. Br J Haematol 83 (1993) 622-626.
[225] M.A. Deli, Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. Biochim Biophys Acta 1788(4) (2009) 892-910.
[226] J.D. Schulze, W.A. Waddington, P.J. Eli, G.E. Parsons, M.D. Coffin, A.W. Basit, Concentration-dependent effects of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit and drug absorption. Pharm Res 20(12) (2003) 1984-1988.
[227] B.M. Johnson, W.N. Charman, C.J. Porter, An in vitro examination of the impact of polyethylene glycol 400, Pluronic P85, and vitamin E d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine. AAPS PharmSci 4(4) (2002) E40.
[228] Q. Shen, Y. Lin, T. Handa, M. Doi, M. Sugie, K. Wakayama, N. Okada, T. Fujita, A. Yamamoto, Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by in vitro transport and in situ absorption studies. Int J Pharm 313(1-2) (2006) 49-56.
[229] T.Y. Ma, D. Hollander, R. Riga, D. Bhalla, Autoradiographic determination of permeation pathway of permeability probes across intestinal and tracheal epithelia. J Lab Clin Med 122(5) (1993) 590-600.
[230] M.A. Tracy, K.L. Ward, L. Firouzabadian, Y. Wang, N. Dong, R. Qian, Y. Zhang, Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. Biomaterials 20(11) (1999) 1057-1062.
[231] V. Aspinall, M. Cappello, Introduction to veterinary anatomy and physiology, Elsevier Saunders, 2009.
[232] C. Damge, P. Maincent, N. Ubrich, Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. J Control Release 117(2) (2007) 163-170.
[233] A.E. Clausen, A. Bernkop-Schnurch, In vitro evaluation of the permeation-enhancing effect of thiolated polycarbophil. J Pharm Sci 89(10) (2000) 1253-1261.
[234] E.S. Trindade, C. Oliver, M.C. Jamur, H.A. Rocha, C.R. Franco, R.I. Boucas, T.R. Jarrouge, M.A. Pinhal, I.L. Tersariol, T.C. Gouvea, C.P. Dietrich, H.B. Nader, The binding of heparin to the extracellular matrix of endothelial cells up-regulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate proteoglycan. J Cell Physiol 217(2) (2008) 328-337.

[235] Z. Cerovic, G. Samson, F. Morales, N. Tremblay, I. Moya, Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. Agronomie 19 (1999) 543-578.
[236] D.C. De Veld, M.J. Witjes, H.J. Sterenborg, J.L. Roodenburg, The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. Oral Oncol 41(2) (2005) 117-131.
[237] M.A. Arangoa, G. Ponchel, A.M. Orecchioni, M.J. Renedo, D. Duchene, J.M. Irache, Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems. Eur J Pharm Sci 11(4) (2000) 333-341.
[238] M. Agueros, P. Areses, M.A. Campanero, H. Salman, G. Quincoces, I. Penuelas, J.M. Irache, Bioadhesive properties and biodistribution of cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles. Eur J Pharm Sci 37(3-4) (2009) 231-240.
[239] F. Plenat, K. Montagne, N. Weinbreck, S. Corby, J. Champigneulle, L. Antunes, C. Bonnet, C. Maire, N. Monhoven, Molecular consequences of fixation and tissue processing: the examples of nucleic acids and proteins. Ann Pathol 26(1) (2006) 8-21.
[240] K. Wooda, G. Stone, N. Peppas, The effect of complexation hydrogels on insulin transport in intestinal epithelial cell models. Acta Biomater Article in Press (2009).
[241] R.C. Beck, A.R. Pohlmann, C. Hoffmeister, M.R. Gallas, E. Collnot, U.F. Schaefer, S.S. Guterres, C.M. Lehr, Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between in vitro drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. Eur J Pharm Biopharm 67(1) (2007) 18-30.
[242] Z. Degim, N. Unal, D. Essiz, U. Abbasoglu, Caco-2 cell culture as a model for famotidine absorption. Drug Deliv 12(1) (2005) 27-33.
[243] Z. Lu, J.H. Steenekamp, J.H. Hamman, Cross-linked cationic polymer microparticles: effect of N-trimethyl chitosan chloride on the release and permeation of ibuprofen. Drug Dev Ind Pharm 31(3) (2005) 311-317.
[244] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65(1-2) (1983) 55-63.
[245] H. Ichikawa, N.A. Peppas, Novel complexation hydrogels for oral peptide delivery: in vitro evaluation of their cytocompatibility and insulin-transport enhancing effects using Caco-2 cell monolayers. J Biomed Mater Res A 67(2) (2003) 609-617.
[246] N. Kong, T. Jiang, Z. Zhou, J. Fu, Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. Dent Mater (2009).
[247] T.F. Palmberger, K. Albrecht, B. Loretz, A. Bernkop-Schnurch, Thiolated polymers: evaluation of the influence of the amount of covalently attached L-cysteine to poly(acrylic acid). Eur J Pharm Biopharm 66(3) (2007) 405-412.
[248] V.E. McGilligan, J.M. Wallace, P.M. Heavey, D.L. Ridley, I.R. Rowland, The effect of nicotine in vitro on the integrity of tight junctions in Caco-2 cell monolayers. Food Chem Toxicol 45(9) (2007) 1593-1598.
[249] K. Berginc, S. Zakelj, L. Levstik, D. Ursic, A. Kristl, Fluorescein transport properties across artificial lipid membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. Eur J Pharm Biopharm 66(2) (2007) 281-285.
[250] E.S. Trindade, R.I. Boucas, H.A. Rocha, J.A. Dominato, E.J. Paredes-Gamero, C.R. Franco, C. Oliver, M.C. Jamur, C.P. Dietrich, H.B. Nader, Internalization and degradation of heparin is not required for stimulus of heparan sulfate proteoglycan synthesis. J Cell Physiol 217(2) (2008) 360-366.
[251] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. Adv Biochem Eng Biotechnol 102 (2006) 47-90.
[252] A. Shenderova, T.G. Burke, S.P. Schwendeman, The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins. Pharm Res 16(2) (1999) 241-248.
[253] K.A. Jandik, D. Kruep, M. Cartier, R.J. Linhardt, Accelerated stability studies of heparin. J Pharm Sci 85(1) (1996) 45-51.

[254] A. Gopferich, Mechanisms of polymer degradation and erosion. Biomaterials 17(2) (1996) 103-114.
[255] H. Nyqvist, Saturated salt solutions for maintaining specified relative humidities. Int J. Pharm 4(2) (1983) 47-48.
[256] M. Vert, Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything. Biomacromolecules 6(2) (2005) 538-546.
[257] H.U. Petereit, W. Weisbrod, Formulation and process considerations affecting the stability of solid dosage forms formulated with methacrylate copolymers. Eur J Pharm Biopharm 47(1) (1999) 15-25.

Author's personal copy

Journal of Controlled Release 139 (2009) 8–14

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Controlled Release

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jconrel

Encapsulation of low molecular weight heparins: Influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio

L. Javot [a], T. Lecompte [b], M. Rabiskova [c], P. Maincent [a,*]

[a] Nancy-Université, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Pharmaceutical Technology, 5, rue A. Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France
[b] CHU de Nancy, Nancy-Université, INSERM U 961, Fédération de Recherche "Bioingénierie moléculaire, cellulaire et thérapeutique", Nancy, France
[c] Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palacke'ho 1–3, Brno 612 42, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 February 2009
Accepted 21 May 2009
Available online 24 May 2009

Keywords:
LMWH
Microparticles
Anti-Xa/anti-IIa ratio

ABSTRACT

Tinzaparin and nadroparin, two low molecular weight heparins (LMWH), were encapsulated within microparticles by the double emulsion method using ammonium methacrylate copolymer (Eudragit® RS) alone or mixed with poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) at different ratios.

The resulting microparticles were characterized *in vitro* according to particle size, encapsulation rate and release profiles both by chemical and biological methods. The biological method was based on the measurement of the anti-Xa/anti-IIa ratio typical of each LMWH. This ratio also reflects the relative proportion between active chains below and above the critical chain length of 5000 Da (i.e. BCL and ACL chains), since LMWH are mixtures of chains with various lengths and activities.

For both LMWH, high entrapment efficiencies, expressed as anti-Xa and anti-IIa activities, were obtained and amounted to anti-Xa/anti-IIa ratios close to the commercial ratio. During the *in vitro* release, whatever the formulation, more BCL chains were released than ACL chains: a higher (compared to commercial ratio) and stable anti-Xa/anti-IIa ratio was observed. This increase of the anti-Xa/anti-IIa ratio was influenced by the type of LMWH used and the composition of the Eudragit® RS formulation. This type of microparticles could constitute a new pharmaceutical form of LMWH with a higher anti-Xa/anti-IIa ratio than commercial forms.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Low molecular weight heparins (LMWH) are the gold standard for anticoagulants used in the prevention and treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism [1]. For many years, LMWH have overtaken unfractionated heparin (UFH) in many countries due to the simplicity of using them and their lower overall cost [2]. Indeed, the pharmacodynamic effect of LMWH is easier to predict, they have excellent bioavailability after s.c. administration and carry a lower risk of heparin-induced thrombocytopenia [3–5]. Unfortunately, they have to be administered parenterally, which is a disadvantage especially during long-term outpatient therapy (pregnancy, cancer). Oral dosage forms would be a major improvement, since this is most convenient and physiological route. Despite the strong negative charge and high molecular weight of LMWH which are obstacles to their oral absorption, researchers have tried for many years to develop oral formulations of these macromolecules.

An interesting option was the use of absorption enhancers like sodium N-[8(-2-hydroxybenzoyl)amino]decanoate (SNAD), designed specifically to facilitate the intestinal absorption of LMWH, and sodium N-[8(-2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate (SNAC) designed for UFH. Indeed the bioavailability of an oral administration of UFH combined with SNAC in healthy human subjects was 2.19% [6].

Other permeation enhancers were also tested *in vivo* on animal models by oral route using liquid or solid dosage forms. The most recent used properties of thiolated polycarbophil [7] surfactant agent as Labrasol® [8], derivates of chitosan [9], mucolytic agent as papain [10] and polycationic liphophilic-core dendrons [11].

After tablets administration in rats, the best results in terms of relative anti-Xa bioavailability were 19.9% and 9.1% for thiolated polymers [12] and papain [10] at the dose of 279 anti-Xa units/animal and 210 anti-Xa units/animal, respectively. Absolute bioavailability of 18.8% was also obtained using Labrasol® [8] in so-called "oral solid heparin" after direct administration of 200 anti-Xa U/kg in the jejunum of rats. After such direct injection in intestine of rats with a solution containing polyanionic derivate of chitosan and 5000 anti-Xa U/kg of LMWH, sustained LMWH levels till 360 min (between 0.2 and 0.4 anti-Xa U/mL) were obtained [9]. On the other hand, co-administration by gavage of polycationic lipophilic-core dendrons and LMWH at the dose of 7500 IU/kg led to anti-Xa activity over 0.2 IU/mL during only 20 min [11].

Another strategy, based on the synthesis of new heparin derivatives by coupling LMWH with deoxycholic acid (DOCA) was also tested. After oral administration of LMWH-DOCA in dimethyl sulfoxide to mice, the bioavailability was 17.6% [13].

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 22 97; fax: +33 3 83 68 23 01.
E-mail address: philippe.maincent@pharma.uhp-nancy.fr (P. Maincent).

0168-3659/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jconrel.2009.05.029

Author's personal copy

We have developed multiparticulate forms based on a mixture of a biodegradable polymer and a non biodegradable polycationic polymer. We have obtained mean absolute bioavailabilities of 59% and 48% with nanoparticles of LMWH [14] and microparticles of UFH [15], respectively. One of the main advantages of the multiparticular system is that the administered doses are lower than those of the other systems and the corresponding bioavailabilities are higher.

Our previous results with LMWH are very promising but were solely based on the activated partial thromboplastin time (aPTT) or the anti-Xa bioavailability. Results of the other research teams were also quantified with the same assays. As a clotting assay, aPTT is known to depend on the anti-IIa activity and is not very sensitive to anti-Xa activity. Since LMWH have predominantly anti-Xa activity, the anti-Xa assay is widely used to measure LMWH activity in plasma. However, it has been shown that LMWH tested *in vitro* at doses defined by anti-Xa activity showed variable inhibitory effects on thrombin generation, mainly due to their different anti-IIa activity [4,16]. So, it is obvious that the anti-Xa activity is not a sufficient criterion for the *in vitro* or *in vivo* activity of LMWH and that there is a clear need to measure both the anti-IIa and the anti-Xa activity for each sample. One simple way to express this is the anti-Xa/anti-IIa ratio, which is systematically used to define the biological activity of commercial heparins. This ratio clearly reflects the proper biochemical and pharmacodynamic properties of each LMWH arising from its specific composition [3].

Indeed, heparins are glycosaminoglycan macromolecules composed of a mixture of different chains lengths: their composition is very heterogeneous [17]. They act by binding to antithrombin, a natural inhibitor of the coagulation cascade. The capacity of heparin to bind and catalyze the antithrombin (AT) action is selectively supported by a specific pentasaccharidic structure, present only in a third of the total population chains [18,19].

Heparin chains having the pentasaccharidic sequence are all able to inhibit factor Xa and all chains above the critical chain length of 5000 Da (ACL chains [17]) are also able to inhibit factor IIa [17,20–22].

It has to be noted that the value of this ratio is by convention 1 for each UFH. Indeed, UFH are made exclusively of ACL chains: consequently, each one has the capacity to catalyze the inhibition, mediated by antithrombin, of factor IIa and factor Xa as well. For the LMWH, the values of the anti-Xa/anti-IIa activity ratio are between 1.6 and 9.7 [20]. This means that the anti-Xa activity for the LMWH is 1.6 to 9.7 times more important that the anti-IIa activity. The increase of this ratio (compared to UFH ratio) is related to the presence of chains below the critical chain length of 5000 Da (BCL chains [17]) in LMWH which exclusively support an anti-Xa activity. Furthermore, it has to be noticed that the higher the anti-Xa/anti-IIa ratio, the higher the relative proportion of BCL chains compared to ACL chains.

In this experimental work, we have chosen to use two different LMWH: one with a low anti-Xa/anti-IIa ratio (1.8), i.e. tinzaparin, and the other one with a high anti-Xa/anti-IIa ratio (3.5), i.e. nadroparin. As a result of its smaller ratio, tinzaparin contains almost twice ACL chains providing anti-IIa activity than nadroparin. So, despite the quite similar mean molecular weights of these two LMWH, the chain length distribution is different [23,24]. When LMWH is incorporated into microparticles, it is possible that the BCL and ACL chains are not encapsulated and released in equal proportions due to their different physicochemical properties, such as size and overall charge, leading to a modified anti-Xa/anti-IIa ratio. In order to characterize our system accurately before embarking on *in vivo* pharmacokinetic studies, we evaluated the evolution of this ratio after both the final manufacturing step and during release *in vitro*: any increase or decrease in the anti-Xa/anti-IIa ratio is related to an increase or a decrease of relative proportion of BCL chains compared to ACL chains. A non biodegradable polycationic polymer (ammonium methacrylate copolymer) used alone or mixed with a biodegradable polymer (end-capped or uncapped PLGA) at different ratios was selected for the microparticle preparation in order to determine whether one of these ratios favors i) the encapsulation of the anti-Xa or anti-IIa activity of heparin; ii) the release of anti-Xa or anti-IIa activity.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Two commercially available LMWH were used: sodium tinzaparin (50 anti-IIa U/mg, 90 anti-Xa U/mg, anti-Xa/anti-IIa ratio 1.8) and calcium nadroparin (32.1 anti-IIa U/mg, 112.5 anti-Xa U/mg, anti-Xa/anti-IIa ratio 3.5) marketed by Leo Laboratory (Innohep®, Saint Quentin en Yvelines, France) and GlaxoSmithKline (Fraxodi®, Marly-le-Roi), respectively. Uncapped poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) 50/50 (Resomer® RG 504 H, MW 52,500 g mol^{-1}) and end-capped poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) 50/50 (Resomer® RS 504 S, MW 52,500 g mol^{-1}) were gifts from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Ammonium methacrylate copolymer (Eudragit® RS PO, MW 150,000 g mol^{-1}) was generously supplied by Evonik Röhm GmbH (Darmstadt, Germany). Polyvinylalcohol (PVA, MW 30,000 g mol^{-1}, 88% hydrolyzed) was provided by Sigma-Aldrich (Stenheim, Germany). The Stachrom® heparin kit used for the measurement of the anti-Xa activity was supplied by Diagnostica Stago (Asnière, France). The reagents for the measurement of the anti-IIa activity were provided by Instrumentation Laboratory (Lexington, USA) for 25 IU antithrombin and substrate S-2238 and by Hyphen BioMed (Neuville sur Oise, France) for 21 NIH bovine thrombin. All other chemical reagents were of analytical grade and used as supplied.

2.2. Methods

2.2.1. Polymeric microparticles preparation

The polymeric microparticles were prepared using a non biodegradable but positively charged polymethacrylate (Eudragit® RS or ERS) alone or mixed with a biodegradable polymer (poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) 50/50, either uncapped, i.e. PLGA 504 H, or end-capped, i.e. PLGA 504 S) at various ratios 75/25, 50/50, 25/75. The preparation of microparticles was carried out by the double emulsion (water-in-oil-in-water) and extraction method routinely used for manufacturing microparticles in our laboratory. Briefly, 1 mL of an aqueous LMWH solution (5000 anti-Xa U/mL) was first emulsified by sonication (15 s) in ethyl acetate (5 mL) containing the mixture of polymers (0.250 g). The resulting water-in-oil emulsion was poured into 400 mL of an aqueous solution of PVA (0.1%). A water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion was formed by extensive stirring with a three-bladed propeller for 1 h at room temperature until the organic solvent was extracted. Upon solvent extraction, the polymers precipitated and the microparticle cores solidified. Microparticles were then collected by filtration, washed extensively with deionized water and dried at room temperature. An aliquot of the external phase was collected in order to determine the entrapment efficiency by an indirect method. Drug-free microparticles were prepared in the same way.

2.2.2. Particle mean diameter

The mean diameter of microparticles was evaluated with a Malvern Mastersizer (Mastersizer X, Malvern Instrument, UK) using laser light diffraction. Microparticles were resuspended in Tween® 80 (1%, w/v) for 1 h in an ultrasonic bath. Each sample was measured in triplicate.

2.2.3. In vitro drug release

LMWH-loaded microparticles (50 mg) were suspended in 20 mL of phosphate buffer saline (KH_2PO_4 4.4 mM, Na_2HPO_4 45.1 mM, NaCl 105.8 mM, pH 7.4) in a flask incubated under gentle magnetic stirring (200 rpm) in a water bath at 37 °C. At various time intervals, 1.5 mL samples were withdrawn, filtered on a 0.22 µm Millipore filter and

Author's personal copy

replaced by 1.5 mL fresh buffer. The same type of experiment was performed with unloaded microparticles that were stirred for 24 h in the dissolution medium. After 24 h, the total volume (20 mL), filtered on 0.22 µm filters, was used for performing the LMWH anti-Xa and anti-IIa activity calibration curve.

2.2.4. Determination of drug entrapment efficiency and in vitro drug release

2.2.4.1. Turbidimetric assay. The amount of LMWH entrapped and released from microparticles was determined by a turbidimetric method [25]. Turbidimetric assay is based on the quantitative precipitation reaction of stoichiometry (1:1) occurring between both sulfate and carboxyl groups of heparin at pH 6.8 and the amine groups of cetylpyridinium chloride [26]. All experiments were performed in triplicate.

Five hundred µL aliquots of each sample were reacted at 37 °C for 1 h with 500 µL of acetate buffer (1 M, pH 5), followed by the addition of 2 mL of cetylpyridinium chloride (2.9 mM) in NaCl aqueous solution (168.8 mM) and were assayed by spectophotometry at 500 nm, in duplicate (Uvikon 922, Kontron, Eching, Germany). The drug entrapment efficiency was expressed as the percentage of LMWH entrapped with respect to the theoretical value, whereas the drug loading (or the *in vitro* drug release) was presented as the amount of LMWH (U) entrapped (or released) per gram of polymer.

2.2.4.2. Biological assay. The *in vitro* activities of LMWH entrapped and released from microparticles were also measured by biological methods [27] with the determination of i) the anti-factor Xa activity with a chromogenic substrate (CH_3SO_2-d-Leu-Gly-Arg-pNA.AcOH) and ii) the anti-factor IIa activity with another chromogenic substrate (H-d-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl). Each experiment was performed automatically (STA Compact Automate, Diagnostica Stago, France), in triplicate.

2.2.4.2.1. Anti-Xa activity. LMWH standards and samples (25 µL) were incubated in the presence of antithrombin (50 µL) with an excess of factor Xa (100 µL), during 90s at 37 °C. Thus, an AT-heparin-factor Xa complex is formed and the remaining free Xa catalyzes the release of p-nitroaniline (pNA) from the chromogenic substrate (100 µL). The absorbance was determined at 405 nm every 2 s for 10 to 30 s of incubation.

LMWH assay was performed using a standard calibration curve in the PBS filtrate (obtained after dissolution of unloaded microparticles and filtration on 0.22 µm filters) in the range of 0.1–0.7 anti-Xa U/mL and 0.1–0.6 anti-Xa U/mL, for tinzaparin ($R=-0.999$) and nadroparin ($R=-0.998$), respectively.

2.2.4.2.2. Anti-IIa activity. LMWH standards and samples (55 µL) were incubated in the presence of antithrombin (100 µL) with an excess of factor IIa (25 µL) during 60 s at 37 °C. An AT-heparin-factor IIa complex is formed and the remaining free IIa catalyzes the release of p-nitroaniline (pNA) from the chromogenic substrate (100 µL). The absorbance was determined at 405 nm every 2 s for 10 to 60 s of incubation.

Analysis of LMWH was performed using a standard calibration curve in the PBS filtrate (obtained after dissolution of unloaded microparticles and filtration on 0.22 µm filters) in the range of 0.1–0.7 anti-Xa U/mL and 0.1–0.7 anti-Xa U/mL, for tinzaparin ($R=-0.997$) and nadroparin ($R=-0.998$), respectively.

2.2.4.2.3. Expression of results. The anti-Xa (or anti-IIa) entrapment efficiency was expressed as the percentage of anti-Xa (or anti-IIa) units entrapped with respect to the theoretical value, whereas the anti-Xa (or anti-IIa) drug loading was presented as the amount of anti-Xa (or anti-IIa) units entrapped per gram of polymer.

In order to get an insight on potential changes in the proportion chain lengths below and above the critical chain length, we calculated the anti-Xa/anti-IIa ratios. The drug loading ratio corresponded to the entrapped anti-Xa units divided by the entrapped anti-IIa units. The released ratio was expressed as anti-Xa units released per gram of polymer divided by anti-IIa units released per gram of polymer.

2.2.5. Statistical treatment of experimental results

The Mann–Whitney test was applied to the results of both *in vitro* release and anti-Xa/anti-IIa ratios. In all cases, a probability value of less than 0.05 was considered to be significant.

3. Results and discussion

The selection of the optimal microencapsulation technique for a drug depends strongly on its physicochemical properties. For the entrapment of highly water-soluble molecules such as LMWH, double emulsion (water/oil/water) followed by a solvent extraction has been established as the best technique for many years [15,28]. Under controlled conditions, two successful emulsification steps determine the size of the droplets in the polymeric organic phase and consequently the size of the particles formed during the solvent extraction step. The addition of surface-active agents and the mechanical stirring rate are the most important conditions [29,30]. The use of components with surfactant properties such as PVA or Eudragit® RS [31] is appropriate because they help to stabilize the emulsion and to avoid particle coalescence. Vigorous mechanical stirring reduces the particle size, but carries the disadvantage of possible shear-induced cleavage of the heparin chains.

This technique was successfully applied in our laboratory to a mixture of Eudragit® RS and uncapped PLGA i.e. "PLGA H". With the aim of comparing encapsulation and release with a less degradation-sensitive PLGA, another kind of PLGA, i.e. end-capped PLGA ("PLGA S"), was tested. According to the supplier, the two types of PLGA have similar viscosity and molecular weight. The only difference between them is that the end-capped PLGA is substituted by an alkyl group on its acidic terminal. Thus, the ester group leads to slower degradation of PLGA S compared with PLGA H.

3.1. Particle size and shape

It can be observed (Table 1) that the microparticles without heparin were generally smaller than the particles containing the drug. In fact, the mean diameter of heparin-loaded microparticles varied from 43 to 98 µm, whereas the one of empty microparticles was in the interval 17–63 µm. The surface-active properties of Eudragit® RS are responsible for the small size of empty microparticles [31]. Indeed, in case of loaded microparticles, the electrostatic interactions between the positively charged Eudragit® RS and LMWH decreased the surfactant properties of Eudragit® RS, leading to a formation of larger microparticles, regardless of the polymer ratio. Thus smaller blank particles were obtained in the case of the ERS 100%, PLGA 25%/ERS 75%, and PLGA 50%/ERS 50% ratio. However, it should be noted that the diameters of loaded and unloaded microparticles of PLGA H 75%/ERS 25% were quite similar, probably due to the insufficient amount of Eudragit® RS which could not exhibit its surfactant properties. Microparticles formed from 100% PLGA H or PLGA S microparticles were attempted but could not be formed; the preparation resulted in polymeric threads.

Particle shape was observed under an optical microscope (Olympus IX 50, Olympus France S.A.S, France). It was noticed that the shape of microparticles consisting of at least 50% of Eudragit RS® was more regular and spherical than that of microparticles formed from PLGA 75%/ERS 25% polymer ratio which showed irregular shape and significant amount of polymer fragments at their surface.

3.2. Entrapment efficiency

It has to be kept in mind that the turbidimetric assay does not measure the biological activity but the presence of polysaccharide chains whether they are active or not.

Author's personal copy

Table 1
Physicochemical properties of heparin-loaded microparticles.

PLGA type	Polymer to polymer ratio	Empty microparticles	Nadroparin-loaded microparticles			Tinzaparin-loaded microparticles		
		Mean diameter (μm)	EE (%)	Drug loading (U/g of polymer)	Mean diameter (μm)	EE (%)	Drug loading (U/g of polymer)	Mean diameter (μm)
	ERS 100%	27 ± 3	85 ± 2	17,056 ± 433	53 ± 18	72 ± 4	14,301 ± 900	49 ± 2
PLGA S	PLGA S 25%/ERS 75%	17 ± 3	85 ± 4	16,930 ± 846	43 ± 5	74 ± 4	14,870 ± 731	54 ± 6
	PLGA S 50%/ERS 50%	50 ± 7	84 ± 4	16,718 ± 759	94 ± 15	57 ± 5	11,473 ± 1020	98 ± 3
	PLGA S 75%/ERS 25%	36 ± 8	62 ± 9	12,396 ± 1768	89 ± 19	22 ± 5	4335 ± 926	58 ± 6
PLGA H	PLGA H 25%/ERS 75%	22 ± 6	87 ± 1	17,400 ± 241	62 ± 38	70 ± 2	13,861 ± 316	57 ± 6
	PLGA H 50%/ERS 50%	19 ± 10	86 ± 2	17,114 ± 485	58 ± 14	70 ± 1	13,968 ± 205	69 ± 2
	PLGA H 75%/ERS 25%	64 ± 23	69 ± 4	13,802 ± 748	61 ± 28	39 ± 3	7846 ± 519	49 ± 2

Data are means ± SD, $n = 3$.
EE—entrapment efficiency.

Entrapment efficiency of LMWH-loaded microparticles prepared with Eudragit® RS alone or in combination with PLGA (Table 1) ranged from 62% to 87% for nadroparin and from 22% to 74% for tinzaparin. These encapsulation efficiencies were satisfactory. Indeed, since heparins are water-soluble compounds, they have a tendency to leak into the aqueous external phase during the drug entrapment step before polymer precipitation, which usually decreases the entrapment efficiency. However, in the double emulsion method using ethyl acetate as the extraction solvent, the extraction step is nearly instantaneous as a result of the high solubility of ethyl acetate in water (about 10% v/v). Thus, during the second emulsification, ethyl acetate was easily and quickly dissolved in the aqueous external phase, causing fast polymer precipitation and rapid formation of solid microparticles, avoiding a large leakage of LMWH.

Furthermore, two parameters appeared to have an effect on the entrapment efficiency: the nature of LMWH and the polymer ratio of the formulation. Indeed, it should be noted that the nadroparin entrapment efficiency was higher than that of tinzaparin in all formulations. The different compositions of tinzaparin and nadroparin may explain these results. Although nadroparin and tinzaparin belong to the same family of molecules, they could not be considered as identical: their physicochemical properties are different depending on their preparation method. Depolymerisation methods used for the preparation cause the differences in the chain length distribution [23,24] and distinguishable terminus, i.e. the presence of 4,5 unsaturated uronic acid at nonreducing terminus for tinzaparin and reducing of nadroparin bearing a 2,5-anhydro-D-mannose [32]. Thus, it could be speculated that tinzaparin chains are slightly longer and more reactive than nadroparin ones, explaining different interactions and behaviors of these both LMWH with polymers.

For any one LMWH, the entrapment efficiency values were highest when positively charged polymethacrylates were used in higher proportions, i.e. at least 50% in the formulation. Entrapment efficiencies of these formulations were 84–87% and 57–74% for nadroparin and tinzaparin, respectively. The use of the PLGA 75%/ERS 25% polymer mixture led to lower entrapment efficiency, especially for tinzaparin that decreased from 72% (ERS 100%) to 39% (PLGA H 75%/ERS 25%) and even to 22% (PLGA S 75%/ERS 25%). These observations can be explained by the physicochemical properties of the polymers. On one hand, in formulations containing more than 50% of Eudragit® RS, polycationic groups of Eudragit RS® can interact with the anionic chains of heparins. Consequently, a much less migration of the entrapped drug into the external aqueous phase occurred before the polymer precipitation. On the other hand, in the PLGA 75%/ERS 25% formulation, the main component was PLGA, a non charged hydrophobic polymer. Thus charged hydrophilic chains of heparin tended to migrate more rapidly towards the external aqueous phase before polymer precipitation. Furthermore, there was less Eudragit RS® available to interact with heparin chains.

Finally, it must be noted that the nature of the PLGA (uncapped or end-capped) did not seem to have a significant influence on the encapsulation rate (87% ± 1% for PLGA H and 85% ± 4% for PLGA S in nadroparin PLGA 25%/ERS 75% formulations).

3.3. In vitro LMWH release profiles

Release profiles of nadroparin and tinzaparin from microparticles are shown in Fig. 1. Since similar results were obtained for both PLGA types, only results with PLGA S are presented.

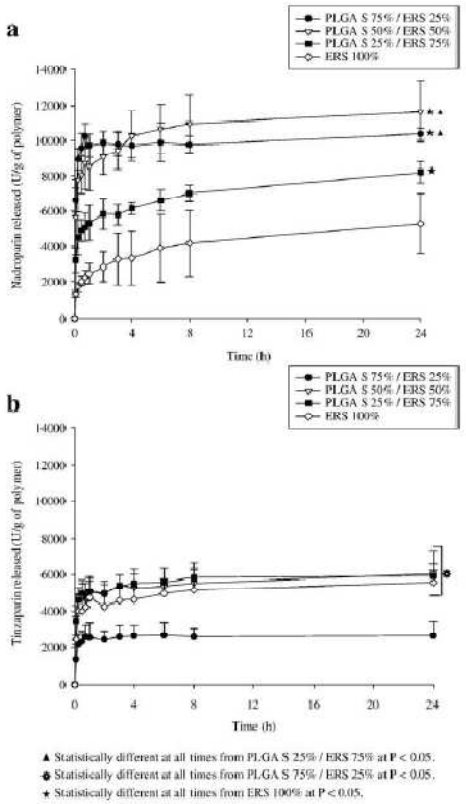


Fig. 1. *In vitro* release profiles of (a) nadroparin and (b) tinzaparin from microparticles. Microparticles were prepared with a non biodegradable polymer ERS alone or mixed with biodegradable polymer PLGA S: PLGA S 25%/ERS 75%; PLGA S 50%/ERS 50%; PLGA S 75%/ERS 25%. Experiments were performed in phosphate buffer at 37 °C and pH 7.4. Data are means ± SD ($n = 3$).

Author's personal copy

For all heparin formulations, the release profiles could be divided in two phases: an initial burst followed by a plateau. However, the curves had different forms depending on the LMWH used: for tinzaparin, a large and rapid burst was observed during the first half-hour and was followed by a plateau leading to an incomplete release at 24 h. For nadroparin, the total amount released at 24 h was higher (12,637 U/g of polymer, PLGA S 50%/ERS 50% formulation) than that of tinzaparin (6057 U/g of polymer, PLGA S 50%/ERS 50% formulation) except for the ERS 100% formulations which yielded the same values (5299 ± 1714 U/g of polymer and 5577 ± 653 U/g of polymer for nadroparin and tinzaparin, respectively). In addition, the release of nadroparin was slower and more sustained than that of tinzaparin. From these observations, it was deduced that some heparin chains were partly adsorbed on the surface of microparticles, leading to easy desorption and explaining the burst effect. On the other hand, other chains interacted strongly with Eudragit® RS, leading to their incomplete release. The relative proportion of the chains at the surface or bound to Eudragit® RS may be the reason for the observed differences in the release profiles.

Moreover, the release of both types of LMWH depended on the composition of the formulation. The amount of Eudragit® RS influenced the nadroparin release whereas tinzaparin release was not statistically different regardless of the amount of Eudragit® RS (except for PLGA S 75%/ERS 25% microparticles). The low amount of drug released from the latter formulation can be explained by the difference of entrapment efficiency. Indeed, entrapment efficiency values were very similar for formulations with a high amount of Eudragit® RS (72 ± 4%, 74 ± 4% and 57 ± 5% in ERS 100%, PLGA S 25%/ERS 75% and PLGA S 50%/ERS 50%, respectively) compared to the low value of PLGA S 75%/ERS 25% formulation (22 ± 5%). This different behavior could be explained by the different composition of the two LMWH. Tinzaparin contains a larger proportion of long chains [23,24] that were able to interact strongly with Eudragit® RS, compared to nadroparin. These interactions led to an incomplete release whereas the weaker interactions between Eudragit® RS and nadroparin were easily disrupted and allowed sustained release.

3.4. Change in the anti-Xa/anti-IIa drug loading ratio after encapsulation

Since the turbidimetric assay does not measure the biological activity but only the presence of the polysaccharide chains, additional biological dosages have been performed in order to discriminate the active chains (i.e. BCL and ACL chains) among all the chains.

For each formulation, the encapsulation efficiency and the drug loading in terms of anti-Xa and anti-IIa activities were calculated. For easier comparison, these results and the corresponding anti-Xa/anti-IIa ratios are presented in Table 2.

During the formulation step, 5000 anti-Xa units of LMWH were systematically used for a total amount of 250 mg of polymer, thus the maximal anti-Xa drug loading expected was 20,000 anti-Xa units per gram of polymer. However, although the maximal anti-Xa drug loading was the same for the two heparins, the maximal anti-IIa drug loading would be different, depending on the anti-Xa/anti-IIa ratio. For instance, the number of anti-IIa units introduced during manufacturing was 20,000/3.5 ≈ 5714 and 20,000/1.8 ≈ 11,111 for nadroparin microparticles and tinzaparin microparticles respectively. Thus, as shown in Table 2, nadroparin entrapment efficiency of 94% (PLGA S 50%/ERS 50% formulation) corresponded to a drug loading of 5503 anti-IIa units whereas the same entrapment efficiency for tinzaparin (94%; ERS 100% formulation) corresponded to a drug loading of 10,455 anti-IIa units.

The results shown in Table 2 indicate that the anti-Xa/anti-IIa activity ratio of both LMWH decreased after encapsulation compared to the commercial values.

Indeed, the anti-Xa activity entrapment efficiency was always slightly lower than anti-IIa activity entrapment efficiency, leading to

Table 2
Effects of encapsulation on anti-Xa/anti-IIa ratio, anti-Xa and anti-IIa activities for microparticles of nadroparin and tinzaparin.

PLGA type	Polymer to polymer ratio	Nadroparin					Tinzaparin				
		Anti-Xa/anti-IIa ratio	Anti-Xa activity		Anti-IIa activity		Anti-Xa/anti-IIa ratio	Anti-Xa activity		Anti-IIa activity	
			EE (%)	Drug loading (anti-Xa U/g of polymer)	EE (%)	Drug loading (anti-IIa U/g of polymer)		EE (%)	Drug loading (anti-Xa U/g of polymer)	EE (%)	Drug loading (anti-IIa U/g of polymer)
	Commercial dosage form[a]	3.50	–	–	–	–	1.80	–	–	–	–
	ERS 100%	3.20 ± 0.07	90 ± 2	18,052 ± 395	99 ± 0	5633 ± 12	1.69 ± 0.06	88 ± 3	17,635 ± 534	94 ± 0	10,455 ± 37
PLGA S	PLGA S 25%/ERS 75%	3.13 ± 0.08	87 ± 3	17,377 ± 683	97 ± 1	5551 ± 70	1.61 ± 0.04	83 ± 4	16,576 ± 804	92 ± 2	10,260 ± 242
	PLGA S 50%/ERS 50%	3.02 ± 0.16	83 ± 3	16,572 ± 688	94 ± 2	5503 ± 253	1.51 ± 0.04	72 ± 4	14,499 ± 838	87 ± 3	9613 ± 314
	PLGA S 75%/ERS 25%	3.13 ± 0.74	65 ± 5	13,021 ± 1062	75 ± 12	4263 ± 703	1.02 ± 0.06	34 ± 4	6717 ± 848	59 ± 4	6576 ± 415
PLGA H	PLGA H 25%/ERS 75%	3.25 ± 0.05	91 ± 2	18,185 ± 311	98 ± 0	5593 ± 23	1.66 ± 0.01	84 ± 1	16,863 ± 232	92 ± 1	10,184 ± 95
	PLGA H 50%/ERS 50%	3.15 ± 0.15	85 ± 3	17,037 ± 600	95 ± 1	5405 ± 36	1.50 ± 0.00	70 ± 0	13,913 ± 90	84 ± 1	9295 ± 74
	PLGA H 75%/ERS 25%	2.94 ± 0.14	72 ± 5	14,381 ± 909	85 ± 2	4881 ± 107	1.20 ± 0.19	35 ± 7	6944 ± 1376	52 ± 2	5823 ± 201

Data are means ± SD ($n = 3$).
EE—entrapment efficiency.
[a] According to the manufacturer.

Author's personal copy

a decrease of the anti-Xa/anti-IIa ratio. For example, nadroparin PLGA S 50%/ERS 50% formulation displayed anti-Xa and anti-IIa activity entrapment efficiencies of 83 ± 3% and 94 ± 2%, respectively. The corresponding ratio was 3.02, whereas the commercial ratio was 3.5.

Differences between the anti-Xa/anti-IIa ratio of the commercial solution and the experimental values in the microparticles could be explained as follows. During the initial encapsulation step, both hydrophilic BCL and ACL chains were present in the internal aqueous phase of the double emulsion. Although all heparin chains are negatively charged, ACL chains carry significantly more negative charge than BCL chains due to the higher number of sulfates and carboxylic groups per chain. ACL chains probably interacted more intensively with the positively charged Eudragit® RS groups than BCL chains. Consequently, during the solvent and water leakage from the internal phase which initiates the polymer precipitation, probably fewer ACL chains would leave the polymeric matrix than shorter BCL chains. Thus, it can be assumed that the preferential encapsulation of the ACL chains leads to the decrease of the anti-Xa/anti-IIa ratio in comparison with the commercial ratio.

Another phenomenon, the cleavage of ACL chains to BCL chains due to the mechanical stress of the stirring period could also contribute to the observed decrease of the anti-Xa/anti-IIa ratio. Indeed, the use of sonication and vigorous mechanical stirring creates a risk of shearing ACL chains, which would then appear as BCL chains in the external phase. Thus the loss of BCL chains may be overestimated.

The entrapped activity ratio seemed to be only slightly dependent on the percentage of Eudragit® RS. Indeed, although the entrapment efficiency of anti-Xa and anti-IIa activities appeared to be correlated with this parameter, they vary in the same manner, yielding a quite constant ratio. Thus, large changes in the ratio reflect a difference in behavior between anti-Xa activity and anti-IIa activity, whereas insignificant changes demonstrate the same tendency, i.e. a decrease in both anti-Xa and anti-IIa activities.

Indeed, in formulations with Eudragit® RS concentrations higher than 50%, very similar anti-Xa and anti-IIa activities entrapment efficiencies were observed. For these formulations, nadroparin entrapment efficiency values were 83–91% for the anti-Xa activity and 94–99% for the anti-IIa activity, while the activity ratio ranged between 3.02 and 3.25. As far as tinzaparin was concerned, entrapment efficiency values for the same formulations were 70–88% for the anti-Xa activity and 84–94% for the anti-IIa activity whereas the activity ratio ranged between 1.50 and 1.69. The amount of Eudragit® RS was sufficient to allow good entrapment efficiency of both BCL and ACL chains, but always with a trend in better encapsulation of ACL chains compared to BCL chains.

On the other hand, in PLGA S 75%/ERS 25% formulations of tinzaparin, entrapment efficiency of anti-Xa and anti-IIa activities were 34% and 59%, respectively. This 25% difference between anti-Xa and anti-IIa entrapment efficiencies leads to the smallest anti-Xa/anti-IIa ratio, i.e. 1.02. Thus, in formulations containing a low proportion of Eudragit® RS, ACL chains seemed to be less subject to leakage during the encapsulation step compared with BCL chains probably due to their stronger interaction with Eudragit® RS, as mentioned above.

To conclude, a decrease of the anti-Xa/anti-IIa ratio due to a preferential encapsulation of ACL chains was observed in all formulations. This finding was even more pronounced in the formulations with a low content of Eudragit® RS.

This is the first time, to the best of our knowledge, that such a phenomenon has been reported. On the other hand, there is no other active molecule which is a mixture of chain lengths like heparin, except the other glycosaminoglycans such as chondroitin sulfate or dermatan sulfate. Nevertheless, in the limited number of studies on chondroitin sulfate-based microparticles, the authors did not study the encapsulation process with respect to the length of the chains [33,34].

3.5. Anti-Xa/anti-IIa ratio variations during drug release

The variations of the anti-Xa/anti-IIa ratio for nadroparin and tinzaparin during *in vitro* release are presented in Fig. 2. Since similar results were obtained for both PLGA types, only results with PLGA S are presented.

First of all, regardless of the LMWH and formulation used, an increase of anti-Xa/anti-IIa ratio compared to the commercial values was noticed. Therefore, an easier release of BCL chains was observed whereas ACL chains had a tendency to remain within the microparticles.

For nadroparin microparticles, as shown in Fig. 2, the increase of the anti-Xa/anti-IIa ratio was related to the formulation. Indeed, the higher the amount of Eudragit® RS in the formulation the higher the ratio. Thus, the increase in the ratio at 24 h was between 1.14 (with the PLGA S 75%/ERS 25% formulation) and 12.68 times (with the ERS 100% formulation). During the drug release step, the release of the BCL chains would be easier than that of the ACL chains due to their smaller size which would permit faster diffusion across the polymeric matrix of nadroparin microparticles but also because of the reduced ionic interactions with the positively charged groups of Eudragit® RS.

For tinzaparin microparticles, anti-Xa/anti-IIa ratios during the release were not statistically different. It seems that the composition

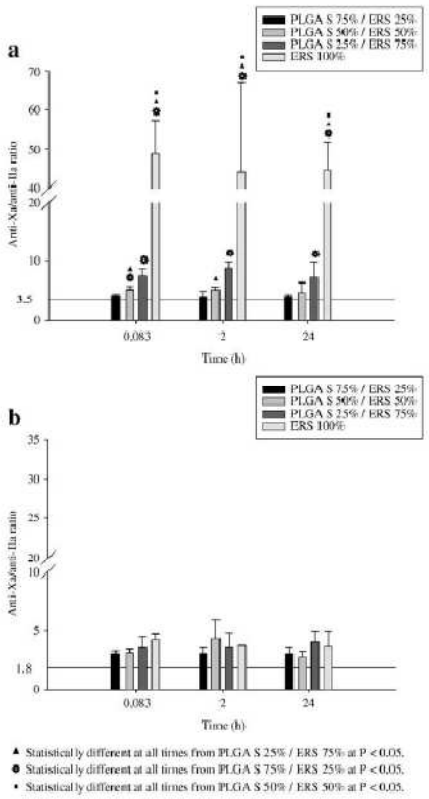


Fig. 2. Anti-Xa/anti-IIa ratios of (a) nadroparin and (b) tinzaparin during release from microparticles. Microparticles were prepared with a non biodegradable polymer ERS alone or mixed with biodegradable polymer PLGA: PLGA S 25%/ ERS 75%; PLGA S 50%/ ERS 50%; PLGA S 75%/ERS 25%. Experiments were performed in phosphate buffer at 37 °C and pH 7.4. Data are means ± SD ($n = 3$). Please note change in scale between (a) and (b).

Author's personal copy

of the formulation did not influence the release. Therefore, the observation is probably related to differences of composition between tinzaparin and nadroparin [32], as mentioned above. Indeed, in addition to different end-terminus for the LMWH chains leading to a higher reactivity of tinzaparin chains, the depolymerization methods used for preparation also yield a larger fraction of ACL chains for tinzaparin than nadroparin. Thus, during the encapsulation step of tinzaparin, there were probably more interactions with Eudragit® RS leading to higher proportion of tightly bound chains (therefore trapped within the matrix) whereas another part, adsorbed on the surface, could be easily released.

This phenomenon may also occur with nadroparin, but probably due to the difference of composition, the balance between adsorbed chains and chains bound to Eudragit® RS would be in favor of bound chains. However, these bound chains are probably shorter than those of tinzaparin and therefore released more easily, as mentioned previously.

4. Conclusion

For the first time, it has been shown that a microencapsulation process allows selective incorporation and release of different length chains of the same active entity. This selectivity appears to depend on the charge and molecular weight of chains and also on the composition of the matrix.

Indeed, the ACL chains bearing both the anti-IIa and anti-Xa activity are more easily encapsulated than the BCL chains bearing exclusively anti-Xa activity, presumably due to many more interactions with the positively charged Eudragit® RS. On the other hand, these stronger interactions between ACL chains and Eudragit® RS explain that ACL are retained in the matrix whereas BCL chains are easily released.

Our heparin delivery system provides release of heparin chains with a new and different anti-Xa/anti-IIa ratio compared with the commercial ratio, and therefore constitutes a new pharmaceutical form of LMWH.

Since it has already been demonstrated that this type of microparticles can promote the oral absorption of heparin, *in vivo* studies will be carried out in order to determine the resulting anti-Xa/anti-IIa ratio.

Acknowledgement

The help of Dr. Gillian Barratt in reviewing the revised manuscript is greatly acknowledged.

References

[1] C. Kearon, S.R. Kahn, G. Agnelli, S. Goldhaber, G.E. Raskob, A.J. Comerota, Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition), Chest 133 (6 Suppl) (2008) 454S–545S.
[2] A.K. Kaklar, Low- and ultra-low-molecular-weight heparins, Best Pract. Res. Clin. Haematol. 17 (1) (2004) 77–87.
[3] B. Boneu, Low molecular weight heparins: are they superior to unfractionated heparins to prevent and to treat deep vein thrombosis? Thromb. Res. 100 (2) (2000) V113–120.
[4] G.T. Gerotziafas, A.D. Petropoulou, E. Verdy, M.M. Samama, I. Elalamy, Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation, J. Thromb. Haemost. 5 (5) (2007) 955–962.
[5] J. Hirsh, K.A. Bauer, M.B. Donati, M. Gould, M.M. Samama, J.I. Weitz, Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition), Chest 133 (6 Suppl) (2008) 141S–159S.
[6] S.A. Mousa, F. Zhang, A. Aljada, S. Chaturvedi, M. Takieddin, H. Zhang, L. Chi, M.C. Castelli, K. Friedman, M.M. Goldberg, R.J. Linhardt, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral heparin solid dosage form in healthy human subjects, J. Clin. Pharmacol. 47 (12) (2007) 1508–1520.
[7] C.E. Kast, D. Guggi, N. Langoth, A. Bernkop-Schnurch, Development and in vivo evaluation of an oral delivery system for low molecular weight heparin based on thiolated polycarbophil, Pharm. Res. 20 (6) (2003) 931–936.
[8] Y. Ito, T. Kusawake, Y.V. Prasad, N. Sugioka, N. Shibata, K. Takada, Preparation and evaluation of oral solid heparin using emulsifier and adsorbent for in vitro and in vivo studies, Int. J. Pharm. 317 (2) (2006) 114–119.
[9] M. Thanou, S. Henderson, A. Kydonieus, C. Elson, N-sulfonato-N,O-carboxymethylchitosan: a novel polymeric absorption enhancer for the oral delivery of macromolecules, J. Control. Release 117 (2) (2007) 171–178.
[10] V. Grabovac, T. Schmitz, F. Foger, A. Bernkop-Schnurch, Papain: an effective permeation enhancer for orally administered low molecular weight heparin, Pharm. Res. 24 (5) (2007) 1001–1006.
[11] P.Y. Hayes, B.P. Ross, B.G. Thomas, I. Toth, Polycationic lipophilic-core dendrons as penetration enhancers for the oral administration of low molecular weight heparin, Bioorg. Med. Chem. 14 (1) (2006) 143–152.
[12] T. Schmitz, V.M. Leitner, A. Bernkop-Schnurch, Oral heparin delivery: design and in vivo evaluation of a stomach-targeted mucoadhesive delivery system, J. Pharm. Sci. 94 (5) (2005) 966–973.
[13] S.K. Kim, B. Vaishali, E. Lee, S. Lee, Y.K. Lee, T.S. Kumar, H.T. Moon, Y. Byun, Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation, Thromb. Res. 117 (4) (2006) 419–427.
[14] V. Hoffart, A. Lamprecht, P. Maincent, T. Lecompte, C. Vigneron, N. Ubrich, Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system, J. Control. Release 113 (1) (2006) 38–42.
[15] Y. Jiao, N. Ubrich, V. Hoffart, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman, P. Maincent, Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits, J. Pharm. Sci. 91 (3) (2002) 760–768.
[16] R. al Dieri, S. Alban, S. Beguin, H.C. Hemker, Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time, J. Thromb. Haemost. 2 (8) (2004) 1395–1401.
[17] H.C. Hemker, S. Beguin, in: H. Bounameux (Ed.), Low-molecular-weight Heparins in Prophylaxis and Therapy of Thromboembolic Diseases (Fundamental Clinical Cardiology Series), vol. 19, Editions Medicales Inter-nationales, New York, 1994, pp. 21–42.
[18] J. Choay, M. Petitou, J.C. Lormeau, P. Sinay, B. Casu, G. Gatti, Structure–activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity, Biochem. Biophys. Res. Commun. 116 (2) (1983) 492–499.
[19] L.H. Lam, J.E. Silbert, R.D. Rosenberg, The separation of active and inactive forms of heparin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 69 (2) (1976) 570–577.
[20] E. Gray, B. Mulloy, T.W. Barrowcliffe, Heparin and low-molecular-weight heparin, Thromb. Haemost. 99 (5) (2008) 807–818.
[21] J. Choay, Structure and activity of heparin and its fragments: an overview, Semin. Thromb. Hemost. 15 (4) (1989) 359–364.
[22] D.A. Lane, J. Denton, A.M. Flynn, L. Thunberg, U. Lindahl, Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4, Biochem. J. 218 (3) (1984) 725–732.
[23] Monographie 01/2008:1134, Nadroparine Calcique. Pharmacopée Européenne, Vol. 6, 2007, pp. 2647–2650.
[24] Monographie 01/2008:1271, Tinzaparine Sodique. Pharmacopée Européenne, Vol. 6, 2007, pp. 3322–3323.
[25] M. Ardry, Dosage de l'héparine, Bull. Ordre 135 (1971) 699–708.
[26] B. Demore, E. Benoit, P. Maincent, M. Hoffman, J. Bessiere, Determination of heparin in aqueous solutions, J. Clin. Pharm. Ther. 23 (5) (1998) 381–384.
[27] A.N. Teien, M. Lie, Evaluation of an amidolytic heparin assay method: increased sensitivity by adding purified antithrombin III, Thromb. Res. 10 (3) (1977) 399–410.
[28] R. Alex, R. Bodmeier, Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment, J. Microencapsul 7 (3) (1990) 347–355.
[29] Y.Y. Yang, T.S. Chung, N.P. Ng, Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, Biomaterials 22 (3) (2001) 231–241.
[30] S. Freiberg, X.X. Zhu, Polymer microspheres for controlled drug release, Int. J. Pharm. 282 (1–2) (2004) 1–18.
[31] Y.V. Chernyshera, V.G. Babak, N.R. Kildeeva, F. Boury, J.P. Benoit, N. Ubrich, P. Maincent, Effect of the type of hydrophobic polymers on the size of nanoparticles obtained by emulsification-solvent evaporation, Mendeleev Commun. 2 (2003) 65–68.
[32] R.L. Bick, E.P. Frenkel, J. Walenga, J. Fareed, D.A. Hoppensteadt, Unfractionated heparin, low molecular weight heparins, and pentasaccharide: basic mechanism of actions, pharmacology, and clinical use, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 19 (1) (2005) 1–51.
[33] K.E. Brown, K. Leong, C.H. Huang, R. Dalal, G.D. Green, H.B. Haimes, P.A. Jimenez, J. Bathon, Gelatin/chondroitin 6-sulfate microspheres for the delivery of therapeutic proteins to the joint, Arthritis Rheum. 41 (12) (1998) 2185–2195.
[34] A. Ganza-Gonzalez, S. Anguiano-Igea, F.J. Otero-Espinar, J. Blanco Mendez, Chitosan and chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metoclopramide, Eur. J. Pharm. Biopharm. 48 (2) (1999) 149–155.