



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 POINCARÉ – NANCY I

2007

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de
PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 8 janvier 2007

par **Marie Socha**
née le 13 avril 1978

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de



**THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE**

Développement de nanoparticules furtives

Membres du Jury

Président : Professeur Philippe Maincent
Directeur de thèse : Docteur Nathalie Ubrich

Juges : Docteur Béatrice Demoré
Professeur Alf Lamprecht
Professeur Thomas Lecompte



2007

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de
PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 8 janvier 2007

par **Marie Socha**
née le 13 avril 1978

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de



THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Développement de nanoparticules furtives

Membres du Jury

Président : Professeur Philippe Maincent
Directeur de thèse : Docteur Nathalie Ubrich

Juges : Docteur Béatrice Demoré
Professeur Alf Lamprecht
Professeur Thomas Lecompte

Membres du personnel enseignant 2006/2007

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Filière officine

Gérald CATAU

Responsables de la Filière industrie

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

Responsable de la Filière hôpital

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mme BESSON Suzanne

Mme GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. LOPPINET Vincent

M. MARTIN Jean-Armand

M. MIRJOLET Marcel

M. MORTIER François

M. PIERFITTE Maurice

M. SCHWARTZBROD Louis

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

M. SIEST Gérard

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Mme FUZELLIER Marie-Claude

Mme POCHON Marie-France

Mme IMBS Marie-Andrée

Mme ROVEL Anne

M. MONAL Jean-Louis

Mme WELLMAN-ROUSSEAU Marie Monica

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain

Pharmacie clinique

M. ATKINSON Jeffrey

Pharmacologie cardiovasculaire

M. AULAGNER Gilles

Pharmacie clinique

M. BAGREL Alain

Biochimie

M. BLOCK Jean-Claude

Santé publique

Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine

Pharmacologie cardiovasculaire

Mme FINANCE Chantal

Virologie, immunologie

Mme FRIANT-MICHEL Pascale

Mathématiques, physique, audioprothèse

Mle GALTEAU Marie-Madeleine

Biochimie clinique

M. HENRY Max

Botanique, mycologie

M. JOUZEAU Jean-Yves

Bioanalyse du médicament

M. LABRUDE Pierre

Physiologie, orthopédie, maintien à domicile

M. LALLOZ Lucien

Chimie organique

Mme LARTAUD Isabelle

Pharmacologie

Mme LAURAIN-MATTAR Dominique

Pharmacognosie

M. LEROY Pierre

Chimie physique générale

M. MAINCENT Philippe

Pharmacie galénique

M. MARSURA Alain

Chimie thérapeutique

M. MERLIN Jean-Louis

Biologie cellulaire oncologique

M. NICOLAS Alain

Chimie analytique

M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard

Chimie thérapeutique

M. RIHN Bertrand

Biochimie

Mme SCHWARTZBROD Janine

Bactériologie, parasitologie

M. SIMON Jean-Michel

Economie de la santé, législation pharmaceutique

M. VIGNERON Claude

Hématologie, physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Communication et santé
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	BOURRA Cédric	Physiologie
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, organisation animale
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique, mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Mme	Florence DUMARCAZ	Chimie thérapeutique
M.	François DUPUIS	Pharmacologie
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Informatique, biostatistiques
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mle	MARCHAND Stéphanie	Chimie physique
M.	MEHRI-SOUSSI Faten	Hématologie biologique
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MERLIN Christophe	Microbiologie environnementale et moléculaire
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAPIN Anne	Pharmacie galénique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M.	ZAIOU Mohamed	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Sémiologie

PROFESSEUR AGREGÉ

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorier ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDERES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Monsieur le Professeur Philippe Maincent de m'avoir accueillie dans son laboratoire, soutenue tout au long de mon internat et encouragée à poursuivre mes recherches dans le cadre d'un DEA et aujourd'hui d'un doctorat. Vos conseils et votre confiance m'ont été d'un soutien important.

Je remercie très chaleureusement Madame le Docteur Nathalie Ubrich pour ces années passées et à venir de complicité et d'amitié partagées. Vous m'avez initiée au travail de recherche au sein d'un laboratoire. Vous avez su diriger ce travail avec enthousiasme et bonne humeur dans chacune des étapes que nous avons dû traverser. Vos compétences scientifiques mais surtout vos qualités humaines, votre soutien moral et votre gentillesse sont pour moi un réel moteur.

Je remercie sincèrement Mademoiselle le Docteur Béatrice Demoré d'avoir bien voulu s'intéresser à nouveau à la Pharmacie Galénique afin de juger aujourd'hui mon travail de fin d'internat. Ces trois semestres d'internat passés en votre compagnie au sein de la Pharmacie de l'hôpital de Brabois adultes m'ont été formateurs et agréables.

Je tiens également à remercier Messieurs les Professeurs Alf Lamprecht et Thomas Lecompte d'avoir accepté d'évaluer mon travail en faisant partie de ce jury.

J'adresse une pensée amicale à tous mes collaborateurs et amis du Laboratoire de Pharmacie Galénique de Nancy : les techniciens pour leur aide précieuse lors des manipulations *in vivo*, tous les étudiants que j'ai rencontrés durant ces années pour leur bonne humeur et leur sympathie mais aussi Mademoiselle Anne Sapin, Maître de conférences pour ses conseils judicieux.

Je ne peux refermer cette page sans exprimer mes remerciement aux personnes qui me sont les plus proches :

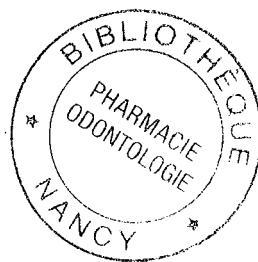
A mes parents qui ont toujours su me soutenir et m'encourager lors de ces longues années d'études,

A ma famille,

A mes amis, qu'ils soient étudiants, internes, pharmaciens ou non et qui m'ont accompagnée et entourée durant mes études,

A Frédéric, pour sa présence à mes côtés.

SOMMAIRE



LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. Généralités sur les vecteurs de principes actifs	4
1. Les vecteurs macromoléculaires	4
2. Les vecteurs corpusculaires	5
21. Les vecteurs de première génération	6
22. Les vecteurs de deuxième génération	6
II. Généralités sur les nanoparticules pour l'administration intraveineuse	9
1. Rappels sur la phagocytose	9
2. Concept des nanoparticules furtives	11
21. Evaluation de la furtivité <i>in vitro</i>	11
22. Evaluation de la furtivité <i>in vivo</i>	27
3. Stratégies de recouvrement des vecteurs particulaires	29
31. Le poly (éthylène glycol) (PEG)	31
32. Poloxamères et poloxamines	34
33. Le poly(oxyde d'éthylène) (POE)	35
34. Les polysaccharides	37
III. Les médicaments à effet prolongé	40
1. Les interférons pegylés	41
11. VIRAFERONPEG® 50, 80, 100, 120, 150 µg	41
12. PEGASYS® 135 ou 180 µg/0,5 mL	41
2. CAELYX® 2 mg/mL	41
3. ONCASPAR® 750 UI/mL	42
4. NEULASTA® 6 mg/0,6 mL	43
5. PURICASE®	43
6. PEG-GM-CSF	44
HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	46
TRAVAIL EXPÉRIMENTAL	47
I. Matériel et méthodes	47
1. Matières premières	47
11. Les principes actifs	47
12. Les polymères	48
13. L'agent tensio-actif : l'alcool polyvinyle (PVA)	49
2. Préparations des nanoparticules par double émulsion	49
22. Préparation de nanoparticules non furtives	51
3. Caractérisation des nanoparticules	51
31. Rendement de la préparation	51
32. Taille et potentiel zéta des nanoparticules	51
33. Taux d'encapsulation et de fixation	51
34. Charge en principe actif	53
4. Essai de libération <i>in vitro</i>	54

5. Etude in vivo	55
51. Méthodologie	55
52. Dosage plasmatique du chlorhydrate de propranolol.....	56
53. Dosage plasmatique de l'héparine.....	58
II. Résultats	59
1. Caractérisation des nanoparticules	59
11. Rendement de la préparation	59
12. Diamètre et potentiel zéta	59
13. Taux d'encapsulation et de fixation.....	60
14. Charge en principe actif.....	61
2. Essai de libération in vitro	62
21. Cas du chlorhydrate de propranolol.....	62
22. Cas de l'héparine	63
3. Etude in vivo	64
31. Cas du chlorhydrate de propranolol.....	64
32. Cas de l'héparine	67
DISCUSSION	68
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	72
BIBLIOGRAPHIE	73

LISTE DES FIGURES

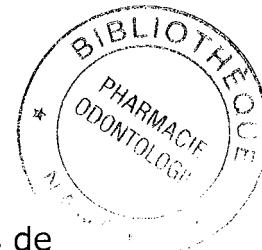


Figure 1 : Représentation schématique des différentes formes de nanoparticules.....	8
Figure 2 : Représentation schématique des différentes étapes de la phagocytose d'une particule opsonisée.....	10
Figure 3 : Consommation de CH50 de nanoparticules de PEG-PIBCA (A), MePEG-PIBCA (B) et de PIBCA (C) en fonction du volume de suspension nanoparticulaire. (D) Activation spontanée du complément. (selon Peracchia et coll. [25])	13
Figure 4 : Représentation schématique d'un gel d'électrophorèse après migration des échantillons.....	15
Figure 5 : Gel de SDS-PAGE de protéines de sérum associées à des nanosphères classiques (à gauche) et des nanosphères recouvertes de SAH (à droite) incubées dans un sérum. (selon Ogawara et coll. [28])	15
Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'acrylamide.....	18
Figure 7 : Quantités totales de protéines adsorbées sur des nanoparticules de PEG-PLA avec différentes masses moléculaires de PEG. La quantité de protéines est exprimée en unités arbitraires (n=2). (selon Gref et coll. [3])	19
Figure 8 : Gels de 2D-PAGE de protéines plasmatiques adsorbées sur des nanoparticules de PLA greffées avec (a) PEG de 2000 Da, (b) PEG de 5000 Da et (c) PEG de 10000 Da. (selon Gref et coll. [3]).....	20
Figure 9 : Quantités totales de protéines adsorbées sur des nanoparticules de PEG-PLA avec différentes proportions de PEG. La quantité de protéines est exprimée en unités arbitraires (n=2). (selon Gref et coll. [3]).....	20
Figure 10 : Représentation schématique de nanoparticules de PCL recouvertes de dextran de 5000 Da (a) et de 40000 Da (b). (selon Lemarchand et coll. [24])	21
Figure 11 : Correlation entre l'indice phagocytaire et le potentiel zéta (dans un tampon phosphate, 5mM, pH 7,2) de nanoparticules dont la surface a été modifiée par de l'albumine en utilisant des cellules U-937 (incubation 60 min en présence de sérum humain) et des macrophages de souris (incubation 60 min sans sérum). (selon Roser et coll. [34])	24
Figure 12 : Capture de nanoparticules chargées en amoxicilline (A1) nues, (A2) greffées avec du PEG 2000 Da et (A4) avec du PEG 4000 Da, par des macrophages murins. Les résultats sont exprimés en pourcentage de nanoparticules phagocytées comparativement au lot A1 fixé à 100 % \pm écart-type. *Statistiquement différent de A1 à $p<0,01$. (selon Fontana et coll. [35]).....	25
Figure 13 : Relation entre le potentiel zéta et la phagocytose de particules de polystyrène greffées avec du mPEG (la capture des particules non recouvertes étant considérée comme 100 %). (selon Gbadamosi et coll. [26])	26

Figure 14 : Radioactivité détectée dans le sang en fonction du temps après injection intraveineuse de nanoparticules furtives de poly méthoxyéthylèneglycol cyanoacrylate-co-n-hexadécyl cyanoacrylate (PEG-PHDCA) ou non furtives de polyhexadécyl cyanoacrylate (PHDCA). n=6. Moyenne \pm écart-type. (c) P<0,01 par rapport aux particules de PHDCA. (selon Huang et coll. [36])	28
Figure 15 : Représentation schématique d'une nanoparticule constituée d'un polymère hydrophobe et recouverte par un polymère hydrophile.....	29
Figure 16 : Interactions entre une protéine et une surface hydrophobe recouverte de chaînes de polymère hydrophile.	30
Figure 17 : Formule chimique du poly (éthylène glycol).....	31
Figure 18 : Nanoparticules de PIBCA recouvertes de PEG, avec différentes configurations de PEG en fonction de la structure chimique (A : PEG ; B : MePEG). (selon Peracchia et coll. [25]).....	32
Figure 19 : Distribution de BSA marquée à ^{125}I 3h (A) et 12h (B) après injection intraveineuse de nanoparticules de PLGA et de PEG-PLGA. (selon Li et coll. [45])	33
Figure 20 : Répartition de la ^{111}In -oxine libre et des nanoparticules de poly(organophosphazène) (PF) recouvertes de poloxamine 908 ou d'un copolymère de poly(organophosphazène)-POE (PF-POE ₅₀₀₀) 3h après injection intraveineuse à des rats. (selon Vandorpe et coll. [49])	36
Figure 21 : Pourcentage de granulocytes fluorescents après administration intravasculaire de nanoparticules fluorescentes de PLA et de MPOE-PLA/PLA (75/25) à des cobayes en fonction du temps (8 mg/kg, n=3). (selon Zambaux et coll. [50])	37
Figure 22 : Concentrations plasmatiques en fonction du temps après injection des suspensions des 3 types de nanoparticules (● : Nanohep, □ : Nanodex, ▲ : PMMA) à des souris. (selon Passirani et coll. [51])	39
Figure 23 : Formule chimique du chlorhydrate de propranolol	47
Figure 24 : Formule chimique d'une héparine de bas poids moléculaire.....	47
Figure 25 : Formule chimique développée de l'Eudragit®RS	48
Figure 26 : Formule chimique développée de la poly- ϵ -caprolactone	48
Figure 27 : Préparation des nanoparticules furtives par la méthode d'évaporation de solvant à partir d'une émulsion H/L/H.....	50
Figure 28 : Gamme d'étalonnage de l'héparine dosée par néphélémétrie ...	52
Figure 29 : Gamme d'étalonnage du dosage du chlorhydrate de propranolol dosé par spectrophotométrie.....	53
Figure 30 : Gamme d'étalonnage de l'activité anti-Xa plasmatique.....	55
Figure 31 : Gamme d'étalonnage du dosage plasmatique du chlorhydrate de propranolol.....	57
Figure 32 : Chromatogramme type du chlorhydrate de propranolol.....	58
Figure 33 : Cinétiques de libération in vitro du chlorhydrate de propranolol en fonction du temps à partir de NP d'Eudragit® RS/PCL furtives et non furtives. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=3).....	62
Figure 34 : Cinétique de libération in vitro de l'héparine en fonction du temps à partir de NP d'Eudragit® RS/PCL furtives. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=3).....	63

Figure 35 : Evolution chronologique des concentrations plasmatiques de chlorhydrate de propranolol après administration intraveineuse d'une solution de chlorhydrate de propranolol (1 mg/kg) à des lapins. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=4).....	64
Figure 36 : Evolution chronologique des concentrations plasmatiques de chlorhydrate de propranolol après administration intraveineuse de NP d'Eudragit® RS/PCL non furtives (1 mg/kg) à des lapins. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=4).....	65
Figure 37 : Evolution chronologique des concentrations plasmatiques de chlorhydrate de propranolol après administration intraveineuse de NP d'Eudragit® RS/PCL furtives (1 mg/kg) à des lapins. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=4).....	65
Figure 38 : Demi-vie du chlorhydrate de propranolol calculée à partir des profils des concentrations plasmatiques de chlorhydrate de propranolol et de NP d'Eudragit® RS/PCL furtives et non furtives de chlorhydrate de propranolol au cours du temps après administration IV. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=4) (*)Solution et NP non furtives statistiquement différentes à $p<0,05$ de NP furtives.....	66
Figure 39 : Concentrations plasmatiques de l'activité anti-Xa en fonction du temps après administration IV de NP furtives RS/PCL. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=4).....	67

LISTE DES TABLEAUX



Tableau 1 : Classification des vecteurs de médicaments selon Benoit et coll. [16]	5
Tableau 2 : Adsorption des protéines sériques sur des nanoparticules de PEG-PHDCA et de PHDCA incubées dans un sérum murin et quantifiées par BCA. (selon Fang et coll. [29])	16
Tableau 3 : Distribution des nanoparticules de polystyrène recouvertes de poloxamine 3h après injection intraveineuse. (selon Moghimi et coll. [48]) ..	35
Tableau 4 : Médicaments PEGylés disponibles ou en essais cliniques	40
Tableau 5 : Rendement, exprimé en pourcentage, obtenu lors de la préparation de nanoparticules d'Eudragit® RS/PCL (50/50) préparées avec 250 mg de polymères. Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type. (n=3)	59
Tableau 6 : Diamètre moyen, en nm, des nanoparticules d'Eudragit® RS/PCL (50/50). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type. (n=3)	59
Tableau 7 : Potentiel de surface, en mV, des nanoparticules d'Eudragit® RS/PCL (50/50). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type. (n=3)	60
Tableau 8 : Taux d'encapsulation et de fixation, en pourcentage du chlorhydrate de propranolol et de l'héparine dans les nanoparticules d'Eudragit® RS/PCL (50/50). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type. (n=3)	60
Tableau 9 : Charge, en mg/100 mg de NP, en chlorhydrate de propranolol des nanoparticules d'Eudragit® RS/PCL (50/50). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type. (n=3)	61

INTRODUCTION

INTRODUCTION



De nombreuses thérapeutiques utilisent la voie intraveineuse pour l'administration de principes actifs. Les formes galéniques classiques entraînent une distribution de la molécule dans le sang et l'organisme en fonction des propriétés physico-chimiques du principe actif et ne permettent pas un contrôle des taux plasmatiques. En effet, un principe actif injecté dans la circulation sanguine subit aussitôt une élimination par excréition rénale ou biliaire et/ou par métabolisme avec une vitesse variable. Ainsi, un objectif important de la recherche galénique est d'augmenter la durée de vie du principe actif, notamment en l'associant à des vecteurs tels que les particules polymères. L'incorporation de principes actifs dans des vecteurs polymères par encapsulation est largement étudiée aujourd'hui que ce soit en vue d'une administration intraveineuse ou orale [1, 2]. L'une des techniques d'encapsulation consiste en une double émulsion (eau dans huile dans eau). Elle permet en effet d'encapsuler des principes actifs hydrophiles dans des particules polymères hydrophobes.

Les micro- et nanoparticules constituent des formes galéniques innovantes. Elles doivent posséder une demi-vie plasmatique suffisamment longue pour permettre une libération plus ou moins contrôlée du principe actif qu'elles contiennent, entraînant alors une diminution du nombre d'injections à réaliser pour maintenir une concentration plasmatique dans la zone d'efficacité thérapeutique. De plus, elles sont susceptibles d'augmenter la demi-vie du principe actif par le simple fait de le protéger d'une éventuelle inactivation.

Cependant, lors de l'injection intraveineuse de nanoparticules, celles-ci sont rapidement phagocytées par les protéines plasmatiques. Cette phagocytose résulte d'interactions entre les vecteurs nanoparticulaires et certaines molécules présentes dans le sang, particulièrement les opsonines qui activent le système immunitaire. De plus, au contact du sang, la surface artificielle des particules induit une réponse inflammatoire via l'activation du complément par les leucocytes et les plaquettes. Le système phagocytaire mononucléé, particulièrement les cellules de Kupffer mais aussi les macrophages, reconnaissent alors les particules et les phagocytent. L'activation du complément joue un rôle important dans le phénomène d'opsonisation et intervient également dans le processus de reconnaissance par les

macrophages, entraînant la production de médiateurs de l'inflammation responsables de l'élimination des particules.

Face au problème d'opsonisation des nanoparticules par le système phagocytaire mononucléé, il a été envisagé de réduire les interactions entre les particules et les opsonines afin de limiter le phénomène de phagocytose. Deux stratégies ont alors été abordées. La première consiste en la formation d'une barrière stérique hydrophile à la surface des particules. Sachant que les forces d'attraction entre les protéines plasmatiques et un polymère très hydrophile et donc hydraté sont généralement faibles, l'adsorption des protéines sur le polymère est ainsi défavorisée. Différentes équipes ont alors greffé des macromolécules hydrophiles sur les polymères constitutifs des particules afin de créer une couronne périphérique permettant d'empêcher l'adsorption des protéines plasmatiques [3-5]. La seconde approche consiste en l'inhibition de l'activation du complément par greffage en périphérie des particules de molécules capables de réduire l'action du complément [6-8].

La modification de surface des nanoparticules (NP) par le greffage de molécules hydrophiles leur permet donc d'échapper au processus de phagocytose des cellules du système phagocytaire mononucléé (SPM) en leur conférant une certaine furtivité. C'est pour cette raison que ces nouveaux vecteurs de médicaments constitués d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile sont qualifiés de particules furtives.

Notre travail se décompose en deux parties.

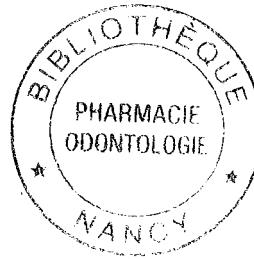
Le premier chapitre, bibliographique, rappelle en premier lieu les bases sur les vecteurs de principes actifs puis traite du devenir des nanoparticules après injection intraveineuse en introduisant les notions de phagocytose, de nanoparticules furtives et en évoquant les différentes stratégies envisagées pour recouvrir les vecteurs particulaires. Nous abordons ensuite les médicaments déjà existants ayant subi une modification de leur structure et qui présentent alors un effet prolongé.

Le second chapitre est consacré au travail expérimental réalisé afin de mettre au point des nanoparticules furtives. Il est divisé en deux sous-parties : tout d'abord les matériels et méthodes utilisés pour les caractérisations *in vitro* et *in vivo* puis les résultats obtenus suite à ces expérimentations.

Finalement, au terme de ce travail, les résultats sont rassemblés et discutés, enfin la conclusion ainsi que les perspectives de ces recherches sont envisagées.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



I. Généralités sur les vecteurs de principes actifs

Par définition, un vecteur est une structure capable de véhiculer un principe actif en modifiant sa distribution tissulaire et/ou cellulaire ou ses interactions avec des cellules cibles. Cette vectorisation permet d'une part d'éviter l'injection directe du médicament dans l'organisme et d'autre part d'améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques du principe actif après encapsulation. On distingue les espèces macromoléculaires solubles et les entités non solubles de nature corpusculaire.

1. Les vecteurs macromoléculaires

L'association d'un principe actif à des macromolécules peut être réalisée de façon covalente ou par interaction physique, ce qui permet alors :

- d'améliorer la stabilité du principe actif
- de ralentir son métabolisme et son excrétion rénale
- de masquer partiellement son antigénicité
- d'améliorer son intensité d'action
- de réduire sa toxicité

Les polymères utilisés comme vecteurs macromoléculaires sont d'origine naturelle comme les polysaccharides ou les protéines, ou synthétiques comme le polyoxyéthylène (POE) ou la polyvinylpyrrolidone (PVP).

La liaison covalente peut être réalisée par exemple entre une fonction amine du principe actif et une fonction carboxylique de la macromolécule. Dans certains cas, la macromolécule doit préalablement être fonctionnalisée ; c'est le cas du dextran porteur essentiellement de fonctions alcools secondaires peu réactives. En contrôlant le type de liaison entre la macromolécule et le principe actif, il est également possible de maîtriser plus ou moins la libération du principe actif et ainsi améliorer sa spécificité d'action [9]. Le principe actif peut être une molécule de petite taille (antibiotiques, anticancéreux) [10, 11] ou de taille supérieure (hormone, oligonucléotides, protéines) [12, 13].

Certains polymères amphiphiles, souvent à base de poly(oxyde d'éthylène) (POE) sont également utilisés pour solubiliser et stabiliser des principes actifs de

nature hydrophobe. Le médicament est alors incorporé dans le cœur des micelles formées en milieu aqueux par l'auto-association avec ces polymères amphiphiles. Dans ce cas, il est nécessaire que les polymères utilisés possèdent de faibles concentrations micellaires critiques afin de maintenir en solution les produits actifs, même après dilution dans le sang. Ainsi, des molécules actives comme la doxorubicine ou encore l'halopéridol ont pu, par exemple, être stabilisées dans des solutions de copolymères séquencés à base de POE [14, 15].

2. Les vecteurs corpusculaires

Les vecteurs corpusculaires sont des réservoirs de principe actif qui servent à l'isoler et à le protéger de l'environnement biologique. Selon Couvreur et coll., les principaux objectifs de la vectorisation sont :

- de protéger le principe actif des dégradations biologiques
- d'améliorer le franchissement de certaines barrières physiologiques et/ou d'augmenter la pénétration intracellulaire vers des sites inaccessibles par simple diffusion
- de permettre un ciblage vers une cible prédéfinie et/ou de détourner le principe actif de certains tissus ou organes pour lesquels il est toxique.

La distinction des vecteurs s'effectue selon 3 critères : la taille, le ciblage envisagé et le mécanisme de vectorisation [16] (tableau 1).

Tableau 1 : Classification des vecteurs de médicaments selon Benoit et coll. [16]

Génération	Première	Deuxième		Troisième
Ciblage	Organes	Tissus		Cellules
Taille	> 1 µm	< 1 µm		< 1 µm
Vecteur	Microsphères Microcapsules Microagrégats	<i>Passifs</i> Liposomes Nanosphères Nanocapsules	<i>Actifs</i> Liposomes Nanosphères Nanocapsules magnétiques ou thermosensibles	Liposomes Nanocapsules Nanosphères pilotées par des molécules de reconnaissance (anticorps, lectines...)
Mécanisme	Embolisation	Capture par le système phagocytaire mononucléé (SPM)		Reconnaissance de la cible

21. Les vecteurs de première génération

Les vecteurs de première génération sont de taille supérieure au micromètre, soit de type matriciel (microsphère), soit de type vésiculaire (microcapsule). Ils sont destinés à être injectés en amont du tissu visé, principalement grâce à l'utilisation de cathéters. La molécule active est alors libérée de manière progressive et peut diffuser dans la cible généralement tumorale : cette technique s'appelle l'embolisation.

22. Les vecteurs de deuxième génération

La modification de la distribution naturelle des vecteurs de première génération vers d'autres organes que le foie et la rate peut être obtenue avec les vecteurs dits de deuxième génération. Ce sont des vecteurs colloïdaux de taille inférieure au micromètre permettant, après administration intraveineuse, un ciblage actif ou passif au niveau tissulaire selon que leur distribution *in vivo* est contrôlée ou non par une intervention extracorporelle (magnétisme, chaleur).

Dans certains cas, la distribution naturelle de ces vecteurs colloïdaux est dirigée vers les organes du système phagocytaire mononucléé (foie, rate et moelle osseuse). Cette distribution naturelle, dirigée majoritairement vers le foie, a été mise à profit pour permettre un ciblage hépatique des médicaments, par exemple dans le cas de traitements des métastases hépatiques par la doxorubicine vectorisée.

Parmi ces vecteurs et selon la nature des éléments les constituant, on distingue les liposomes, les émulsions sèches et les nanoparticules.

o Les liposomes

Ce sont de petites vésicules sphériques dont la paroi est constituée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques délimitant une cavité centrale contenant une phase aqueuse. Ils peuvent véhiculer des principes actifs de nature hydrophile, sous forme dissoute dans la phase aqueuse centrale, ou de nature lipophile par insertion dans la bicouche.

Les liposomes possèdent une bonne biocompatibilité en raison des matières premières dont ils sont constitués (phospholipides naturels, stérols, sphingolipides) et peuvent se comporter comme des formes médicamenteuses à libération modifiée. Cependant, ces structures vésiculaires sont instables chimiquement (oxydation et hydrolyse des phospholipides) et physiquement

(agrégation, fusion et perte du contenu). C'est pourquoi elles sont parfois recouvertes de poly(éthylène glycol) [17] ou de polysaccharides (dextran, chitosane) [18, 19].

- Les émulsions sèches [20]

Ce sont des structures de type réservoir à structure sphérique, dont la paroi est constituée de molécules tensioactives et qui comportent un cœur huileux dans lequel sont solubilisés des principes actifs organosolubles. Les émulsions sèches peuvent être préparées à partir de macromolécules amphiphiles, tels que certaines protéines ou polysaccharides [21]. Elles se présentent sous forme de poudre facilement redispersables et sont capables de reformer les émulsions initiales huile dans eau en présence d'eau.

- Les nanoparticules (figure 1)

Ces vecteurs sont des structures colloïdales de diamètre compris entre 0,01 et 1 μm parmi lesquelles on distingue les nanosphères et les nanocapsules.

Les nanosphères sont des structures matricielles de forme sphérique constituées d'un réseau polymère. Le principe actif est soit dispersé dans le réseau polymère durant la formation des nanosphères, soit adsorbé à leur surface après préparation par l'intermédiaire de liaisons de type hydrophobe, électrostatique ou covalente.

Les nanocapsules sont des structures réservoirs, sphériques, à paroi polymère et comportant un cœur hydrophile ou lipophile. Le principe actif est généralement dissous dans le cœur mais peut également être adsorbé à la surface des nanocapsules.

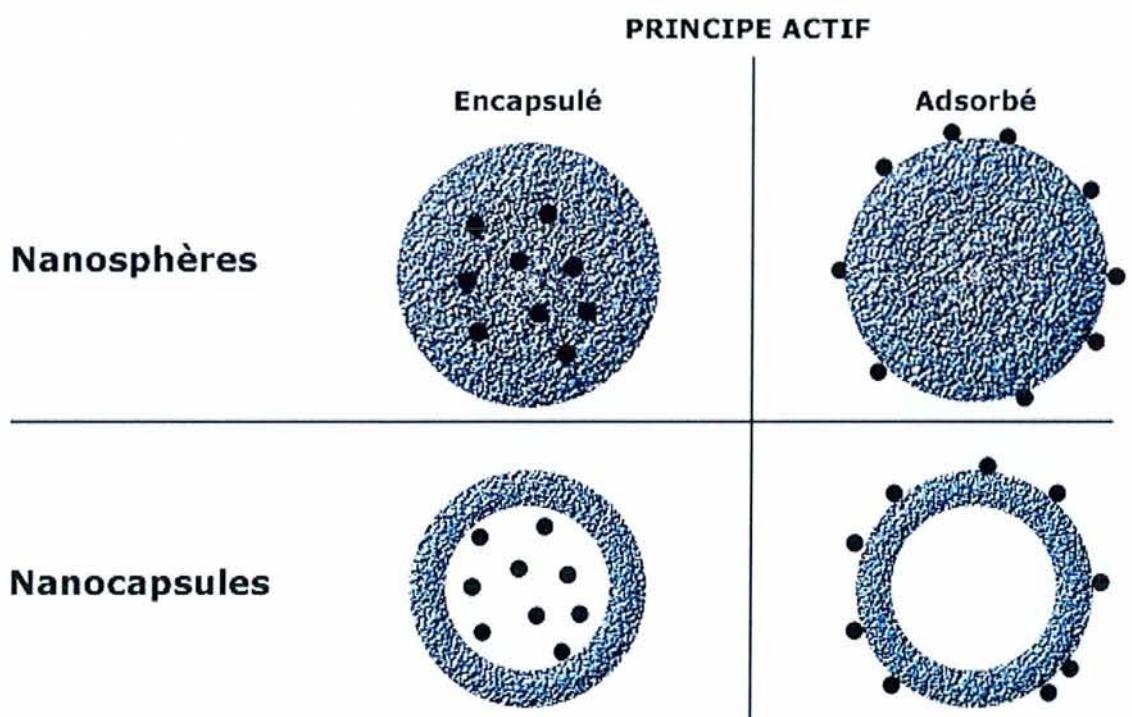


Figure 1 : Représentation schématique des différentes formes de nanoparticules

23. Les vecteurs de troisième génération

Dans le but d'augmenter l'affinité des vecteurs pour un type tissulaire ou cellulaire défini, la notion d'adressage moléculaire orienté vers des marqueurs spécifiques est apparue. Les vecteurs de troisième génération présentent la particularité de porter un système de ciblage cellulaire spécifique. Ainsi, ils correspondent à des vecteurs de deuxième génération auxquels a été fixé un élément de reconnaissance particulier pour la cible visée, le plus souvent des anticorps monoclonaux.

Ces vecteurs peuvent être utilisés dans les traitements anticancéreux. Dans ce cas, les marqueurs spécifiques peuvent être constitués par des protéines cellulaires de surface qui ne sont pas exprimées sur les cellules saines ou par des protéines qui sont surexprimées lorsque la cellule devient cancéreuse.

Le ciblage de ces marqueurs spécifiques peut être réalisé par

- des anticorps (le plus souvent monoclonaux [22])
- des sucres (interaction avec les lectines par exemple)
- des hormones ou facteurs de croissance
- des petites molécules (acide folique par exemple)

II. Généralités sur les nanoparticules pour l'administration intraveineuse

L'efficacité des systèmes nanoparticulaires est limitée par leur clairance rapide de la circulation en raison de la capture des nanoparticules par les cellules du système phagocytaire mononucléé (SPM). Cette capture conduit alors à une courte demi-vie du principe actif entraînant des injections répétées et l'administration de doses importantes.

1. Rappels sur la phagocytose

La phagocytose est le mécanisme par lequel certaines cellules vivantes englobent et digèrent les corps étrangers (bactéries, déchets cellulaires particules, ...). Ces cellules appartiennent à la famille des leucocytes comprenant les polynucléaires neutrophiles ainsi que les monocytes et macrophages. Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules à intervenir lors d'une agression. Dans les heures qui suivent, les monocytes les rejoignent et subissent alors une différenciation en macrophages. Ils vont ensuite persister pendant un laps de temps variable.

Les cellules phagocytaires possèdent une variété de récepteurs pouvant être activés par une particule reconnue comme étrangère ; parmi eux des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et pour la fraction C3b du complément.

La phagocytose se déroule en plusieurs étapes (Figure 2):

- La première étape est la phase de contact et d'adhérence (A et B) qui permet la reconnaissance de la particule comme étrangère et sa fixation à la membrane des cellules du SPM ; elle est facilitée par le phénomène d'opsonisation faisant intervenir des protéines plasmatiques particulières, les opsonines, qui se fixent à la particule et la rendent plus facilement « phagocytable ». Le système du complément joue un rôle important dans la reconnaissance des agents étrangers. Il comprend un nombre important de protéines qui interagissent entre elles par des réactions en cascade. Le système

est activé par la voie classique (réaction antigène-anticorps) ou par la voie alterne (activée par divers composés provenant de bactéries ou de particules étrangères). Ces deux voies ont la propriété d'activer le facteur C3 en C3b qui est une opsonine dont le rôle est d'adhérer aux particules étrangères et permettre leur reconnaissance et leur phagocytose par les cellules phagocytaires pourvues de récepteurs correspondants.

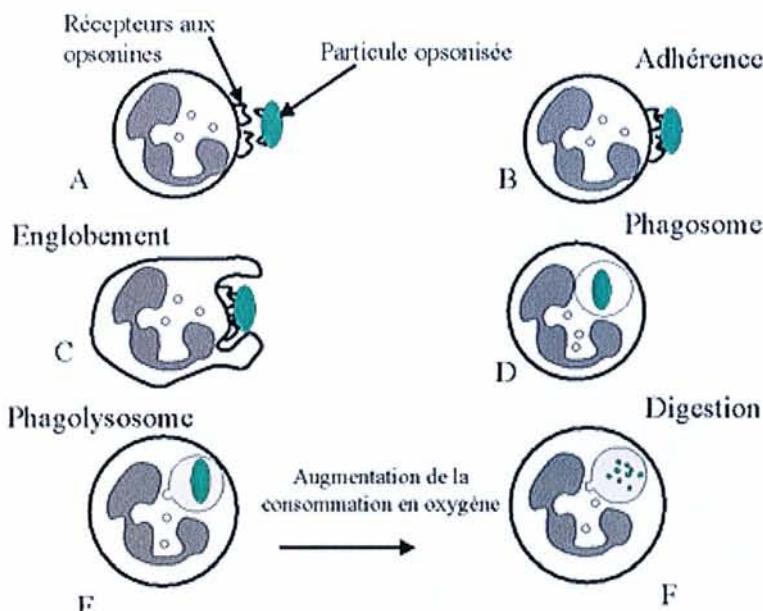


Figure 2 : Représentation schématique des différentes étapes de la phagocytose d'une particule opsonisée.

- La seconde étape est la phase d'internalisation et d'ingestion (C et D). Les particules opsonisées présentent à leur surface des motifs reconnus par les récepteurs Fc des immunoglobulines situés à la surface des cellules phagocytaires. La particule phagocytée est entourée par les pseudopodes émis par la cellule phagocyttaire. Après que les pseudopodes aient capturé et complètement entouré la particule, une fusion membranaire des pseudopodes forme une nouvelle vacuole intracellulaire, le phagosome.

- La dernière étape est la phase de digestion (E et F) qui aboutit à la fin du processus de phagocytose. Elle est consécutive à l'accolement et à la fusion des lysosomes de la cellule avec la membrane du phagosome constituant ainsi un

phagolysosome au sein duquel les divers enzymes vont se déverser et s'attaquer aux divers constituants de la particule, provoquant sa destruction.

2. Concept des nanoparticules furtives

De nombreux systèmes particulaires présentent des propriétés de surface hydrophobes, surtout lorsqu'ils sont constitués de polymères synthétiques. Après leur injection intraveineuse, une fois dans la circulation sanguine, une grande majorité de ces particules est dégradée par le système phagocytaire mononucléé (SPM), diminuant ainsi l'effet thérapeutique du principe actif qu'elles contiennent. Il est apparu très rapidement nécessaire de rendre les nanoparticules invisibles vis-à-vis du SPM. Étant donné que la phagocytose résulte de l'interaction entre les vecteurs nanoparticulaires et les opsonines, il a été envisagé de réduire ces interactions. Pour cela, de nombreux auteurs ont proposé d'élaborer des particules à propriétés de surface contrôlées, dites furtives, en particulier en réalisant des recouvrements hydrophiles et neutres [23].

21. Evaluation de la furtivité *in vitro*

Le potentiel de furtivité des nanoparticules injectées par voie intraveineuse peut se mesurer *in vitro* par leur capacité à activer le système du complément. En effet, l'interaction des nanoparticules avec les protéines du complément joue un rôle essentiel dans leur opsonisation et leur phagocytose, conduisant à leur élimination. Plusieurs techniques sont actuellement utilisées pour évaluer la furtivité *in vitro* : le test du pouvoir hémolytique du sérum ou test du CH50, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines.

211. *Le test du CH50*

Il s'agit d'un test hémolytique basé sur le principe d'activation de la voie classique et de la voie finale commune d'activation du complément. Le CH50 est la plus petite quantité de sérum capable d'entraîner la lyse de 50 % d'une suspension d'hématies de mouton sensibilisées par des anticorps anti-hématies. Pour estimer la variation du CH50 en présence de particules pendant un temps d'incubation déterminé, différentes quantités de particules sont mises en contact avec du sérum humain normal (SHN) et incubées à 37°C sous agitation douce.

Plus les particules sont activatrices, plus la quantité de protéines adsorbées est importante. Une quantité connue d'érythrocytes de mouton sensibilisés est ensuite ajoutée dans le milieu d'incubation. Les érythrocytes sensibilisés non adsorbés sur les particules sont alors lysés par les protéines du complément contenues dans le SHN restant libres dans le milieu d'incubation. Cette hémolyse est mesurée par densité optique à 415 nm comparativement à un sérum contrôle. Plus les nanoparticules sont activatrices, moins il reste de protéines du complément libres dans le milieu et moins l'hémolyse est importante. On observe alors une diminution du CH50. Les résultats obtenus sont exprimés en consommation d'unités de CH50. Pour comparer des particules de différents diamètres, les quantités de consommation d'unités de CH50 sont exprimées en fonction de la surface totale des particules.

Passirani et coll. ont démontré que la consommation de CH50 variait en fonction de la taille des particules de poly(méthyl méthacrylate) mises en contact [6]. Plus la surface totale des particules est importante, plus la consommation de CH50 est élevée.

De plus, Lemarchand et coll. ont observé que la nature de la surface des particules influait considérablement sur la consommation de CH50 [24]. Des nanoparticules de poly- ϵ -caprolactone greffées avec du dextran sont plus activatrices du complément que les mêmes particules non modifiées alors qu'elles sont moins activatrices lorsqu'elles sont greffées avec du poly(éthylène glycol) (PEG).

La configuration et la densité de la couche de PEG en surface des particules joue aussi un rôle important dans l'activation du complément [25]. Les chaînes de PEG fixées par une seule extrémité sur des nanoparticules de polyisobutylcyanoacrylate (PIBCA) forment une couche plus épaisse et plus flexible que les chaînes fixées par leurs deux extrémités, prévenant ainsi mieux l'opsonisation en minimisant les liaisons avec les protéines (figure 3). Gbadamosi et coll. confirment cette hypothèse en montrant que des nanoparticules greffées avec des molécules de méthoxy-poly(éthylène glycol) (mPEG) sont susceptibles de bloquer les sites d'adsorption des protéines plasmatiques et ainsi diminuer le CH50 [26]. De plus, pour obtenir la suppression de l'activation du complément, une configuration en brosse des chaînes de PEG est préférable.

De même, des nanoparticules d'acide polylactique (PLA) greffées avec du polyoxyde d'éthylène (POE) présentent une consommation de CH50 identique au contrôle tandis que les mêmes particules nues montrent une consommation accrue du complément [5]. Cette consommation varie en fonction de la densité de POE greffé, plus la couche de POE est dense, plus la consommation de CH50 est faible.

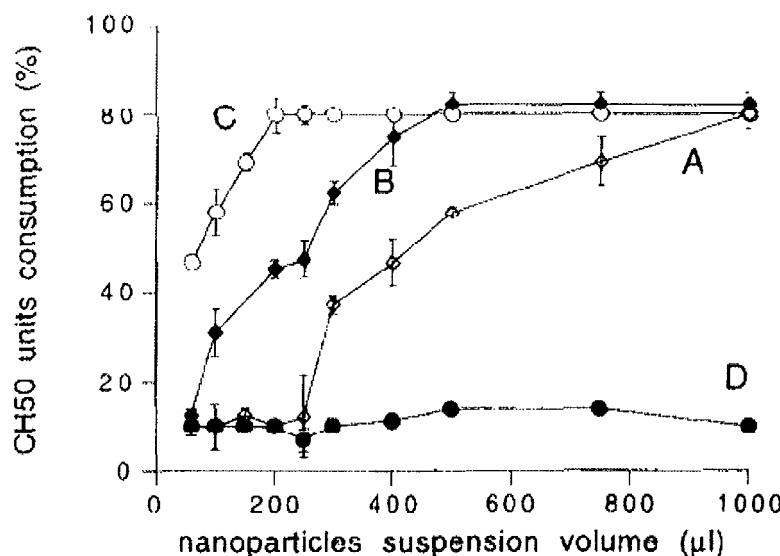


Figure 3 : Consommation de CH50 de nanoparticules de PEG-PIBCA (A), MePEG-PIBCA (B) et de PIBCA (C) en fonction du volume de suspension nanoparticulaire. (D) Activation spontanée du complément. (selon Peracchia et coll. [25])

La technique du test de CH50 est intéressante pour tenter de prévoir la réaction des particules *in vitro* mais elle n'est cependant pas applicable à des vecteurs recouverts de substances inhibant ou favorisant eux-mêmes l'hémolyse.

212. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

La SDS-PAGE est utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les protéines sont dénaturées par du sodium dodécylsulfate (SDS), détergent anionique très fortement chargé. Le SDS déstructure la structure spatiale des protéines sur lesquelles il se fixe, conférant ainsi à toutes les protéines une charge identique. La séparation est alors uniquement fonction de la masse moléculaire dans le gel de polyacrylamide qui se comporte comme

un tamis moléculaire. La charge de l'ensemble molécule dénaturée/SDS (et donc sa vitesse de migration) dépend alors uniquement de la longueur de la chaîne protéique. En l'absence de gel, toutes les protéines ainsi traitées migreraient à la même vitesse. En présence du gel, les protéines se répartissent le long du trajet de migration en fonction de leur masse moléculaire, la migration des protéines de grande taille étant ralentie par rapport aux protéines de petite taille.

Cette technique permet de mesurer l'adsorption des protéines aux vecteurs particulaires. Dans un premier temps, les nanoparticules sont incubées dans un plasma thermostaté à 37°C pendant un temps déterminé. Elles sont ensuite récupérées par centrifugation et lavées plusieurs fois afin d'éliminer les protéines non adsorbées. Les protéines adsorbées sur les nanoparticules sont récupérées par lavage dans une solution de solubilisation contenant du SDS et du dithioérythritol, agent réducteur qui coupe les ponts disulfures. Une quantité déterminée de protéines est alors déposée sur le gel de polyacrylamide et testée par électrophorèse. Des échantillons de protéines de masse moléculaire connue sont également déposés à côté des échantillons à analyser pour permettre d'identifier les bandes obtenues après migration (figure 4).

Pour étudier l'influence des propriétés de surface des nanoparticules sur leur phagocytose, Gaur et coll. ont choisi de suivre la fixation des marqueurs de 185, 66, 52 et 20 kDa correspondant respectivement au fragment C3b du complément, à l'albumine et aux chaînes longues et courtes des immunoglobulines G [27]. Ces opsonines fixées à la surface de particules forment une liaison entre les particules et les macrophages et favorisent leur capture par ces derniers. Les nanoparticules constituées de polyvinylpyrrolidone (PVP), polymère hydrophile, sont capables de limiter la fixation des opsonines, comparativement à celles constituées d'un copolymère de PVP et de *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) ; l'augmentation de la quantité de NIPAAm dans le copolymère se traduisant par l'augmentation de l'hydrophobicité de surface des particules. Cette expérience suggère qu'il existe une relation directe entre le caractère hydrophobe de la surface des particules et le processus d'opsonisation.

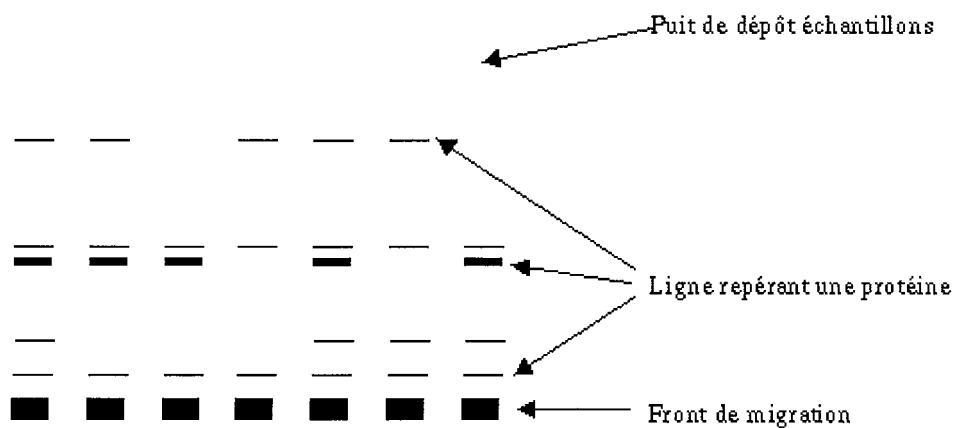


Figure 4 : Représentation schématique d'un gel d'électrophorèse après migration des échantillons.

Les nanosphères préparées par Ogawara et coll. recouvertes ou non de sérum albumine humaine (SAH) et testées en SDS-PAGE présentent des profils d'adsorption de protéines sériques identiques en qualité (figure 5) mais les nanosphères recouvertes de SAH fixent neuf fois moins de protéines sériques au total (excepté pour l'albumine) [28]. Comme les nanosphères classiques fixent davantage de protéines du sérum à leur surface que celles recouvertes de SAH, les auteurs émettent l'hypothèse qu'elles sont sans doute captées plus facilement par le foie via des mécanismes médiés par des récepteurs. De plus, le greffage de SAH (protéine constitutive du sérum présentant une activité de dysopsonine) sur les nanosphères permettrait de réduire leur hydrophobilité et d'altérer l'association des composants du sang, incluant les opsonines, à la surface des particules. Il en résulterait alors une diminution de l'affinité des nanosphères pour le foie et une prolongation de leur temps de circulation.

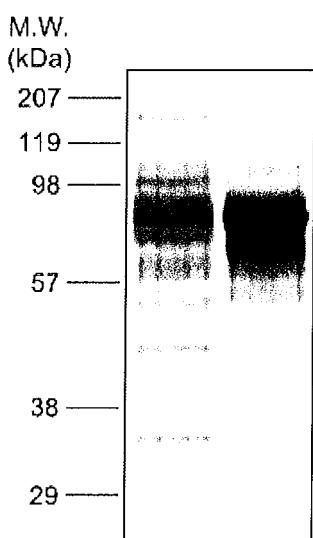


Figure 5 : Gel de SDS-PAGE de protéines de sérum associées à des nanosphères classiques (à gauche) et des nanosphères recouvertes de SAH (à droite) incubées dans un sérum. (selon Ogawara et coll. [28])

Fang et coll. ont préparé des nanoparticules de poly (hexadécyloxyacrylate) (PHDCA) et de poly (méthoxypolyéthylène glycol cyanoacrylate-co-*n*hexadécyloxyacrylate) (PEG-PHDCA) chargées de TNF- α humain recombinant (rHuTNF- α) [29]. Le but du travail était de révéler l'influence de la masse moléculaire du MePEG et de la taille des particules sur l'adsorption des protéines aux nanoparticules *in vitro* (tableau 2). La SDS-PAGE montre que comparativement aux nanoparticules de PHDCA, la quantité de protéines adsorbées sur les nanoparticules de PEG-PHDCA est nettement réduite. De plus, cette quantité dépend fortement de la masse moléculaire du MePEG et de la taille des particules ; les particules comportant un MePEG de 5000 Da et ayant un diamètre moyen de 80 nm ainsi que celle comportant un MePEG de 10000 kDa et de diamètre égal à 169 nm présentent moins de protéines adsorbées à leur surface que les particules plus grosses (172, 243 nm) ou comportant un MePEG de masse moléculaire plus faible (2000 Da). Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les nanoparticules de PHDCA de tailles différentes (85, 173, 242 nm), démontrant que la taille seule des particules ne permet pas d'expliquer les différences de comportement des particules vis-à-vis des protéines sériques. Ici, le rôle de la densité de la couche de MePEG est essentiel. En effet la masse moléculaire de MePEG greffé sur le polymère constitutif des particules joue un rôle important sur l'épaisseur de la couche aqueuse et la distance entre les chaînes de MePEG, deux facteurs essentiels pour la recherche de particules pouvant éviter le SPM.

Tableau 2 : Adsorption des protéines sériques sur des nanoparticules de PEG-PHDCA et de PHDCA incubées dans un sérum murin et quantifiées par BCA. (selon Fang et coll. [29])

Table 2 – The adsorption of serum proteins to PEG-PHDCA and PHDCA nanoparticles incubated in murine serum and quantified by BCA assay

Nanoparticles	Protein adsorbed (%)
PEG ₅₀₀₀ -PHDCA (243 nm)	34
PEG ₅₀₀₀ -PHDCA (171 nm)	23
PEG ₅₀₀₀ -PHDCA (80 nm)	6
PEG ₂₀₀₀ -PHDCA (172 nm)	29
PEG ₁₀₀₀₀ -PHDCA (169 nm)	9
PHDCA (242 nm)	58
PHDCA (173 nm)	56
PHDCA (85 nm)	57

La SDS-PAGE permet donc d'évaluer qualitativement les interactions entre des particules présentant des surfaces modifiées et les protéines du sérum in vitro et ainsi tenter de prévoir leur devenir in vivo face aux macrophages du SPM.

213. L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'acrylamide (2D-PAGE) (Figure 6)

La méthode d'analyse la plus fine d'un mélange complexe de protéines est l'électrophorèse bidimensionnelle (E2D), développée initialement par O'Farrel [30]. Il s'agit de la combinaison d'une électrofocalisation isoélectrique (FIE) qui sépare selon le point isoélectrique (pI) dans un gradient de pH, suivie d'une électrophorèse dénaturante au SDS (sodium dodécyl sulfate), séparant selon la masse moléculaire. Dans un premier temps, le mélange est séparé selon le pI dans un gel de polyacrylamide cylindrique ou plat comportant un gradient de pH. La bande verticale du gel plat ou le cylindre de gel sont récupérés et incubés dans un tampon contenant les éléments du gel d'un système dénaturant au SDS. Cette bande est déposée sur un gel d'électrophorèse, permettant une séparation selon la masse moléculaire. La révélation est effectuée au nitrate d'argent. Les spots de protéines sont ensuite identifiés par comparaison avec une banque de données correspondant au plasma utilisé. Cette approche permet donc de séparer un mélange selon deux paramètres complètement indépendants. Ainsi, une FIE ou une SDS-PAGE peuvent séparer environ 60 à 100 composantes. Combinant ces deux méthodes lors d'une électrophorèse bidimensionnelle, on peut résoudre au-delà de 1000 polypeptides.

Blunck et coll. ont adapté cette technique aux vecteurs colloïdaux dans le but de déterminer qualitativement et semi quantitativement l'adsorption des protéines plasmatiques sur des nanoparticules [31]. La préparation des échantillons à analyser se fait de la même manière que pour la SDS-PAGE. Comme chaque protéine révélée par la 2D-PAGE possède ses propres caractéristiques (point isoélectrique et masse moléculaire), les protéines fixées sur les particules peuvent être identifiées en routine par comparaison avec des gels obtenus à partir d'une 2D-PAGE des protéines de plasma humain. Les protéines majoritairement analysées en électrophorèse bidimensionnelle sont l'albumine, les immunoglobulines (IgG - chaînes lourdes et chaînes légères, IgM),

les apolipoprotéines (Apo A-I, A-IV, C-II, C-III, J, E) et le fibrinogène. Les IgG sont connues comme des protéines opsonisantes et pourraient donc affecter la demi-vie des particules après injection intraveineuse.

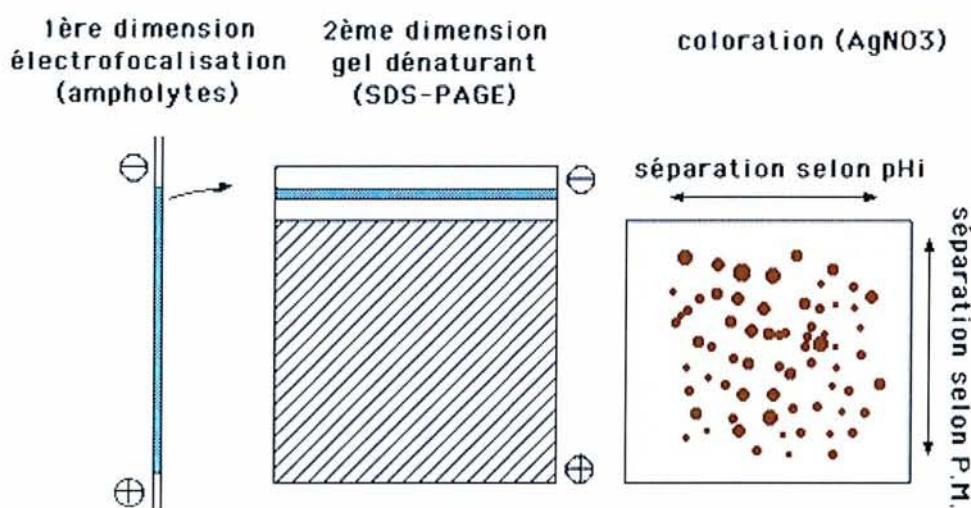


Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'acrylamide.

Peracchia et coll. ont effectué une analyse avec des nanoparticules de polyhexadécylcynoacrylate (PHDCA) et leurs équivalents PEGylés avec différents ratio de PEG (1 : 2 ou 1 : 5) [4]. Les profils d'adsorption protéiques sont semblables pour les 3 formulations mais la quantité totale de protéines adsorbées ainsi que le nombre de protéines différentes changent distinctement entre les particules PEGylées et les non-PEGylées. Comme on peut s'y attendre, le nombre de spots et la quantité totale de protéines diminuent quand la quantité de PEG en surface augmente. La surface présentant des chaînes alkyl hydrophobes (PHDCA) fixe beaucoup plus les chaînes lourdes que les chaînes légères d'IgG, respectivement 43,5 % et 21,5 % des protéines totales. Cette quantité diminue quand on augmente la proportion de PEG entrant dans la composition du polymère : 26 % de chaînes lourdes et 9,6 % de chaînes légères pour le ration 1 : 2. Cependant, la quantité d'apolipoprotéines augmente lors de l'introduction de PEG à la surface des particules, pour le ratio 1 : 5, surtout l'Apo A-I et l'Apo C-III pour le ratio 1 : 2. Cette analyse a donc montré des propriétés d'évitement des protéines par les particules de PHDCA PEGylées.

Gref et coll. ont étudié quant à eux l'influence de la longueur des chaînes de PEG, donc de leur masse moléculaire et de leur densité à la surface des particules sur l'adsorption des protéines [3]. Les nanoparticules étudiées étaient constituées de PLA greffé ou non de PEG de longueurs de chaînes différentes. L'addition de PEG de 2000 Da sur le PLA diminue la quantité de protéines plasmatiques fixées de 57 % (figure 7). Si on considère un PEG de 5000 Da, cette quantité est encore diminuée de moitié. Cependant, augmenter la masse moléculaire du PEG au-delà de 5000 a peu d'effet sur la quantité de protéines fixées.

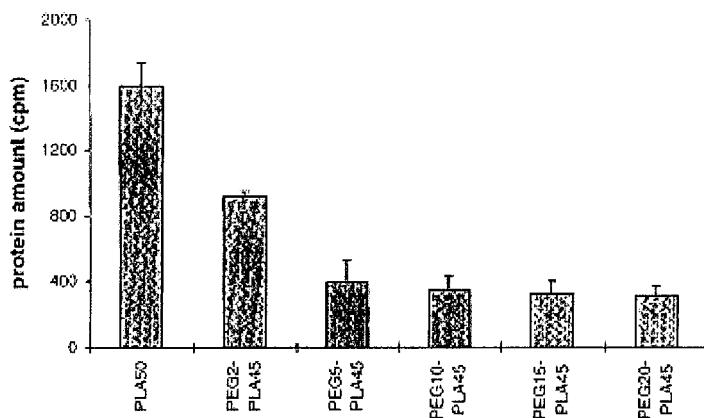


Figure 7 : Quantités totales de protéines adsorbées sur des nanoparticules de PEG-PLA avec différentes masses moléculaires de PEG. La quantité de protéines est exprimée en unités arbitraires (n=2). (selon Gref et coll. [3])

En effet, l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des particules ne peut pas être totalement inhibée parce que toute la surface de la particule n'est jamais recouverte entièrement par les chaînes de PEG. Certaines parties hydrophobes de la surface ne sont alors pas protégées par le PEG et peuvent alors interagir avec les protéines plasmatiques. Qualitativement, les profils des électrophorèses bidimensionnelles effectuées pour les différentes formulations sont similaires (figure 8). On note une réduction de la fixation d'Apo E par des chaînes longues de PEG, de même pour les IgG, le fibrinogène et l'Apo J. Cependant, pour d'autres protéines comme l'Apo A-IV et l'Apo C-III, la réduction maximale d'adsorption s'observe avec le PEG de 5000 Da et l'augmentation de la masse moléculaire du PEG n'a pas d'influence. Ainsi, l'existence de seuils exigés pour la réduction maximale d'adsorption dépendant des espèces protéiques pour les longues chaînes de PEG a pu être démontrée.

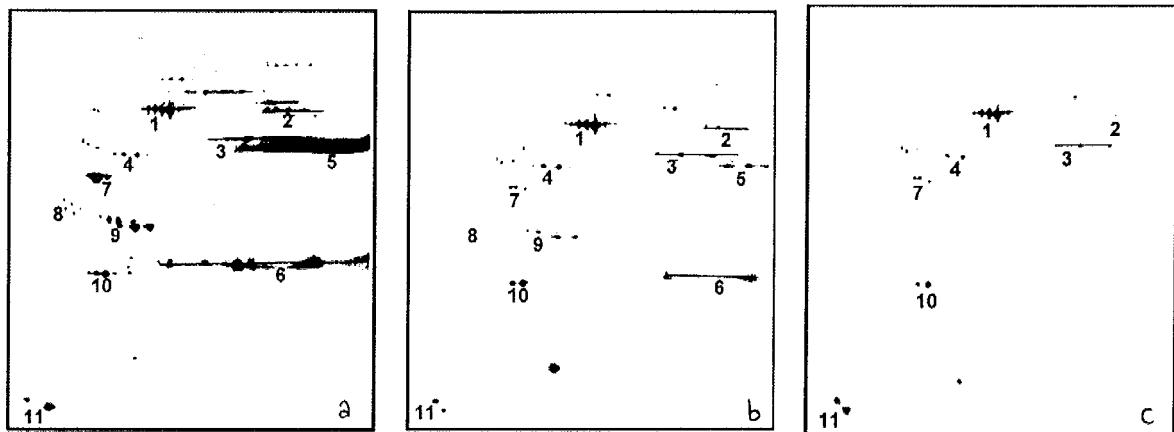


Figure 8 : Gels de 2D-PAGE de protéines plasmatiques adsorbées sur des nanoparticules de PLA greffées avec (a) PEG de 2000 Da, (b) PEG de 5000 Da et (c) PEG de 10000 Da. (selon Gref et coll. [3])

Le PEG de masse moléculaire 5000 Da semblant être le seuil pour la réduction maximale de l'adsorption protéique, il a été choisi afin d'évaluer l'influence de la densité de PEG en surface des particules, sa proportion dans la composition du polymère utilisé variant de 0,5 à 20 %. Avec 0,5 % de PEG, la quantité totale de protéines adsorbées diminue de moitié par rapport aux particules de PLA de référence (figure 9). Les particules contenant 5 % de PEG fixent encore trois fois moins de protéines que celles comportant un PEG de plus faible densité. Cependant, lorsqu'on augmente encore la proportion de PEG dans le polymère, la quantité de protéines fixées ne varie plus. Comme expliqué précédemment, l'adsorption des protéines ne peut pas être bloquée totalement. La réduction la plus importante s'observe pour l'Apo E, les IgG et l'Apo C-III. En résumé, l'étude de Gref et coll. montre que l'efficacité optimale pour réduire l'adsorption protéique sur les nanoparticules est obtenue avec le greffage de PEG de 5000 kDa dans une proportion située entre 2 et 5 % de polymère PEGylé par rapport à la masse totale de polymère.

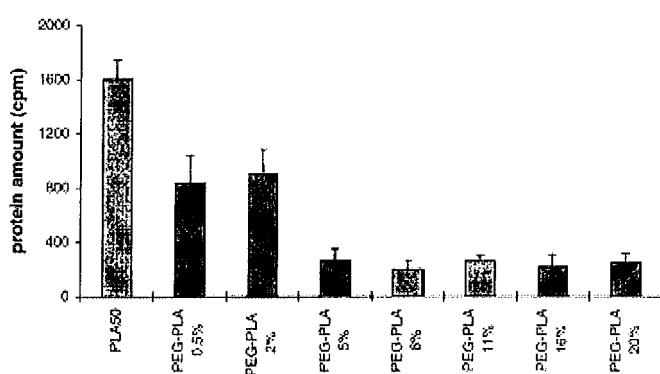


Figure 9 : Quantités totales de protéines adsorbées sur des nanoparticules de PEG-PLA avec différentes proportions de PEG. La quantité de protéines est exprimée en unités arbitraires (n=2). (selon Gref et coll. [3])

Le greffage de dextran à la surface des particules permettrait également de limiter la fixation des protéines plasmatiques [24]. Une réduction de 56 % de fixation des chaînes longues et légères d'IgG est observée entre des particules de PCL et les mêmes particules greffées avec du dextran. La masse moléculaire du dextran joue également un rôle puisque un dextran de 40000 Da permet de fixer 2,6 fois moins de protéines plasmatiques sur les particules par rapport à un dextran de 5000 Da. Cette différence pourrait être attribuée à la conformation et à la mobilité du dextran à la surface des particules, le dextran de 40000 Da formant des boucles plus grandes et plus flexibles que le dextran 5000 qui est dense et rigide (figure 10).

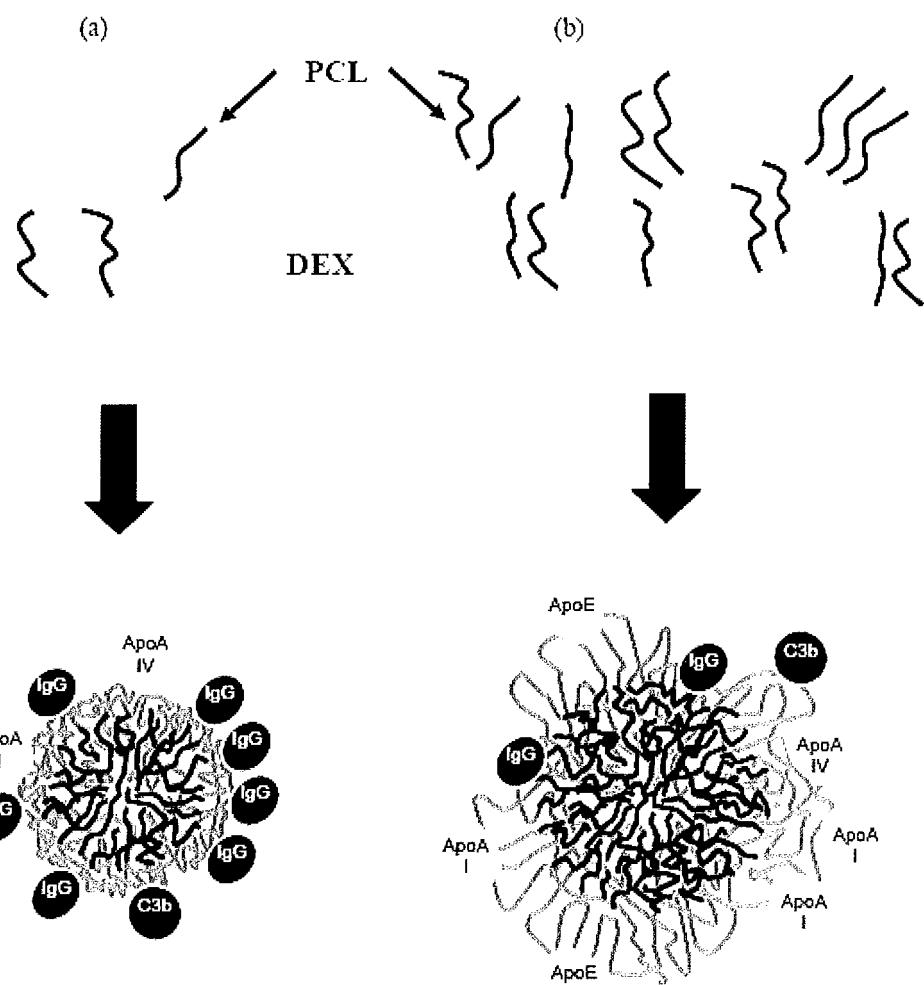


Figure 10 : Représentation schématique de nanoparticules de PCL recouvertes de dextran de 5000 Da (a) et de 40000 Da (b). (selon Lemarchand et coll. [24])

Labarre et coll. confirment cette hypothèse avec la fabrication de particules recouvertes de dextran de différentes natures [32]. La conclusion de ces travaux démontre que l'effet protecteur contre l'adsorption des protéines plasmatiques par répulsion stérique dépend de la conformation et de la masse moléculaire des chaînes de dextran. La conformation la plus efficace est obtenue pour les plus longues chaînes qui s'organisent en brosse, tandis que les chaînes courtes organisées en boucles ou en trains sont plutôt inefficaces.

L'électrophorèse bidimensionnelle permet donc d'évaluer qualitativement et semi quantitativement les protéines plasmatiques adsorbées en surface des particules et de démontrer le caractère furtif de certaines d'entre elles par diminution du nombre et de l'importance des taches observées sur le gel d'électrophorèse.

214. Interaction avec les cellules phagocytaires

Une autre technique *in vitro* permet de mettre en évidence le changement de comportement des particules modifiées vis-à-vis du système phagocytaire mononucléé. Cette méthode consiste à mettre les particules directement en présence des cellules phagocytaires et, après un temps d'incubation déterminé, d'évaluer la quantité de particules internalisées par les cellules. Les lignées cellulaires le plus couramment utilisées sont les macrophages murins J774 A12, les macrophages humains THP 1 et les cellules U 937. Les cellules sont mises en culture et incubées à 37°C dans des puits. Puis elles sont lavées afin de supprimer les cellules non adhérentes et incubées à nouveau dans un milieu de culture sélectionné. Le nombre de cellules par puits est ensuite ajusté et après 24h d'incubation, une quantité connue de particules à étudier est ajoutée dans chaque puits. Après des temps d'incubation déterminés, les cellules sont lavées et rincées plusieurs fois avec le milieu de culture afin d'éliminer les particules non phagocytées. L'intensité de la phagocytose est mesurée par la concentration de particules internalisées dans les cellules phagocytaires. Afin de détecter les particules phagocytées, celles-ci sont marquées le plus souvent par un marqueur fluorescent ou un isotope radioactif et détectées respectivement par microscopie à fluorescence et spectrofluorimétrie ou par un compteur gamma. Dans le cas de particules chargées avec un principe actif, leur phagocytose se mesure par la détection du principe actif dans les cellules phagocytaires après avoir vérifié la quantité de principe actif non encapsulé ayant pu être phagocyté.

Le greffage de PEG à la surface des vecteurs particulaires permet de limiter la phagocytose. En effet, Bocca et coll. ont mesuré la phagocytose de SLN (particules lipidiques solides) rendues fluorescentes par marquage à la rhodamine B [33]. La phagocytose des SLN classiques par les macrophages augmente entre 2 et 60 min tandis que lorsqu'elles sont recouvertes de PEG, leur capture est beaucoup plus faible et plus lente. L'inhibition de la phagocytose semble aussi dépendre des sels biliaires utilisés dans la fabrication des SLN. Celle-ci est la plus marquée en présence de stéarate de PEG : durant les premières minutes de l'expérience, la capture par les macrophages est très lente et indétectable par fluorescence. Cependant, dans les conditions expérimentales utilisées, l'augmentation de la phagocytose n'est pas linéaire et semble démontrer qu'il existe une saturation. La diminution de phagocytose des SLN furtives dépend donc de la présence de PEG en surface des particules, formant un nuage hydrophile capable de limiter la reconnaissance des particules par les macrophages.

La mesure de l'indice phagocytique permet d'évaluer les interactions des cellules phagocytaires avec les vecteurs particulaires ; il représente le nombre moyen de particules ingérées par cellule. Roser et coll. ont démontré une bonne corrélation entre la stimulation des macrophages et le potentiel zêta des particules : plus la valeur absolue de la charge de surface est faible, plus l'activité de phagocytose est faible. Une augmentation de la réponse phagocyttaire est observée en utilisant des particules avec un potentiel de surface élevé et positif [34]. En effet, l'indice phagocytique diminue à mesure que le potentiel zêta se rapproche de la neutralité, et ceci autant avec les cellules U 937 qu'avec les macrophages murins (figure 11).

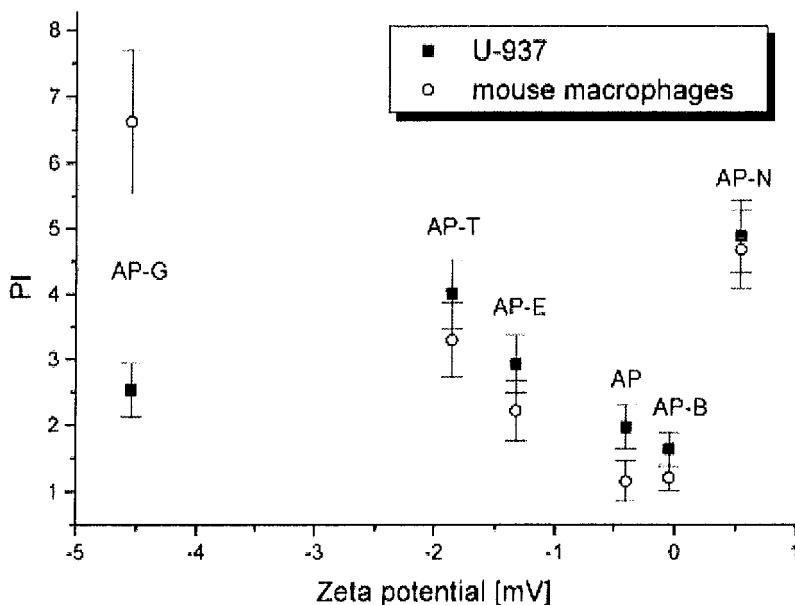


Figure 11 : Correlation entre l'indice phagocytique et le potentiel zéta (dans un tampon phosphate, 5mM, pH 7,2) de nanoparticules dont la surface a été modifiée par de l'albumine en utilisant des cellules U-937 (incubation 60 min en présence de sérum humain) et des macrophages de souris (incubation 60 min sans sérum). (selon Roser et coll. [34])

L'évaluation de la phagocytose de nanoparticules par les macrophages peut également se faire par la recherche de la molécule encapsulée dans les particules qui se retrouve alors contenue dans les macrophages après phagocytose. Fontana et coll. ont fabriqué des nanoparticules de polyéthylcyanoacrylate (PECA) chargées d'amoxicilline et greffées ou non de PEG de différentes masses moléculaires [35]. La quantité de particules phagocytées par les macrophages murins J774 a été déterminée en dosant l'amoxicilline contenue dans les macrophages par HPLC après incubation avec les particules. On note que le processus de phagocytose diminue au fur et à mesure que la masse moléculaire du PEG adsorbé sur la surface des nanoparticules de PECA augmente (figure 12). Parallèlement, l'ajout de PEG de 600 à 4000 Da montre une augmentation croissante du potentiel de surface des particules de -18 mV pour les particules non PEGylées à -5 mV pour les particules comportant le PEG de plus grande masse moléculaire, confortant l'idée qu'un potentiel de surface proche de la neutralité est favorable à une diminution de la phagocytose des particules.

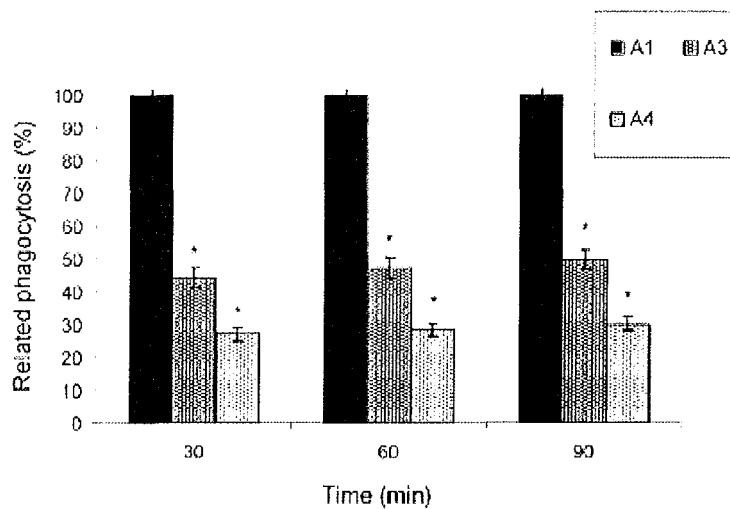


Figure 12 : Capture de nanoparticules chargées en amoxicilline (A1) nues, (A2) greffées avec du PEG 2000 Da et (A4) avec du PEG 4000 Da, par des macrophages murins. Les résultats sont exprimés en pourcentage de nanoparticules phagocytées comparativement au lot A1 fixé à 100 % \pm écart-type. *Statistiquement différent de A1 à $p<0,01$. (selon Fontana et coll. [35])

Gbadamosi et coll. confirment eux aussi cette hypothèse en démontrant une relation linéaire entre le potentiel zéta des particules de polystyrène greffées avec du méthoxy-poly(éthylène glycol) (mPEG) et leur capture par des macrophages murins J774 [26] (figure 13). En effet, plus le potentiel de surface des particules se rapproche de la neutralité, moins celles-ci sont reconnues par les macrophages et internalisées. La présence de PEG en surface des particules semble former un nuage moléculaire de PEG capable de limiter la reconnaissance des particules par les macrophages. Les auteurs émettent alors l'hypothèse que la phagocytose de vecteurs particulaires pourrait être prédictive par la mesure de leur potentiel de surface.

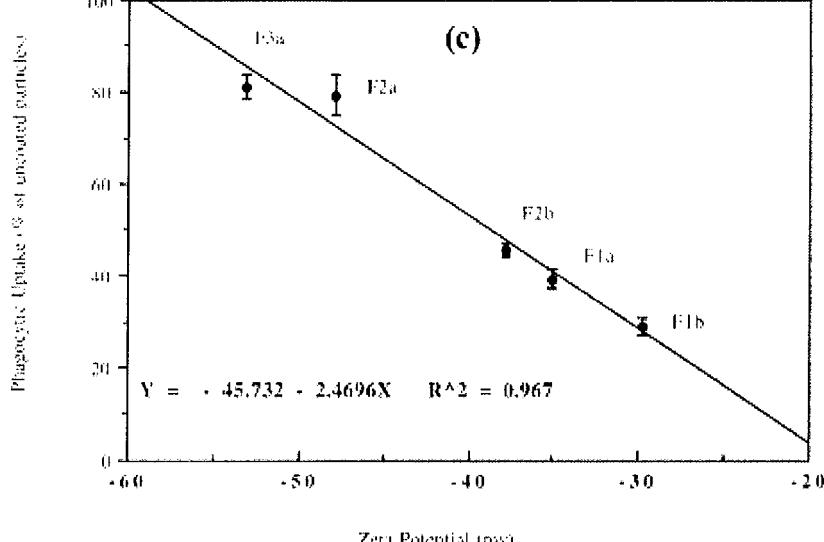


Figure 13 : Relation entre le potentiel zêta et la phagocytose de particules de polystyrène greffées avec du mPEG (la capture des particules non recouvertes étant considérée comme 100 %). (selon Gbadamosi et coll. [26])

Pour Gref et coll., les chaînes protectrices de PEG peuvent masquer les extrémités carboxyliques des chaînes de PLA utilisé pour la fabrication de nanosphères, ayant ainsi pour résultat la réduction du potentiel zêta (de -65 à -5 mV) [3]. La diminution du potentiel zêta peut être attribuée à l'augmentation de l'épaisseur de la barrière de PEG assurant une protection stérique plus efficace des nanoparticules au fur et à mesure que la densité de PEG augmente, limitant ainsi la reconnaissance et l'internalisation des nanoparticules par les cellules phagocytaires.

Lemarchand et coll. ont étudié l'influence de la présence de dextran de différentes masses moléculaires (5000 et 40000 Da) ajouté à plusieurs ratio (de 5 à 33 %) dans la composition de nanoparticules de PCL (poly- ϵ -caprolactone) sur son action vis-à-vis des macrophages murins J774 [24]. Les particules comportant 33 % de dextran dans leur composition sont 3 fois moins capturées que les mêmes particules de PCL simples. Cependant, aucune influence de la masse moléculaire du dextran n'a été observée sur la capture par les macrophages. En effet, la couche de dextran pourrait être responsable de la réduction de l'opsonisation par les protéines dans le milieu de culture et des interactions hydrophobes non spécifiques entre les particules et la membrane cellulaire.

L'observation de l'interaction *in vitro* des vecteurs particulaires avec les cellules du système phagocytaire mononucléé permet donc d'évaluer le potentiel furtif de particules polymériques dont la surface est modifiée par greffage de molécules diverses (PEG, dextran) qui tendent à augmenter l'hydrophilie de surface des particules en masquant le caractère hydrophobe du polymère. Les particules étant moins reconnues *in vitro* par les macrophages, elles seront alors susceptibles d'éviter le SPM *in vivo* et de présenter des propriétés de furtivité permettant d'augmenter leur temps de résidence dans la circulation sanguine. Cependant, ces propriétés *in vitro* ne sont pas toujours corrélées *in vivo*. Roser et coll. ont observé un comportement différent de leurs nanosphères *in vitro* et *in vivo* [34]. En effet, ces nanosphères présentent un échappement à la capture phagocytaire par les macrophages murins J774 *in vitro* mais restent rapidement éliminées après injection intraveineuse à des rats.

22. Evaluation de la furtivité *in vivo*

Après avoir démontré *in vitro* les propriétés d'échappement des vecteurs particulaires par le SPM, il semble nécessaire de confirmer ces propriétés *in vivo*, afin d'attribuer un caractère furtif aux particules après injection intraveineuse. En effet, le comportement *in vitro* de particules à propriétés de surface contrôlées n'est pas obligatoirement vérifié *in vivo* [34]. La circulation sanguine dans laquelle se retrouvent les particules après administration IV met en jeu un système plus complexe que celui créé lors des manipulations *in vitro* et fait intervenir un plus grand nombre de paramètres influençant le devenir de ces particules.

Les expériences *in vivo* sont réalisées le plus souvent chez le rongeur (rat, souris, lapin, cobaye). Après anesthésie de l'animal, une quantité connue de particules en suspension dans un milieu approprié (NaCl 0,9 %, PBS) est injectée dans le système veineux via la veine de la queue ou la veine jugulaire. Des prélèvements de sang sont ensuite effectués à des temps déterminés afin de suivre l'évolution de la présence des particules dans le sang. Les particules injectées sont marquées avec un isotope radioactif (^{125}I) ou une molécule fluorescente (FITC : fluorescéine isothiocyanate) afin d'être facilement détectées dans le sang prélevé après injection intraveineuse. Dans le cas de particules contenant un principe actif, la détection de ce dernier dans les échantillons prélevés permet de suivre son élimination au cours du temps et d'évaluer sa

demi-vie expérimentale in vivo ainsi que d'autres paramètres pharmacocinétiques (Aire sous la courbe : AUC, constante de distribution, constante d'élimination, volume de distribution) à partir de sa concentration sanguine au cours du temps (exemple figure 14).

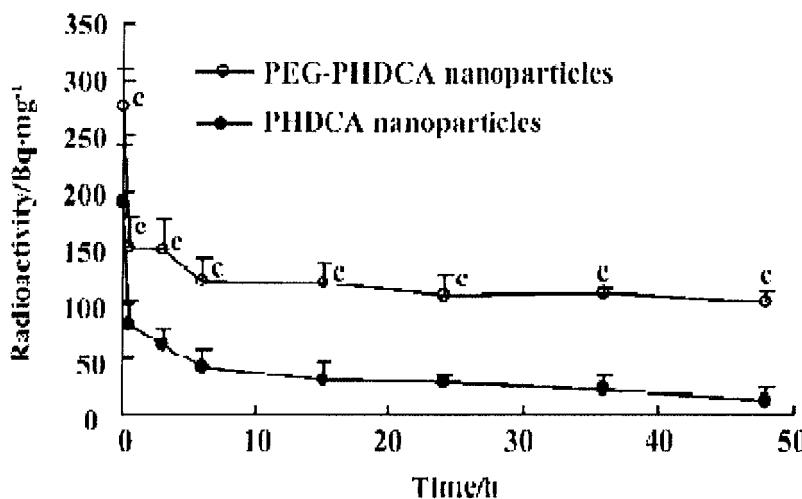


Figure 14 : Radioactivité détectée dans le sang en fonction du temps après injection intraveineuse de nanoparticules furtives de poly méthoxyéthylène glycol cyanoacrylate-co-n-hexadécyl cyanoacrylate (PEG-PHDCA) ou non furtives de polyhexadécyl cyanoacrylate (PHDCA). n=6. Moyenne \pm écart-type. (c) P<0,01 par rapport aux particules de PHDCA. (selon Huang et coll. [36])

Une autre technique est utilisée chez l'animal pour suivre la distribution des particules dans l'organisme. En effet, les propriétés de furtivité devraient empêcher les vecteurs particulaires d'être reconnus par le SPM et phagocytés par les macrophages. Classiquement, lors de l'injection d'une suspension nanoparticulaire, les opsonines, notamment les protéines du complément, les IgG et certaines apolipoprotéines s'adsorbent à la surface des particules, entraînant leur reconnaissance et leur capture par les macrophages [37]. Ces vecteurs présentent alors un temps de demi-vie plasmatique court et s'accumulent très rapidement dans les organes du système phagocytaire mononucléé (foie, rate, poumons) comme n'importe quel organisme étranger. Les particules furtives devraient être moins facilement reconnues comme étrangères par les cellules du système immunitaire et resteraient plus longtemps dans le compartiment sanguin sans être concentrées dans les organes.

Après injection intraveineuse de particules à l'animal et un temps d'attente déterminé, l'animal est sacrifié et ses organes sont alors prélevés (principalement le foie et la rate mais aussi les poumons, les muscles, la moelle osseuse, les intestins, les reins, le pancréas, le cœur) ainsi que son sang total. Ces organes sont ensuite analysés afin d'évaluer la présence ou non de marqueurs fluorescents ou radioactifs dans les particules injectées. Dans le cas où les particules contiennent un principe actif, il suffit simplement de le rechercher dans les organes. Cette analyse permet donc de cartographier la répartition des particules dans tout l'organisme après injection intraveineuse.

3. Stratégies de recouvrement des vecteurs particulaires

En raison du caractère amphiphile de leur surface, les protéines en milieu aqueux s'adsorbent plus ou moins facilement sur la plupart des surfaces solides hydrophobes, grâce à l'établissement d'interactions hydrophobes entre le solide et les segments apolaires de la protéine. Dans le cas de nanoparticules injectées dans la circulation sanguine, l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des particules contribue au processus de phagocytose par les macrophages et donc à l'élimination de celles-ci par le système de défense immunitaire. Une manière efficace pour minimiser ces interactions hydrophobes entre le polymère et les protéines plasmatiques consiste à déposer en surface du solide une couche dense d'un polymère hydrophile et neutre. Les chaînes superficielles jouent alors le rôle d'une barrière stérique qui masque les charges et l'hydrophobie de surface des particules et empêche les protéines de s'y fixer (Figure 15).

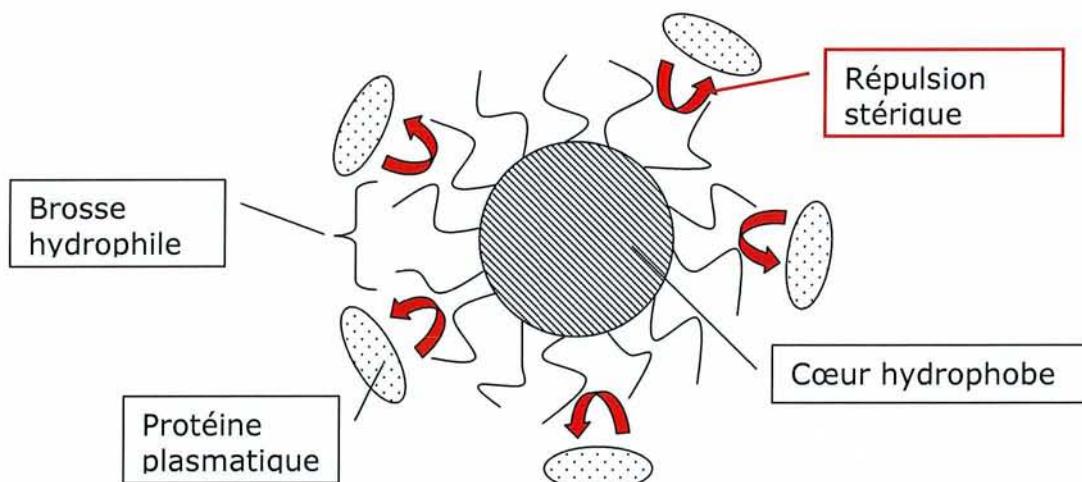


Figure 15 : Représentation schématique d'une nanoparticule constituée d'un polymère hydrophobe et recouverte par un polymère hydrophile.

Les conditions qui conduisent à la répulsion des protéines des surfaces hydrophobes ont été étudiées par Jeon et coll. [38, 39]. Les hypothèses posées par les auteurs sont les suivantes : la protéine est assimilée à une particule sphérique de rayon R , le polymère présente une faible hydrophobicité et la protéine présente une surface hydrophobe. Ils ont alors élaboré un modèle mathématique prenant en compte les quatre types d'interactions entre une protéine et un substrat hydrophobe (Figure 16) : l'attraction hydrophobe entre le substrat et la protéine (a), la répulsion stérique résultant de la constriction des chaînes de polymère (b), l'attraction de Van der Waals entre la protéine et le substrat (c) et l'attraction de Van der Waals entre la protéine et les chaînes de polymère (d). L'approche de la protéine se fait par simple diffusion. Après collision entre la protéine et la surface de la particule, les chaînes de polymère se compriment comme des ressorts. Il a été prouvé que la protection apportée par un polymère hydrophile en surface des particules dépend de la densité de surface de celui-ci, et pour une protéine de rayon donné, il existe une valeur optimale de densité de polymère permettant d'éviter l'adsorption des protéines.

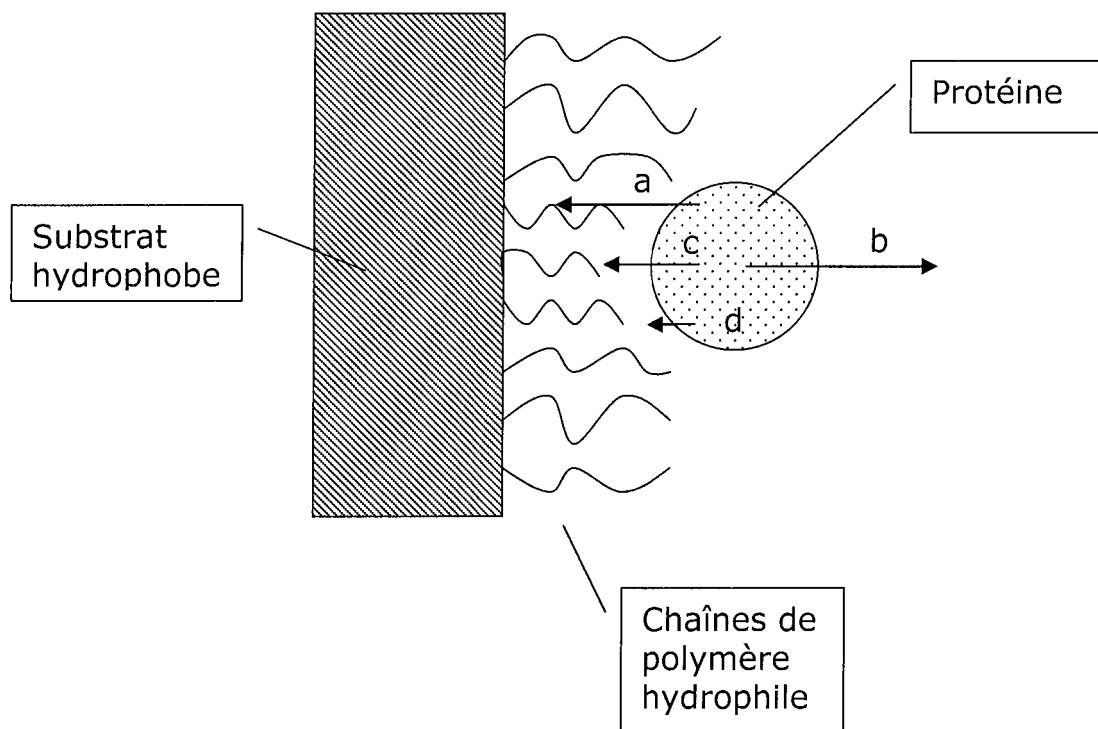


Figure 16 : Interactions entre une protéine et une surface hydrophobe recouverte de chaînes de polymère hydrophile.

Une méthode complémentaire utilisée pour détourner le SPM consiste à inhiber le système du complément en recouvrant la surface des particules avec une molécule capable de limiter son activation et donc de retarder la reconnaissance par le système immunitaire.

Différentes approches ont alors été envisagées afin d'augmenter l'hydrophilie de surface des particules et de masquer les sites nécessaires à l'activation du système du complément. Ces nanoparticules alors appelées furtives sont obtenues par adsorption ou greffage chimique de polymères hydrophiles en leur surface, ou directement durant leur préparation par couplage chimique de polymère hydrophile ou utilisation de copolymères amphiphiles. Certains polysaccharides ont également été testés pour le développement des particules furtives.

31. Le poly (éthylène glycol) (PEG) (Figure 17)

C'est le polymère hydrophile le plus utilisé. C'est un polymère d'oxyde d'éthylène qui se présente sous forme liquide ou semi-solide selon sa masse moléculaire. De nombreuses études ont montré l'effet protecteur du PEG contre la capture des nanoparticules par les macrophages du SPM, tant *in vivo* qu'*in vitro* [40, 41].

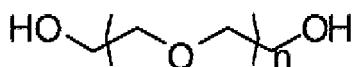


Figure 17 : Formule chimique du poly (éthylène glycol)

311. Greffage de PEG durant la fabrication des nanoparticules

Perecchia et coll. ont élaboré des nanoparticules biodégradables recouvertes de PEG par copolymérisation de PIBCA et de PEG [42]. Des études d'activation du complément ont montré la potentialité de furtivité de nanoparticules de PEG-PIBCA et de MePEG-PIBCA [25]. La différence entre les deux types de PEG réside dans leur attachement à la particule : le groupement méthoxy terminal du MePEG serait lié au PIBCA par un seul groupement OH tandis que dans le cas du PEG, deux groupements OH entreraient en jeu (figure 18). La conformation en brosse du MePEG comparativement à la conformation en champignon du PEG

serait plus favorable à empêcher la fixation des opsonines en formant une couche plus dense et moins compressible.

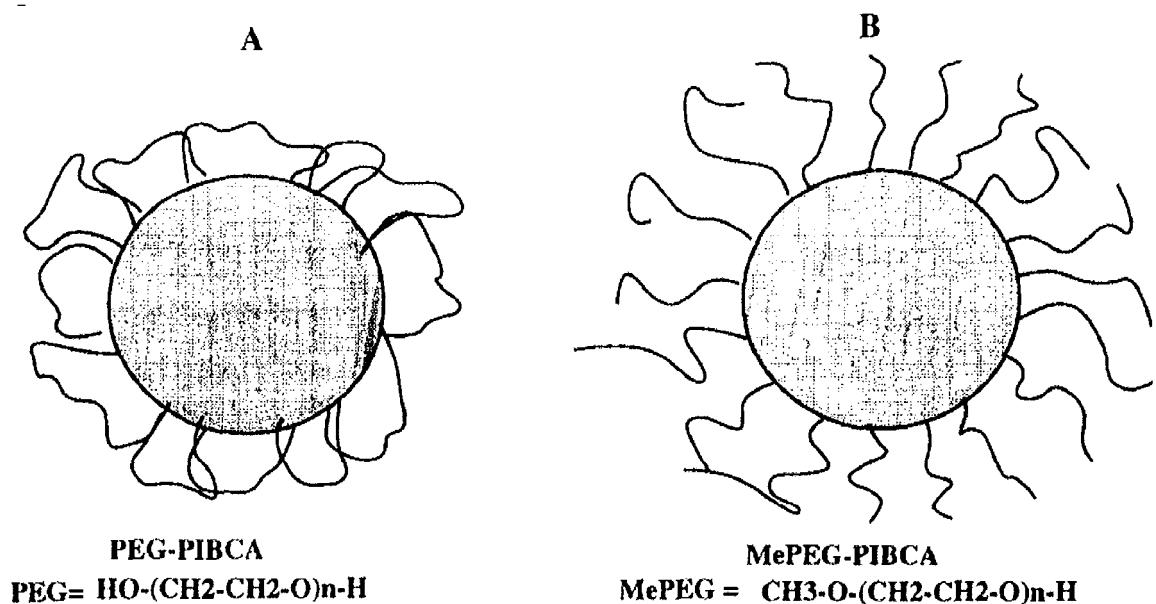


Figure 18 : Nanoparticules de PIBCA recouvertes de PEG, avec différentes configurations de PEG en fonction de la structure chimique (A : PEG ; B : MePEG). (selon Peracchia et coll. [25])

312. Utilisation de copolymères amphiphiles préformés

Les nanoparticules constituées d'un copolymère triséquencé PLA-PEG-PLA obtenu par polymérisation chimique de PEG de différentes masses moléculaires (6600 ou 20000 Da) et en diverses proportions (5 à 25 %) ont été préparées par Nakada et coll. [43]. La progestérone a été utilisée comme principe actif modèle afin d'étudier l'effet des caractéristiques du polymère sur la pharmacocinétique des particules et leur biodistribution. L'incorporation de PEG dans le polymère ainsi que sa concentration au sein de celui-ci permettent de prolonger le temps de résidence sanguine comparativement à une solution de progestérone et donc d'éviter la capture par le SPM. De plus, l'ajout de PEG contribue à augmenter la proportion de particules dans le sang (de 21 à 30 %), et donc à diminuer leur séquestration par le foie (de 23 à 9 %).

Le copolymère biséquencé de PLA-PEG présente les mêmes propriétés [44]. Le principe actif encapsulé dans ces nanoparticules est un nouvel antagoniste de la substance P : IBP 5823 ayant été marqué au ¹⁴C. La présence de PEG dans le polymère permet d'augmenter la demi-vie du principe actif de quelques minutes

à environ 2h30min. Celui-ci se concentre préférentiellement dans le sang et les tissus et son activité biologique est maintenue.

Le copolymère de PEG-PLGA présente lui aussi des caractéristiques semblables. L'encapsulation de BSA (sérum albumine bovine) dans des particules constituées de ce polymère permet, après injection i.v. à des rats, d'augmenter la demi-vie de celle-ci de 13,6 min pour des nanoparticules de PLGA à 4,5 h pour les nanoparticules de PLGA-PEG [45]. De plus, une plus grande proportion de BSA encapsulée dans les particules de PEG-PLGA (environ 10 fois plus) se retrouve dans le sang après 3 h et se distribue lentement dans les tissus après 12 h tout en restant majoritairement dans la circulation sanguine (figure 19).

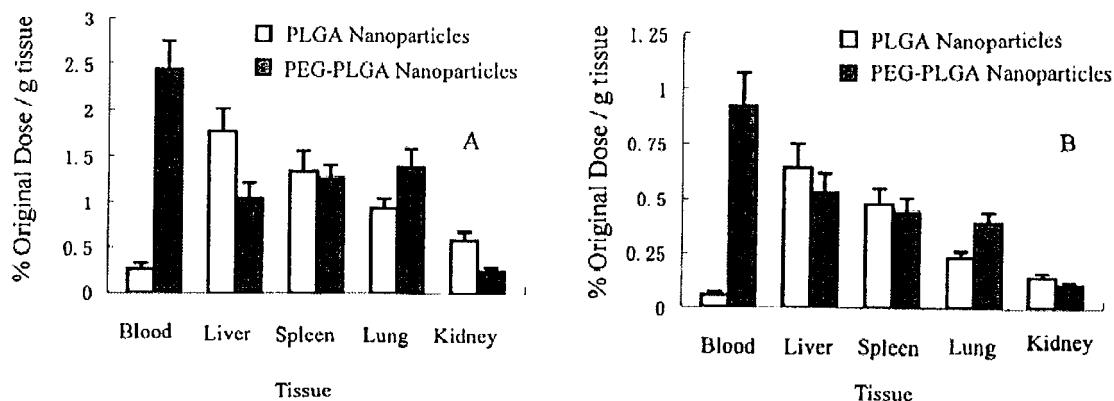


Figure 19 : Distribution de BSA marquée à ^{125}I 3h (A) et 12h (B) après injection intraveineuse de nanoparticules de PLGA et de PEG-PLGA. (selon Li et coll. [45])

Beletsi et coll. ont montré que la proportion de copolymère biséquencé entrant dans la composition des nanoparticules joue un rôle important dans le caractère furtif [41]. En effet, quand cette proportion augmente, on observe une persistance vasculaire des nanoparticules et une diminution de leur concentration dans le foie. Cependant, au-delà de 80 % de PEG₅-PLGA₄₅ (PLGA de 45000 Da et PEG de 5000 Da), cette observation ne se vérifie plus. Il semblerait que les nanoparticules composées de ce mélange soient de taille suffisamment faible (65 nm) pour pénétrer plus facilement dans les tissus, tandis que les particules composées de PEG₅-PLGA₅ (PLGA de 5000 Da et PEG de 5000 Da) de taille légèrement supérieure (96 nm) restent préférentiellement dans le sang. En fait,

pour la même proportion de PEG-PLGA dans le mélange PEG-PLGA/PLGA, la quantité de PEG dans le mélange PEG₅-PLGA₄₅/PLGA est plus faible que dans le mélange PEG₅-PLGA₅/PLGA. Quand la quantité de PEG augmente, on observe une augmentation de la densité de la couche de PEG qui confère une barrière stérique plus efficace.

Shi et coll. ont élaboré des micelles chargées en hydrocamptothécine et constituées de copolymère de MePEG-PCL avec des chaînes de PEG de différentes longueurs (2000, 5000 et 10000 Da) et en plusieurs proportions (1 :2, 1 :4, 1 :6, 1 :8) par rapport à la PCL [46]. Ils se sont intéressés à l'épaisseur de la couche hydrophile fixée en surface des micelles (Fixed Aqueous Layer Thickness-FALT). Quand la longueur des chaînes de PEG augmente, l'épaisseur de la couche hydrophile augmente et la densité de la couche de PEG diminue. En effet, les chaînes de PEG plus longues ont besoin de plus d'espace pour conserver leur flexibilité, entraînant une surface de PEG plus clairsemée. La flexibilité des chaînes longues de PEG est essentielle pour permettre aux micelles d'échapper au SPM.

32. Poloxamères et poloxamines

Les poloxamères sont des copolymères triséquencés amphiphiles constitués de deux séquences d'oxyde d'éthylène (OE) (partie hydrophile) et d'une séquence d'oxyde de propylène (OP) (partie hydrophobe). Les poloxamines sont constituées de quatre unités biséquencés OE et OP reliées entre elles par une fonction éthylène diamine. L'adsorption des polymères amphiphiles s'effectue par interactions hydrophobes entre les blocs centraux de polyoxypropylène (poloxamère) ou polyoxypropylène éthylène diamine (poloxamine) et la surface hydrophobe de la particule. De cette façon, les chaînons hydrophiles (polyoxyéthylène) créent une couronne hydrophile en surface de la particule.

Müller et coll. ont montré que la présence de poloxamère 188 en surface de nanoparticules lipidiques solides (SLN) permet de limiter leur phagocytose *in vitro* par les granulocytes mais aussi de limiter leur accumulation dans le foie et la rate après administration i.v. à des souris [47]. L'épaisseur maximale de la couche de poloxamère est obtenue avec une concentration de 1,2 %. De plus, le film de poloxamère ne semble pas être affecté par la composition du cœur des

particules. Ces SLN pourraient alors encapsuler une drogue sans affecter la composition de leur surface.

Moghimi et coll. ont greffé de la poloxamine 908 sur des nanosphères de polystyrène [48]. Après injection IV à des rats, la quantité de nanosphères retrouvées dans le foie et la rate diminue de 60 % pour une concentration de poloxamine de 0,5 mg/mL de suspension comparativement aux nanosphères non recouvertes (tableau 3). Cependant, au-delà de 1 mg/mL, aucune différence significative n'est observée, soulignant le fait que les chaînes sont le plus serré possible et présentent une configuration en brosse qui s'étend sur toute la surface de la particule. Des résultats similaires ont été obtenus avec des particules nues incubées dans un sérum surchargé en poloxamine avant administration. Ces observations démontrent que même en présence des protéines sériques, la poloxamine peut modifier la surface des particules.

Tableau 3 : Distribution des nanoparticules de polystyrène recouvertes de poloxamine 3h après injection intraveineuse. (selon Moghimi et coll. [48])

Poloxamine (mg/mL)	Distribution at 3 h post-injection (% of injected dose)	
	Liver+Spleen	Blood
0	63.6 ± 2.0	1.0 ± 0.1
0.5	20.6 ± 3.7	48.2 ± 1.9
1.0	9.3 ± 1.6	63.4 ± 3.9
2.0	8.6 ± 1.4	61.2 ± 2.2
5.0	9.9 ± 1.2	58.6 ± 3.6

33. Le poly(oxyde d'éthylène) (POE)

Le POE est un polymère hydrophile de structure chimique identique au PEG. La différence principale réside dans leurs propriétés physiques différentes dues à la longueur des chaînes de polymère. Le POE a été utilisé par plusieurs équipes afin de tenter de préparer des vecteurs furtifs. Vandorpe et coll. ont élaboré des nanoparticules de poly(organophosphazène) (PF) dont la surface a été modifiée par adsorption d'un copolymère de poly(organophosphazène)-POE (PF-POE₅₀₀₀) [49]. Ces nanoparticules administrées chez le rat comparativement à des nanoparticules recouvertes de poloxamine 908 présentent 3h après injection intraveineuse une vitesse d'élimination plus lente, avec 51,4 % de la dose restant dans la circulation et seulement 12,3 % s'accumulant dans le foie (figure 20). Les nanoparticules recouvertes de poloxamine quant à elles, se

retrouvent majoritairement dans le foie (53,2 %) et une faible quantité reste dans la circulation sanguine (10,7 %). Une autre expérience effectuée chez le lapin démontre que 24 h après l'injection intraveineuse de nanoparticules de copolymère de PF-POE ou de PLGA recouvertes de poloxamine, 15,5 % de la dose de nanoparticules de PF-POE sont encore dans le système sanguin tandis que seulement 1,7 % des particules de PLGA y sont présentes.

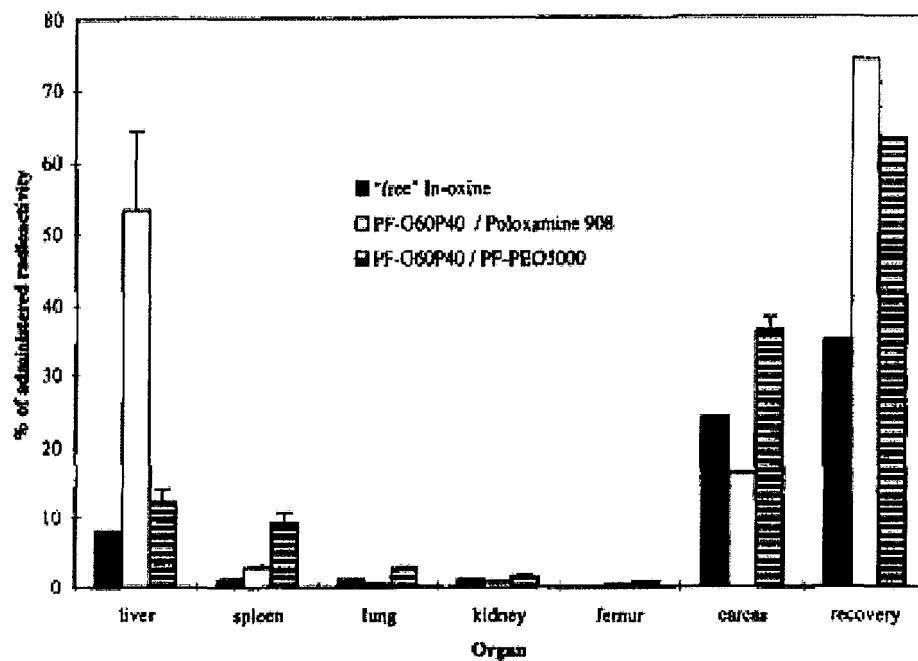


Figure 20 : Répartition de la ¹¹¹In-oxine libre et des nanoparticules de poly(organophosphazène) (PF) recouvertes de poloxamine 908 ou d'un copolymère de poly(organophosphazène)-POE (PF-POE₅₀₀₀) 3h après injection intraveineuse à des rats. (selon Vandorpe et coll. [49])

Zambaux et coll. ont étudié des nanoparticules constituées d'un copolymère amphiphile biséquencé de monométhoxypoly(oxide d'éthylène)-acide polylactique (MPOE-PLA) et d'acide polylactique (PLA) (75/25) [50]. Ces nanoparticules ont été marquées par un agent fluorescent et injectées à des cobayes avec comme contrôle des nanoparticules simples d'acide polylactique (PLA). L'estimation de la furtivité se fait alors par la mesure des particules phagocytées par les granulocytes. Celle-ci se fait par l'analyse des granulocytes fluorescents, dénombrés par cytométrie de flux, présents dans les échantillons de sang prélevés sur l'animal. Neuf minutes après l'administration des nanoparticules de PLA, environ 30 % des granulocytes sont fluorescents et ce pourcentage diminue progressivement jusqu'à 10 % à 22h (figure 21). Pour les

nanoparticules de copolymère MPOE-PLA/PLA, les granulocytes fluorescents (25 %) n'apparaissent que 11h après l'injection intravasculaire et cette proportion diminue rapidement vers 14h puis lentement jusqu' à des valeurs nulles à 24h. Il a été rapporté précédemment que la présence de MPOE à la surface des nanoparticules permet de réduire l'adsorption des protéines et l'activation du complément [5]. L'effet de dysopsonine du MPOE pourrait impliquer différents processus d'opsonisation se traduisant par un délai plus long dans le processus de phagocytose.

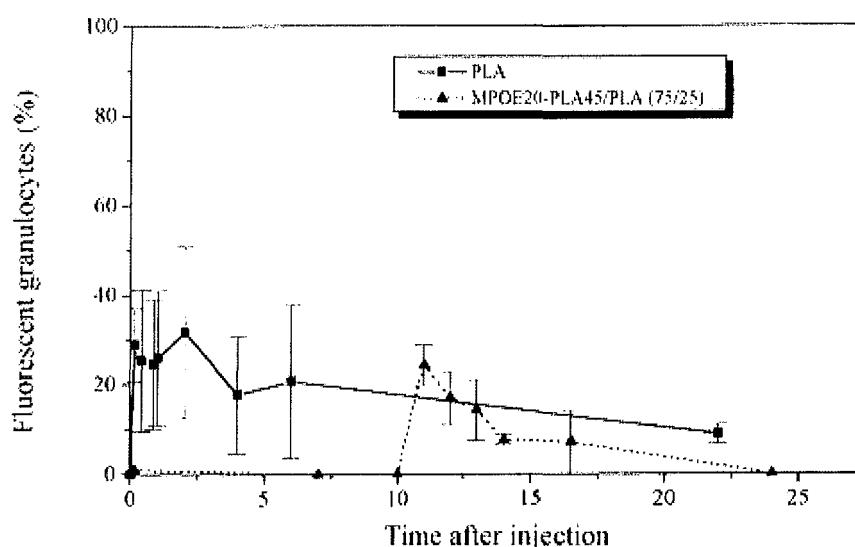


Figure 21 : Pourcentage de granulocytes fluorescents après administration intravasculaire de nanoparticules fluorescentes de PLA et de MPOE-PLA/PLA (75/25) à des cobayes en fonction du temps (8 mg/kg, n=3). (selon Zambaux et coll. [50])

Le POE présente donc des propriétés capables de limiter la reconnaissance de particules injectées dans le système sanguin en créant en périphérie des particules une couche hydrophile ne favorisant pas l'adsorption des opsonines nécessaire à l'initiation de la phagocytose.

34. Les polysaccharides

Les dérivés polysaccharidiques peuvent également être utilisés pour modifier les propriétés de surface de vecteurs particulaires à base de polyester. Dans ce cas, les polysaccharides utilisés sont soit des polysaccharides chargés, soit des polysaccharides électriquement neutres. Dans le second cas, des

chaînons hydrophobes et/ou miscibles avec le polyester doivent être greffés sur le polysaccharide afin qu'ils puissent s'ancrer dans la matrice polyester, la partie polysaccharidique assurant la surface hydrophile.

Passirani et coll. ont élaboré des nanoparticules fluorescentes de poly(méthyl méthacrylate) (PMMA) greffées ou non d'héparine (Nanohep) ou de dextran (Nanodex) de façon covalente [51]. Après injection intraveineuse des 3 formulations à des souris, des prélèvements sanguins sont effectués afin de suivre le devenir des particules dans la circulation sanguine. Les nanoparticules de PMMA nues ne sont plus détectables 30 minutes après administration alors que celles recouvertes d'héparine ou de dextran sont encore visibles après 48 h (figure 22). Les mêmes auteurs avaient précédemment démontré que ces mêmes particules étaient capables de limiter la consommation du complément in vitro [6], suggérant que les propriétés d'activation du complément du cœur de PMMA sont masquées par l'effet protecteur de chaque polysaccharide. Dans le cas des Nanohep, cet effet serait probablement augmenté par les propriétés d'inhibition de l'activation du complément de l'héparine [52, 53]. La structure externe des particules formée par la couche de polysaccharide est capable d'augmenter de façon très importante leur demi-vie plasmatique (de 3 min pour les particules nues de PMMA à plus de 5 h pour les particules greffées d'héparine ou de dextran).

Ces résultats mettent en avant le potentiel des particules recouvertes d'héparine sur leur surface à devenir des véhicules de médicament capables d'inhiber le processus d'opsonisation, de ralentir leur élimination et donc d'augmenter leur temps de circulation dans l'organisme.

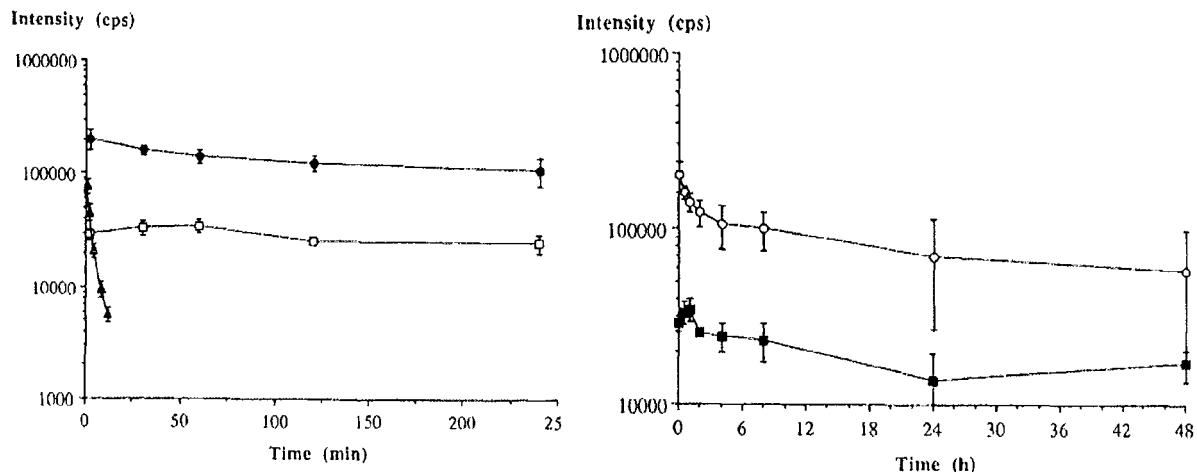


Figure 22 : Concentrations plasmatiques en fonction du temps après injection des suspensions des 3 types de nanoparticules (● : Nanohep, □ : Nanodex, ▲ : PMMA) à des souris. (selon Passirani et coll. [51])

Les expérimentations *in vitro* effectuées par Videm et coll. ont montré que la présence d'héparine permettrait de limiter la fixation et le développement des polynucléaires neutrophiles sur des plaques nues de polyéthylènimine. La répulsion électrostatique entre l'héparine polyanionique et les neutrophiles chargés eux aussi négativement permettrait de diminuer l'adhésion de ces derniers sur les plaques. La présence d'héparine confère une barrière stérique contre l'adhésion. Les auteurs ont pu démontrer que ces propriétés de l'héparine sont indépendantes de ses propriétés anticoagulantes.

III. Les médicaments à effet prolongé

Actuellement, la recherche pharmaceutique tente de prolonger la durée de vie des médicaments et surtout des peptides et des protéines thérapeutiques qui présentent une demi-vie plasmatique très faible. En effet, une fois injectés dans l'organisme, ils sont rapidement reconnus par le système phagocytaire mononucléé et éliminés. Ils doivent alors faire l'objet d'injections multiples afin de maintenir un taux constant de principe actif dans le sang. Le poly(éthylène glycol) est la molécule la plus étudiée et la plus utilisée aujourd'hui pour prolonger cette demi-vie. Quelques médicaments ainsi PEGylés existent déjà sur le marché et d'autres principes actifs sont en essais cliniques (tableau 4).

Tableau 4 : Médicaments PEGylés disponibles ou en essais cliniques

Nom commercial	Principe actif	Indications	Rythme d'administration	Statut
ViraferonPeg®	Interféron alfa-2b	Hépatite C chronique	1 injection / semaine	AMM
Pegasys®	Interféron alfa-2a			
Caelyx®	Doxorubicine	Cancers sein, ovaire, sarcome Kaposi	20 à 50 mg/m ²	AMM
Oncaspar®	Pegaspargase		1 injection / 2 semaines	ATU
Neulasta®	G-CSF		1 injection / traitement	AMM
Puricase®	Peguricase	Goutte	1 injection / 2 ou 4 semaines	Essais phase III
—	PEG-GM-CSF	Syndrome aigu après surexposition aux rayonnements	—	—

1. Les interférons pegylés

11. VIRAFERONPEG® 50, 80, 100, 120, 150 µg

Il s'agit d'un interféron alfa-2b recombinant conjugué de façon covalente avec le monométhoxy polyéthylène glycol. C'est un agent stimulant utilisé notamment pour le traitement des patients adultes atteints d'hépatite C chronique et utilisé en association avec la ribavirine. Il est prescrit à la posologie de 1,5 µg/kg/semaine tandis que la forme non PEGylée est administrée 3 fois par semaine. Après administration sous-cutanée, les concentrations sériques maximales apparaissent entre 15 et 44 h et sont maintenues jusqu'à 48-72 h alors que pour le Viraféron® classique (non PEGylé) elles apparaissent entre 3 et 12 h et sont indétectables 16 à 24 h après administration. La présence de PEG permet d'augmenter sa demi-vie plasmatique par rapport à l'interféron alfa-2b non PEGylé, en effet celle-ci passe de 3-7 h à environ 40 h.

Ces formes PEGylées permettent un confort de vie du patient par une réduction de la fréquence des administrations sous-cutanées rendue possible par une augmentation la demi-vie plasmatique.

12. PEGASYS® 135 ou 180 µg/0,5 mL

Pegasys® est un interféron alfa-2a PEGylé résultant de la conjugaison du PEG (bis-monométhoxy polyéthylène glycol) avec l'interféron alfa-2a. In vitro, ce médicament possède les activités antivirales et antiprolifératives caractéristiques de l'interféron alfa-2a. Il est utilisé comme le ViraféronPeg® dans le traitement de l'hépatite C chronique mais aussi de l'hépatite B chronique en une injection de 135 ou 180 µg par semaine au lieu de 3 injections pour la forme non PEGylée. Des études ont montré qu'après administration intraveineuse, la demi-vie d'élimination du Pegasys® est d'environ 60 à 80 h tandis qu'elle n'est que de 3 à 4 h pour l'interféron standard.

2. CAELYX® 2 mg/mL

Ce médicament est une forme liposomale PEGylée de chlorhydrate de doxorubicine par greffage de méthoxypolyéthylène glycol (MPEG). Le chlorhydrate de doxorubicine est un agent cytotoxique utilisé dans le traitement du cancer du sein métastatique, du cancer de l'ovaire à un stade avancé chez les

femmes après échec d'une chimiothérapie de première intention à base de platine et du sarcome de Kaposi associé au sida.

Les groupements linéaires de MPEG sont étalés sur la surface du liposome créant ainsi une pellicule protectrice qui réduit les interactions entre la double membrane lipidique et les protéines plasmatiques. Cette disposition permet aux liposomes de doxorubicine de se maintenir pendant des périodes prolongées dans la circulation sanguine. Les liposomes PEGylés sont suffisamment petits (diamètre moyen approximatif 100 nm) pour passer intacts (extravasation) à travers les vaisseaux sanguins tumoraux. La demi-vie apparente est en moyenne de 74 h. A doses équivalentes, les valeurs de la concentration plasmatique de ce médicament sont significativement plus élevées que celles observées avec les préparations conventionnelles de chlorhydrate de doxorubicine. La présence de MPEG sur les liposomes de doxorubicine permet, dans ce cas, non pas d'espacer les injections (1 toutes les 3 à 4 semaines) mais d'administrer des doses plus faibles (20 à 50 mg/m² au lieu de 40 à 75 mg/m²). En effet, la doxorubicine possède un effet cardiotoxique important qui impose de limiter son utilisation à 550 mg/m² de surface corporelle pour un traitement complet.

3. ONCASPAR® 750 UI/mL

C'est une forme PEGylée de la L-asparaginase dérivée d'E. Coli. Il s'agit d'un médicament en Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) nominative. Cette autorisation permet aux malades d'avoir un accès précoce aux médicaments avant ou hors Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). La demande se fait par un clinicien pour une personne donnée, elle est ensuite adressée par le pharmacien de l'hôpital à l'AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé). La durée de l'ATU nominative correspond à la durée de traitement.

Oncaspar® est utilisé en association avec d'autres médicaments de chimiothérapie pour le traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës en cas d'hypersensibilité à l'asparaginase. La posologie usuelle est de 2500 UI/m² tous les 14 jours par voie intramusculaire ou intraveineuse. La forme standard de l'asparaginase s'administre chez l'adulte à la posologie de 7500 à 10000 UI/m²/jour, en traitement d'attaque tous les jours pendant 6 à 21 jours et en traitement d'entretien 1 ou 2 fois par semaine.

4. NEULASTA® 6 mg/0,6 mL

Le Granulocyte-Colony Stimulating Factor humain (facteur de croissance de la lignée granulocytaire, G-CSF) est une glycoprotéine qui régule la production et la libération des polynucléaires neutrophiles à partir de la moelle osseuse. Le pegfilgrastim commercialisé sous le nom de Neulasta® est une forme conjuguée covalente de G-CSF humain recombinant (r-metHuG-CSF) lié à une molécule de polyéthylène-glycol (PEG) de 20 kDa. Le pegfilgrastim est une forme à durée prolongée de filgrastim, par diminution de la clairance rénale. Le pegfilgrastim et le filgrastim présentent un mécanisme d'action identique, entraînant une augmentation marquée, dans les 24 heures, du nombre de polynucléaires neutrophiles circulants, ainsi qu'une augmentation mineure des monocytes et/ou des lymphocytes.

Après administration sous-cutanée unique de pegfilgrastim, le pic de concentration sérique apparaît entre 16 et 120 heures après l'injection et les concentrations sériques se maintiennent pendant la période de neutropénie qui suit la chimiothérapie myélosuppressive. Il est prescrit dans les neutropénies post-chimiothérapie cytotoxique et s'administre en injection unique sous cutanée de 6 mg environ 24 h après la fin de la chimiothérapie cytotoxique. Dans la même indication, la présentation non PEGylée du filgrastim (Neupogen®) s'administre à la posologie de 5 µg/kg/jour 24 h après la chimiothérapie et tous les jours jusqu'à obtention de l'effet désiré, c'est-à-dire jusqu'à ce que le nadir du nombre de neutrophiles soit dépassé et que ce nombre soit revenu à une valeur normale. La durée nécessaire de traitement par le filgrastim standard peut aller jusqu'à 14 jours. Le pegfilgrastim permet donc de limiter la durée de traitement à un seul jour soit une seule injection par cycle de chimiothérapie.

5. PURICASE®

La PEG-uricase est un poly-conjugué (éthylène glycol) d'uricase porcine recombinée (oxydase uratique) pour le traitement des patients atteints de goutte sévère pour lesquels une thérapie conventionnelle est contre-indiquée ou s'est révélée inefficace. Ce médicament est développé par la société Savient Pharmaceuticals, Inc. qui a reçu la désignation de médicament orphelin de la FDA (Food and Drug Administration), et fait actuellement l'objet d'essais

cliniques. La goutte est une des maladies rhumatismales les plus douloureuses, due à des dépôts cristallins d'acide urique dans le tissu connectif des articulations. La douleur, le gonflement, l'érosion du cartilage et de l'os pourraient résulter d'une réaction immunologique importante due à ces dépôts anormaux. Les élévations chroniques de l'acide urique liées à la goutte peuvent avoir également des conséquences systémiques comme l'hypertension artérielle ou les problèmes rénaux. La recherche s'est donc orientée vers la réduction de cet acide urique afin d'obtenir un traitement efficace.

Les essais de phase II réalisés en 2005 dans une étude parallèle, multicentrique, ouverte et randomisée ont analysé la réponse uratique et les profils d'innocuité et pharmacocinétiques de la peguricase chez des patients souffrant d'hyperuricémie et de goutte sévère n'ayant pas répondu ou n'ayant pas toléré des thérapies conventionnelles. Les résultats montrent que des niveaux uratiques plasmatiques inférieurs aux valeurs de départ et persistants de manière nette et durable ont été observés dans les différents groupes de patients ayant reçus divers schémas posologiques de peguricase.

Les essais de phase III qui ont débuté récemment tenteront d'établir une corrélation entre les diminutions des taux d'urates dus à la peguricase et le soulagement de la douleur ainsi que la diminution du gonflement des articulations des patients.

6. PEG-GM-CSF

Le PEG-GM-CSF est une molécule développée par l'entreprise Cangene (Toronto). C'est une version chimiquement modifiée du Leucotropin® de la même société. Il s'agit d'un facteur de croissance des granulocytes et macrophages indiqué pour le traitement du syndrome aigu après surexposition aux rayonnements.

Grâce à la liaison du PEG au GM-CSF, ce nouveau médicament demeure dans le sang pendant une période beaucoup plus longue que le GM-CSF sans PEG. Ce résultat signifie que l'effet du GM-CSF PEGylé est beaucoup plus durable et réduit le nombre d'injections que doivent recevoir les patients. La surexposition aux radiations est considérée comme une menace potentielle pour le personnel civil et militaire dans diverses circonstances, notamment en cas d'exposition à des niveaux élevés de rayons X, d'incidents dans des centrales

nucléaires et d'actes terroristes ; cette forme PEGylée pourrait alors être utile à des fins militaires.

Une seule version PEGylée du GM-CSF a pour l'instant été étudiée. Dans une prochaine étude, Cangene mettra au point le meilleur concurrent parmi les molécules PEGylées en variant la taille du PEG utilisé et perfectionnera ce médicament grâce à des essais cliniques et des tests sur animaux.

HYPOTHESES DE TRAVAIL

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

Les vecteurs furtifs constitués d'une bordure en brosse hydrophile ont démontré leur capacité à augmenter le temps de résidence des particules injectées dans la circulation sanguine et ainsi accroître le temps de demi-vie des principes actifs encapsulés [29, 41, 46, 49, 51, 54].

Les molécules hydrophiles, conférant à ces vecteurs leurs propriétés furtives, sont généralement fixées soit de façon chimique sur les particules préformées, soit par synthèse chimique sur les polymères constitutifs des particules, et permettent ainsi de diminuer l'hydrophobicité des particules qui représente l'un des facteurs défavorables à une longue durée de vie dans la circulation.

Le développement d'une forme orale d'héparine effectué au laboratoire a démontré qu'après encapsulation de l'héparine, une partie était encapsulée au cœur des particules, alors qu'une autre était fixée en couronne sur les groupements hydrophiles polycationiques d'un polyméthacrylate, l'Eudragit® RS [55].

En effet, les héparines étant des glycosaminoglycanes polyanioniques, nous avons alors imaginé que l'on pourrait utiliser leurs propriétés de charge pour permettre des interactions électrostatiques avec les groupements polycationiques hydrophiles de l'Eudragit® RS et ainsi développer des particules plus hydrophiles et douées de propriétés furtives.

Le but de notre travail a alors consisté à développer des nanoparticules rendues furtives par une quantité déterminée d'héparine permettant de neutraliser la surface des particules de charge globale positive préparées avec le mélange 50/50 d'Eudragit® RS et de poly- ϵ -caprolactone et d'augmenter l'hydrophilie des particules.

Après encapsulation d'un principe actif hydrophile modèle, le chlorhydrate de propranolol, ces vecteurs furtifs ont été comparés *in vitro* à des nanoparticules non furtives (rendement de préparation, taille, potentiel de surface, taux d'encapsulation et cinétique de dissolution), puis *in vivo* après injection intraveineuse de ces vecteurs à des lapins et détermination de la demi-vie du principe actif par rapport à une solution de chlorhydrate de propranolol administrée de la même façon.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

I. Matériel et méthodes

1. Matières premières

11. Les principes actifs

111. *Le chlorhydrate de propranolol (propranolol)*

C'est une fine poudre blanche, soluble dans l'eau et dans l'alcool, peu soluble dans le chloroforme et pratiquement insoluble dans l'éther, le benzène et l'acétate d'éthyle.

Sa formule brute est $C_{16}H_{21}NO_2$, HCl.

Sa masse moléculaire est de 295,8 Da

C'est un sel d'une base faible, son pK_a est de 9,45.

Son point de fusion est de 165°C.

Sa formule développée est présentée dans la figure 23.

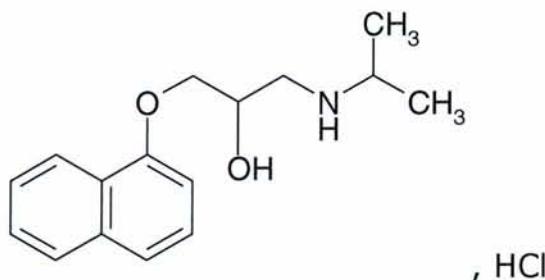


Figure 23 : Formule chimique du chlorhydrate de propranolol

112. *La nadroparine calcique : Fraxiparine ®*

C'est une solution aqueuse d'Héparine de Bas Poids Moléculaire (HBPM).

Sa masse moléculaire moyenne est de 4500 Da.

C'est un glycosaminoglycane polyanionique.

La formule chimique générale des HBPM est présentée dans la figure 24.

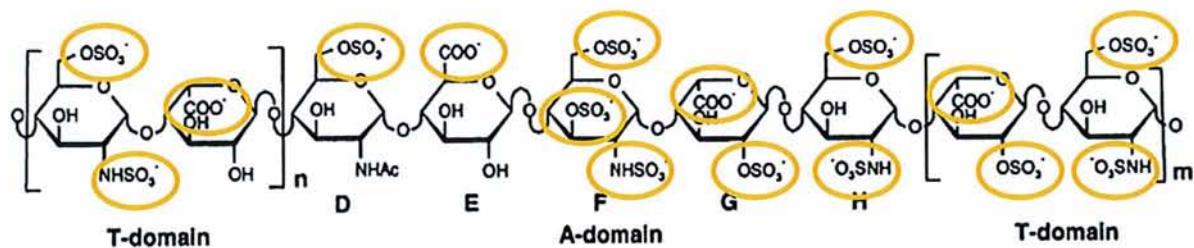


Figure 24 : Formule chimique d'une héparine de bas poids moléculaire

12. Les polymères

121. L'Eudragit® RS

C'est une fine poudre blanche soluble dans le méthanol, l'éthanol, l'alcool isopropylique, l'acétone, l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane et insoluble dans l'eau.

Sa masse moléculaire est d'environ 150000 Da.

Il s'agit de copolymères amorphes, non biodégradables, synthétisés à partir d'esters d'acides acryliques et méthacryliques avec une concentration en groupements ammonium quaternaires (0,5 à 0,8 %) qui leur confèrent une charge globale positive (figure 25). Ces groupements hydrophiles entraînent une certaine perméabilité du polymère qui permet le gonflement de la forme pharmaceutique et une diffusion facilitée du principe actif.

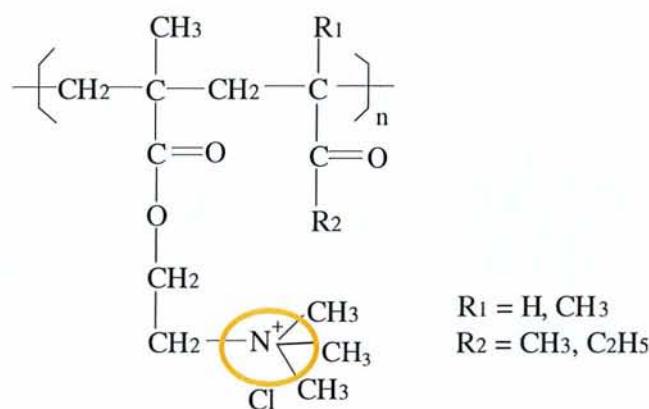


Figure 25 : Formule chimique développée de l'Eudragit® RS

122. La poly- ϵ -caprolactone (PCL)

Elle se présente sous la forme de petits granulés blancs solubles dans la plupart des solvants organiques (dichlorométhane, acétone) mais insolubles dans l'alcool, l'acétate d'éthyle et dans l'eau.

Sa masse moléculaire est de 42000 Da.

C'est un polyester aliphatique non chargé (figure 26), biodégradable et semi-cristallin.

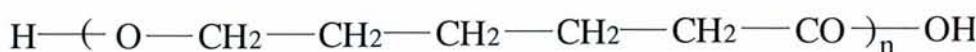


Figure 26 : Formule chimique développée de la poly- ϵ -caprolactone

13. L'agent tensio-actif : l'alcool polyvinyle (PVA)

Il est soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques.

Il est souvent utilisé comme agent tensio-actif dans la préparation des micro- et nanoparticules.

Sa masse moléculaire est de 30000 Da.

2. Préparations des nanoparticules par double émulsion

Le principe de préparation des nanoparticules repose sur une technique de double émulsion (hydrophile dans lipophile dans hydrophile), suivie de l'évaporation du solvant organique entraînant la précipitation des polymères.

Les formulations sont préparées en triple.

21. Préparation de nanoparticules furtives de chlorhydrate de propranolol (Figure 27)

250 mg d'un mélange (50/50) de polymères (Eudragit® RS/PCL) sont dissous dans 10 mL de dichlorométhane sous agitation magnétique (phase lipophile).

Un mL d'une solution aqueuse de principe actif (chlorhydrate de propranolol à 80 mg/mL) est ensuite ajouté à cette phase organique puis émulsionné à l'aide d'une sonde à ultrasons pendant 30 secondes, ce qui conduit à l'émulsion primaire (hydrophile dans lipophile).

Cette émulsion est ensuite versée dans 40 mL d'une solution aqueuse de PVA 1 % contenant l'héparine. La quantité d'héparine à ajouter a été optimisée à 800 UI. Ce second mélange est émulsionné à l'aide d'une sonde à ultrasons pendant 60 secondes afin d'obtenir l'émulsion secondaire (hydrophile dans lipophile dans hydrophile).

Le solvant organique est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite et à 40°C pendant environ 10 minutes.

La suspension colloïdale ainsi obtenue est alors répartie dans des tubes Ependorff puis centrifugée 20 minutes à 42000 g à 18°C.

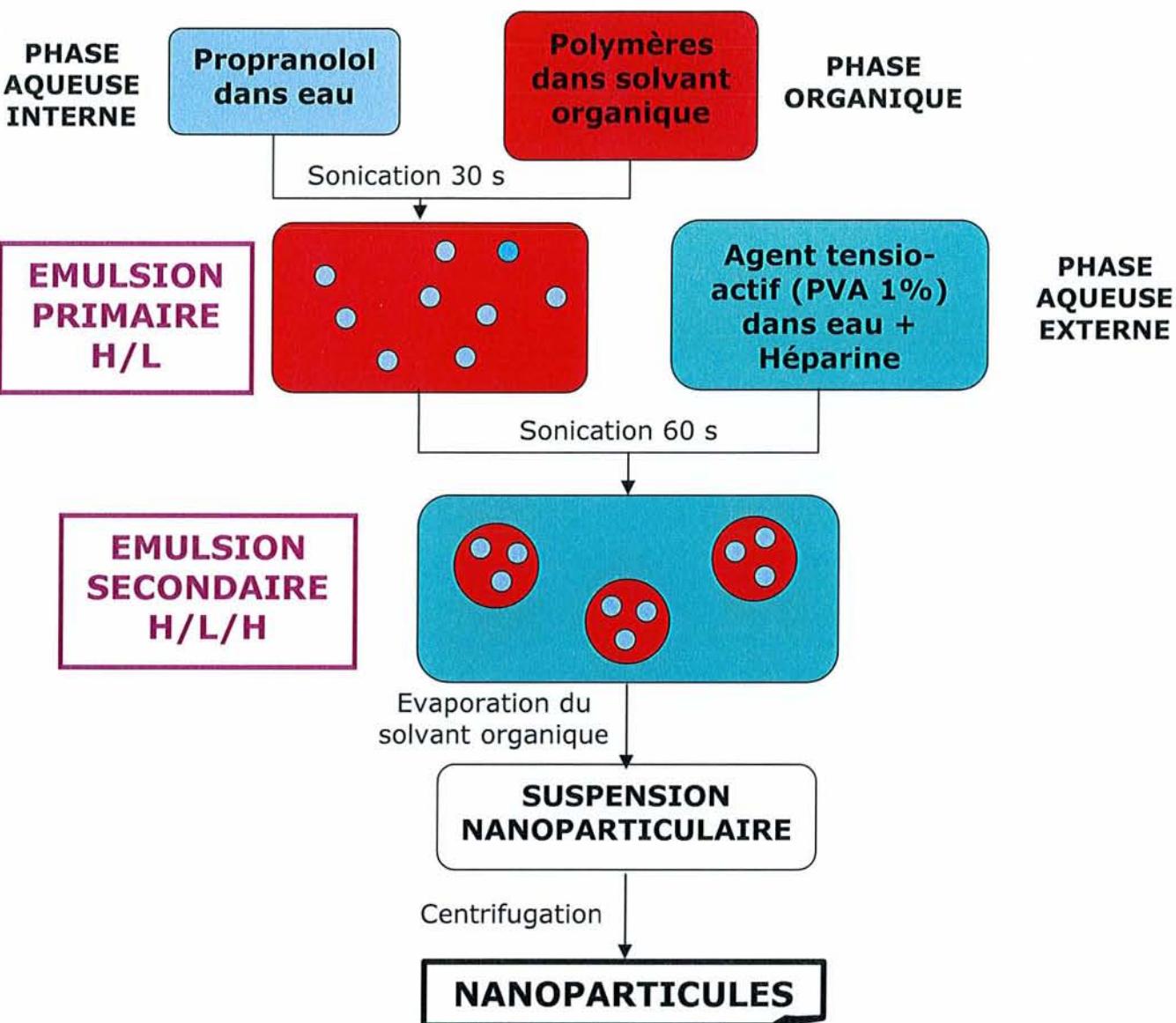


Figure 27 : Préparation des nanoparticules furtives par la méthode d'évaporation de solvant à partir d'une émulsion H/L/H.

Après centrifugation, les culots de nanoparticules (NP) sont suspendus dans 2 à 3 mL d'eau osmosée, congelés et lyophilisés afin d'obtenir une poudre sèche qui servira aux études de libération in vitro.

22. Préparation de nanoparticules non furtives

Les NP non furtives (sans héparine) sont fabriquées de la même façon que les NP furtives. Cependant, dans ce cas, la solution de PVA ne contient pas d'héparine. Elles serviront de référence pour la caractérisation, les essais *in vitro* et *in vivo*.

Des NP vierges (sans principe actif) sont fabriquées suivant le même procédé que les NP non furtives. La solution de chlorhydrate de propranolol est alors remplacée par de l'eau distillée.

3. Caractérisation des nanoparticules

31. Rendement de la préparation

Le rendement de la préparation est calculé à partir du rapport de la masse de NP obtenue après lyophilisation sur la masse totale de matières solides utilisées pour la formulation (polymères et principe actif).

Masse NP x 100

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Masse NP} \times 100}{\text{Masse (polymères + propranolol)}}$$

32. Taille et potentiel zéta des nanoparticules

La taille des nanoparticules est déterminée à l'aide d'un Zetasizer® (Malvern) par diffusion laser à partir de la suspension nanoparticulaire avant centrifugation, alors que le potentiel zéta est mesuré par spectroscopie de corrélation de photons avec le même appareil.

33. Taux d'encapsulation et de fixation

Les taux d'encapsulation du chlorhydrate de propranolol et de fixation de l'héparine sont calculés pour chaque formulation par dosage indirect en déterminant dans le surnageant récupéré après centrifugation de la suspension nanoparticulaire la quantité de chlorhydrate de propranolol non encapsulée et/ou la quantité d'héparine non fixée.

Les taux d'encapsulation et/ou de fixation des principes actifs sont ensuite calculés par différence par rapport à la quantité initiale de chaque principe actif.

$$Q0 - Q1$$

$$\text{Encapsulation (\%)} = \frac{Q0 - Q1}{Q0} \times 100$$

Q0 : masse initiale de principe actif

Q1 : masse de principe actif dosée dans le surnageant

Q0-Q1 : masse de principe actif incorporée dans les NP

331. Dosage de l'héparine

Ce dosage est basé sur une réaction de complexation.

En effet, les mucopolysaccharides acides précipitant en présence de sels d'ammonium quaternaires [56], la quantité d'HBPM restée libre est évaluée par néphélémétrie [57]. Cette technique est basée sur la complexation entre les groupements sulfates et carboxylates de l'héparine et les groupements ammonium d'une solution de chlorure de cétylpyridinium. 500 μ L de tampon acétate (1,215 mL d'acide acétique 1M ; 10,75 g d'acétate de sodium ; H₂O qsp 100 mL) et 2 mL de solution de cétylpyridinium (chlorhydrate de cétylpyridinium 0,1 % dans NaCl 0,94 %) sont ajoutés à 500 μ L de solution d'héparine (gamme d'étalonnage) et d'échantillons à doser.

Après une heure au bain-marie à 37°C, l'absorbance du précipité formé est évaluée par spectrophotométrie à 500 nm contre un blanc constitué du milieu réactionnel sans héparine.

Une gamme d'étalonnage (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 UI/mL) est réalisée à partir d'une solution mère d'HBPM à 10 UI/mL dans une solution de PVA 1 % (Figure 28).

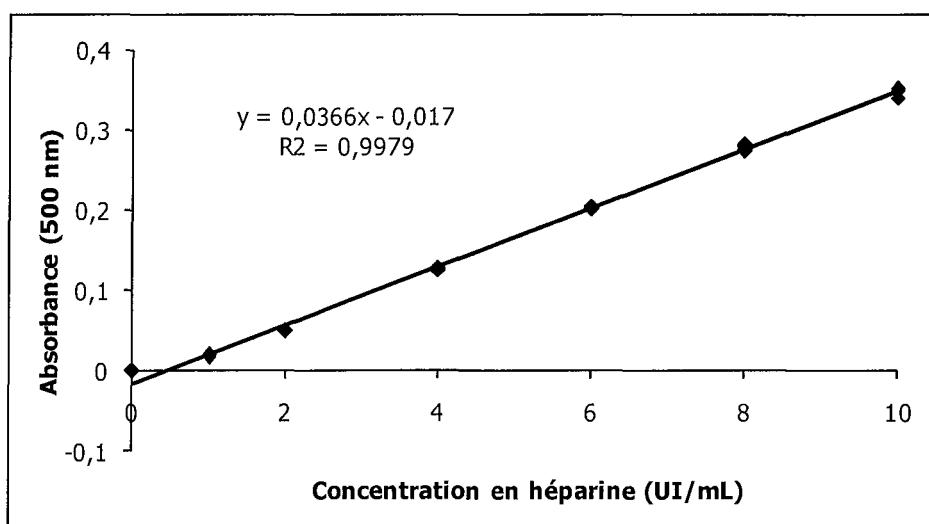


Figure 28 : Gamme d'étalonnage de l'héparine dosée par néphélémétrie

332. Dosage du chlorhydrate de propranolol

Le dosage se fait par lecture directe au spectrophotomètre à 289 nm.

On réalise une gamme d'étalonnage de façon à obtenir des concentrations comprises entre 0 et 40 µg/mL dans le PVA 1% (0, 10, 20, 30, 40 µg/mL) à partir d'une solution mère à 80 µg/mL (Figure 29).

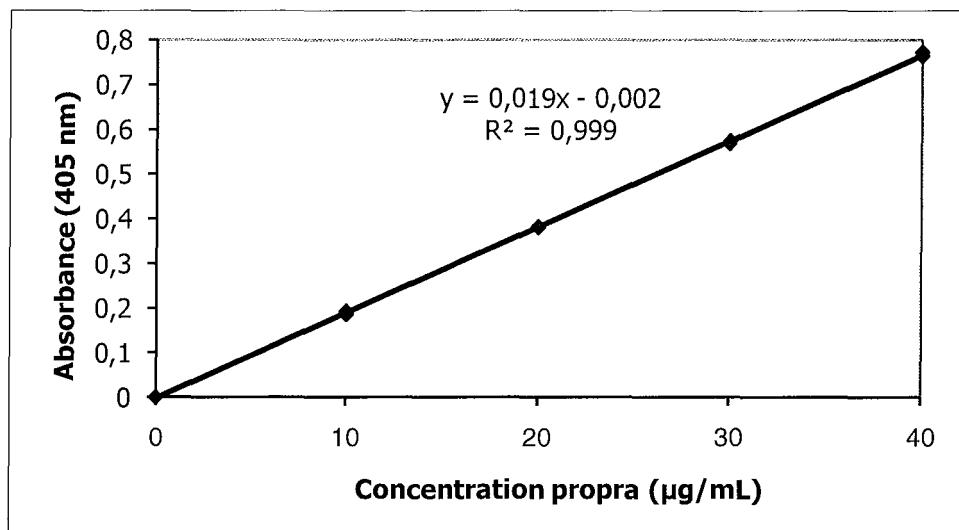


Figure 29 : Gamme d'étalonnage du dosage du chlorhydrate de propranolol dosé par spectrophotométrie

34. Charge en principe actif

La charge en chlorhydrate de propranolol dans les nanoparticules est déterminée par la masse de chlorhydrate de propranolol incorporée dans les NP pour 100 mg de NP sèches.

Celle-ci est calculée pour chaque formulation.

Charge expérimentale = Charge théorique x taux d'encapsulation

$$Q_0 = \frac{\text{Masse polymères} + Q_0}{\text{Masse polymères} + Q_0} \times \text{taux d'encapsulation}/100$$

Q₀ : masse initiale de principe actif

4. Essai de libération in vitro

La libération in vitro du chlorhydrate de propranolol et de l'héparine à partir des différentes formulations est étudiée en fonction du temps dans un tampon phosphate (PBS) à pH 7,4, sous agitation magnétique (300 rpm) et à 37 °C au bain-marie. 50 mg de nanoparticules lyophilisées sont mis en suspension dans 20 mL de PBS. Les essais sont effectués avec les NP furtives et les NP non furtives (sans héparine).

Des prélèvements de 1 mL sont effectués à des temps déterminés (20, 40 min, 1, 2, 3, 4 et 24 h) puis centrifugés 20 min à 42 000 g. Après chaque prélèvement, 1 mL de PBS est ajouté dans le milieu pour maintenir un volume constant.

Les quantités de chlorhydrate de propranolol libérées sont mesurées comme précédemment par spectrophotométrie UV dans le surnageant tandis que celles d'héparine sont mesurées par un dosage biologique de l'activité anti-Xa.

Ce dosage est basé sur l'évaluation de l'activité biologique anti-Xa de l'héparine déterminée par une méthode chromogénique (Kit Stachrom, Stago Diagnostica) et mesurée par un automate STA (Stago Diagnostica).

Le principe de ce dosage est fondé sur l'inhibition in vitro du facteur Xa par le complexe antithrombine III – HBPM. Une quantité connue de facteur Xa en excès est incubée avec ce complexe, entraînant une inactivation du facteur Xa proportionnelle à la concentration en HBPM dans l'échantillon. La quantité résiduelle de facteur Xa catalyse l'hydrolyse du substrat chromogène entraînant une libération de paranitroaniline évaluée par spectrophotométrie à 405 nm. L'intensité de la coloration obtenue est inversement proportionnelle à la quantité de facteur Xa résiduel ainsi qu'à la quantité d'HBPM (figure 30).

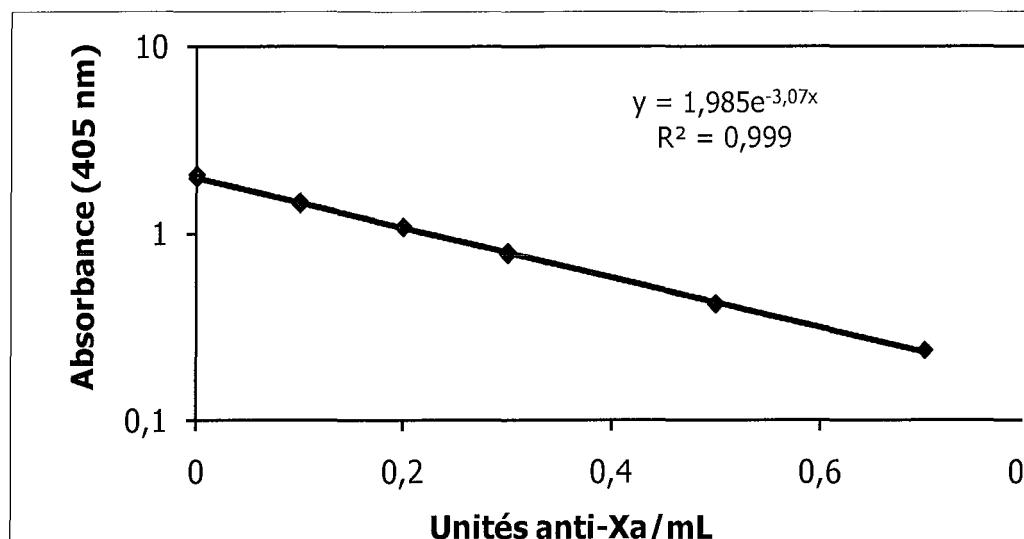


Figure 30 : Gamme d'étalonnage de l'activité anti-Xa plasmatique

5. Etude in vivo

Les études in vivo sont effectuées chez le lapin mâle de race néo-zélandaise, d'un poids compris entre 2,6 et 4 kg. Les animaux sont mis à jeun 12 h avant l'administration et tout au long de l'expérience. Ils peuvent cependant boire à volonté.

51. Méthodologie

Les formulations sont administrées par voie intraveineuse en bolus au niveau de la veine marginale de l'oreille.

Trois formulations différentes de chlorhydrate de propranolol sont administrées à la dose de 1mg/kg : des nanoparticules furtives et non furtives chargées en chlorhydrate de propranolol et une solution de chlorhydrate de propranolol dans le chlorure de sodium 0,9 %.

Les culots de nanoparticules récupérés après centrifugation sont remis en suspension dans du chlorure de sodium 0,9 %. La concentration en chlorhydrate de propranolol ainsi que le volume de NP à administrer sont calculés à partir des taux d'encapsulation.

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau de la veine marginale de l'oreille à des temps déterminés (2, 5, 10, 15, 30 et 45 min, puis 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48, 72 et 96 h).

Ces échantillons sanguins sont ensuite centrifugés 10 min à 3000 g pour séparer les cellules du plasma sanguin puis le plasma est congelé à - 20°C en vue des dosages plasmatiques de chlorhydrate de propranolol. Des mesures de l'activité anti-Xa sont également effectuées afin de vérifier la stabilité de la fixation de l'héparine sur les NP furtives.

52. Dosage plasmatique du chlorhydrate de propranolol

Après extraction des protéines, le chlorhydrate de propranolol est dosé dans le plasma par une technique de chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec détection spectrofluorimétrique [58-60].

521. Réactifs et étalons

- Tampon phase mobile pH 3,75: mélange de 988 mL d'eau ultra-pure avec 10 ml d'acide acétique et 2 ml de triéthylamine. Vérification du pH à $3,75 \pm 0,05$ et ajustement si nécessaire avec NaOH 1M.
- Phase mobile : mélange tampon phase mobile pH 3,75 – acétonitrile (65 : 35, V/V) filtré et dégazé sur une membrane de Nylon.
- Mélange acétonitrile + 1% HCl 1M (pour extraction des protéines) : mélange de 99 mL d'acétonitrile avec 1 mL d'HCl 1M.
- Gamme d'étalonnage (0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 ng de chlorhydrate de propranolol/mL de plasma) (Figure 31) : réalisée à partir d'une solution mère de chlorhydrate de propranolol à 0,1 mg/mL dans l'eau. La solution fille à 10 µg/mL est préparée extemporanément par dilution au 1/10^{ème} de la solution mère dans la phase mobile. Les solutions de surcharge (0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1 µg/mL) sont préparées par dilution dans la phase mobile. Limite de quantification : 1 ng/mL.

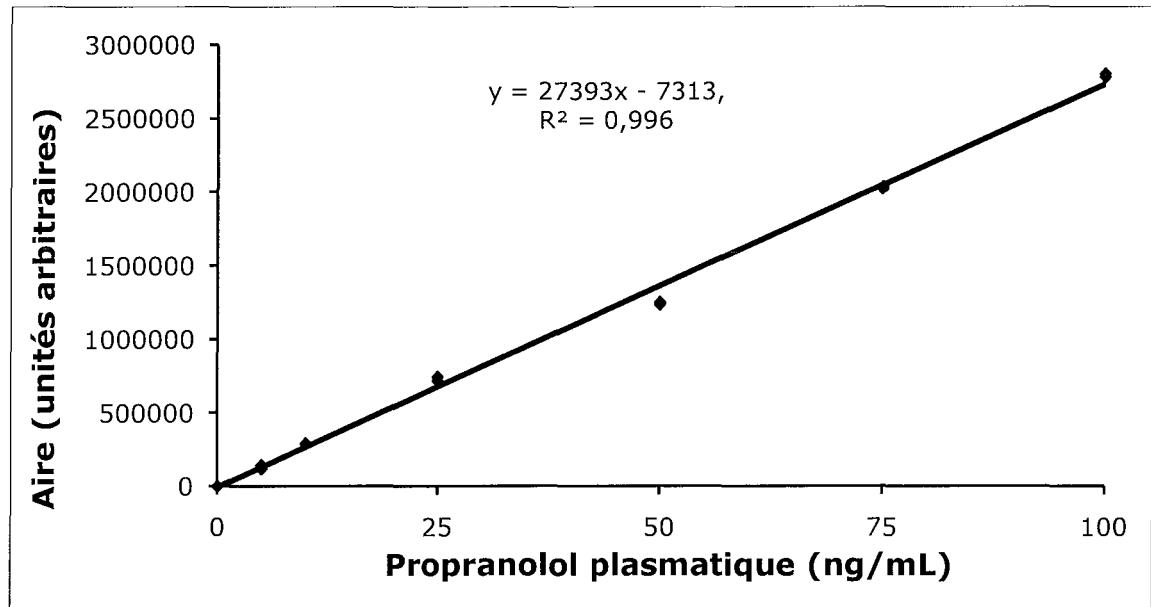


Figure 31 : Gamme d'étalonnage du dosage plasmatique du chlorhydrate de propranolol

522. Préparation des échantillons

Les échantillons plasmatiques sont décongelés à 37°C.

Pour la gamme d'étalonnage, à 200 µL de plasma blanc sont ajoutés 20 µL de solution de chlorhydrate de propranolol de concentrations différentes et 200 µL du mélange acétonitrile + 1% HCl 1M ; le tout est mélangé au vortex pendant 30 s et centrifugé à 10 000g pendant 10 min à 4°C ; le surnageant est prélevé puis transféré dans un flacon pour CLHP.

Pour les échantillons plasmatiques à doser, les 20 µL de solution de chlorhydrate de propranolol sont remplacés par 20 µL de phase mobile.

523. Conditions CLHP

Le système CLHP est composé d'une pompe, d'un injecteur automatique équipé d'une vanne à boucle calibrée de volume 20 µL, d'une colonne CPS Hypersil CN (5 µm) 250 x 4,6 mm, d'un détecteur spectrofluorimétrique (modèle RF 10A XL) et d'un système informatique d'acquisition et de traitement des données (Shimadzu Class-VP).

Le débit de la phase mobile est de 1,2 mL·min⁻¹ et la température de la colonne est de 35° C. La détection s'effectue par spectrofluorimétrie : excitation : 230 nm ; émission : 340 nm ; gain : 100 et atténuation : 2

524. Expression des résultats

Le temps de rétention du chlorhydrate de propranolol est d'environ 8 min (Figure 32). La concentration en chlorhydrate de propranolol est calculée en ng/mL par rapport à la gamme d'étalonnage.

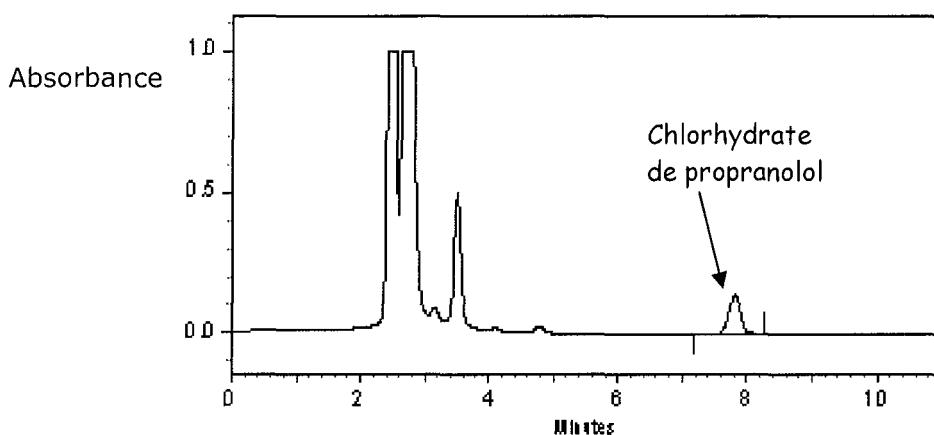


Figure 32 : Chromatogramme type du chlorhydrate de propranolol

525. Evaluation de la demi-vie plasmatique du chlorhydrate de propranolol

La demi-vie plasmatique ou demi-vie biologique représente le temps au bout duquel la concentration plasmatique du médicament a diminué de moitié. La demi-vie du chlorhydrate de propranolol pour les 3 formulations (NP furtives, NP non furtives et solution) est évaluée à partir des profils pharmacocinétiques *in vivo*. En considérant les points expérimentaux de la phase d'élimination, on construit une droite passant par ces points. On calcule ensuite la pente de cette droite (k) et la demi-vie correspond à $\ln 2/k$.

53. Dosage plasmatique de l'héparine

Le dosage de l'héparine pouvant être libérée des NP furtives s'effectue dans le plasma suivant le dosage biologique de l'activité anti-Xa décrit au paragraphe 4 (p54).

II. Résultats

1. Caractérisation des nanoparticules

11. Rendement de la préparation

Celui-ci est déterminé pour chaque formulation. Les résultats sont présentés dans le tableau 5. Que ce soit pour les particules furtives ou non furtives, un rendement de fabrication d'environ 70 % est obtenu.

Tableau 5 : Rendement, exprimé en pourcentage, obtenu lors de la préparation de nanoparticules d'Eudragit® RS/PCL (50/50) préparées avec 250 mg de polymères. Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type. (n=3)

Formulations	Rendement (%)
NP non furtives	67,10 \pm 0,94
NP furtives	72,86 \pm 0,49

12. Diamètre et potentiel zéta

Le tableau 6 montre que les particules vierges sont plus grosses que les NP de chlorhydrate de propranolol, furtives ou non. A l'inverse, au regard des écarts-types, il n'y a pas de différence entre les NP furtives et non furtives (388 \pm 20 et 357 \pm 10 nm), bien qu'une légère tendance semble démontrer que les particules furtives sont plus grosses que les NP non furtives.

Tableau 6 : Diamètre moyen, en nm, des nanoparticules d'Eudragit® RS/PCL (50/50). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type. (n=3)

Formulations	Diamètre moyen (nm)
NP vierges	522,6 \pm 6,7
NP non furtives	357,2 \pm 10,6
NP furtives	388,4 \pm 20,2

Le potentiel zéta des nanoparticules est présenté dans le tableau 7. Les NP vierges ainsi que les NP de chlorhydrate de propranolol non furtives présentent un potentiel de surface positif, respectivement de 37,4 et 30,4 mV. A l'inverse, les NP

furtives ont une charge globale négative caractérisée par un potentiel zéta de -17,8 mV.

Tableau 7 : Potentiel de surface, en mV, des nanoparticules d'Eudragit® RS/PCL (50/50). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type. (n=3)

Formulations	Potentiel zéta (mV)
NP vierges	37,4 \pm 2,8
NP non furtives	30,4 \pm 2,4
NP furtives	- 17,8 \pm 0,9

13. Taux d'encapsulation et de fixation

Avant d'effectuer des dosages sur les formulations contenant simultanément les deux principes actifs, nous avons vérifié que les molécules à doser n'interféraient pas l'une avec l'autre au cours du dosage. C'est en effet le cas puisque l'héparine n'absorbe pas à 289 nm et le chlorhydrate de propranolol n'interfère pas dans le mécanisme de complexation entre l'héparine et le chlorure de cétylpyridinium.

Le tableau 8 démontre que les NP furtives permettent d'encapsuler davantage de chlorhydrate de propranolol (32,40 %) que les NP non furtives (19,78 %). Dans les deux cas, les taux d'encapsulation ne sont pas très élevés alors que le taux de fixation de l'héparine sur les particules furtives est plus important (74 %).

Tableau 8 : Taux d'encapsulation et de fixation, en pourcentage du chlorhydrate de propranolol et de l'héparine dans les nanoparticules d'Eudragit® RS/PCL (50/50). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type. (n=3)

Formulations	Fixation héparine (%)	Encapsulation chlorhydrate de propranolol (%)
NP non furtives	—	19,78 \pm 3,17
NP furtives	74,45 \pm 0,50	32,40 \pm 4,75

14. Charge en principe actif

La charge en chlorhydrate de propranolol des nanoparticules étant corrélée aux taux d'encapsulation, la tendance est similaire à celle observée précédemment avec une masse de principe actif plus importante dans les NP furtives que les NP non furtives (Tableau 9).

Tableau 9 : Charge, en mg/100 mg de NP, en chlorhydrate de propranolol des nanoparticules d'Eudragit® RS/PCL (50/50). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type. (n=3)

Formulations	Charge en principe actif (%)
NP non furtives	5,08 \pm 0,35
NP furtives	7,90 \pm 1,39

2. Essai de libération in vitro

21. Cas du chlorhydrate de propranolol

Les profils de libération in vitro du chlorhydrate de propranolol pour les différentes formulations sont rapportés dans la figure 33. Que ce soit dans le cas de particules furtives ou non furtives, les profils de libération du chlorhydrate de propranolol sont caractérisés par une libération initiale importante suivie d'un plateau. De plus, dans les deux cas, la libération du principe actif est incomplète après 24 heures de dissolution des particules : en effet, seulement 33 % de chlorhydrate de propranolol encapsulé sont libérés des NP furtives au bout de 24 h et 42 % des NP non furtives. D'autre part, les cinétiques de dissolution des particules non furtives sont très reproductibles, avec une courbe moyenne caractérisée par de faibles écart-types. A l'inverse, dans le cas des NP furtives, les écart-types sont plus importants.

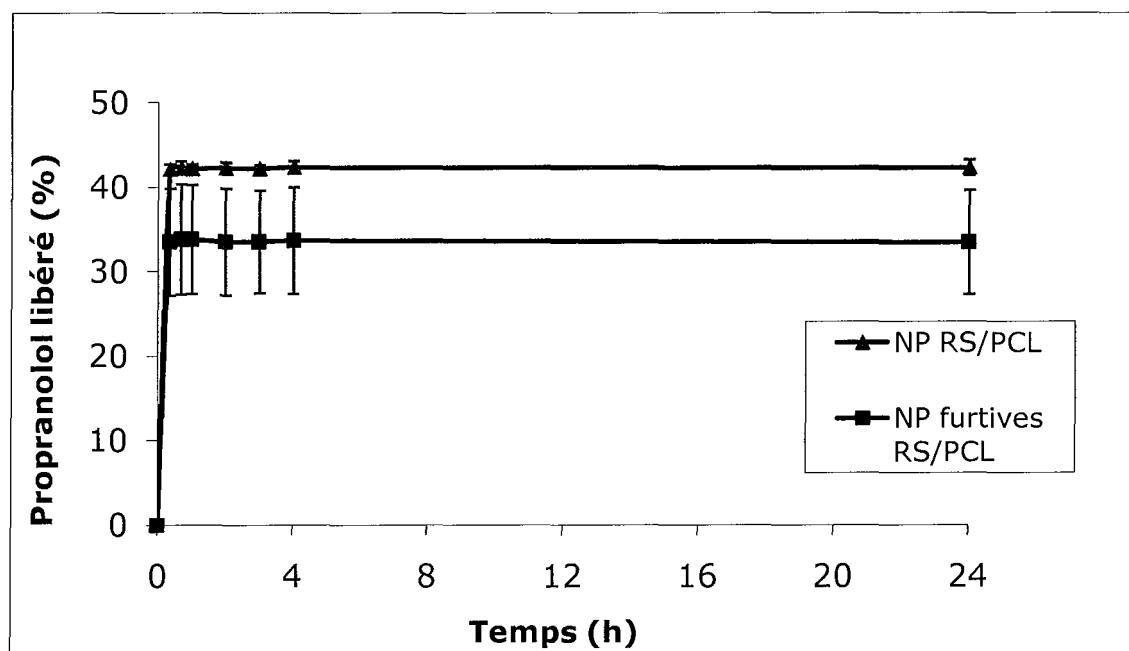


Figure 33 : Cinétiques de libération in vitro du chlorhydrate de propranolol en fonction du temps à partir de NP d'Eudragit® RS/PCL furtives et non furtives. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=3)

22. Cas de l'héparine

Les profils de libération in vitro de l'héparine à partir des NP furtives sont rapportés dans la figure 34. Malgré l'optimisation de la quantité d'héparine à ajouter aux formulations de NP furtives, 10 % de la quantité d'héparine fixée sont relargués in vitro. Cette libération est rapide et se fait dans les 20 premières minutes. Après 24 h de dissolution, aucune libération supplémentaire n'est observée.

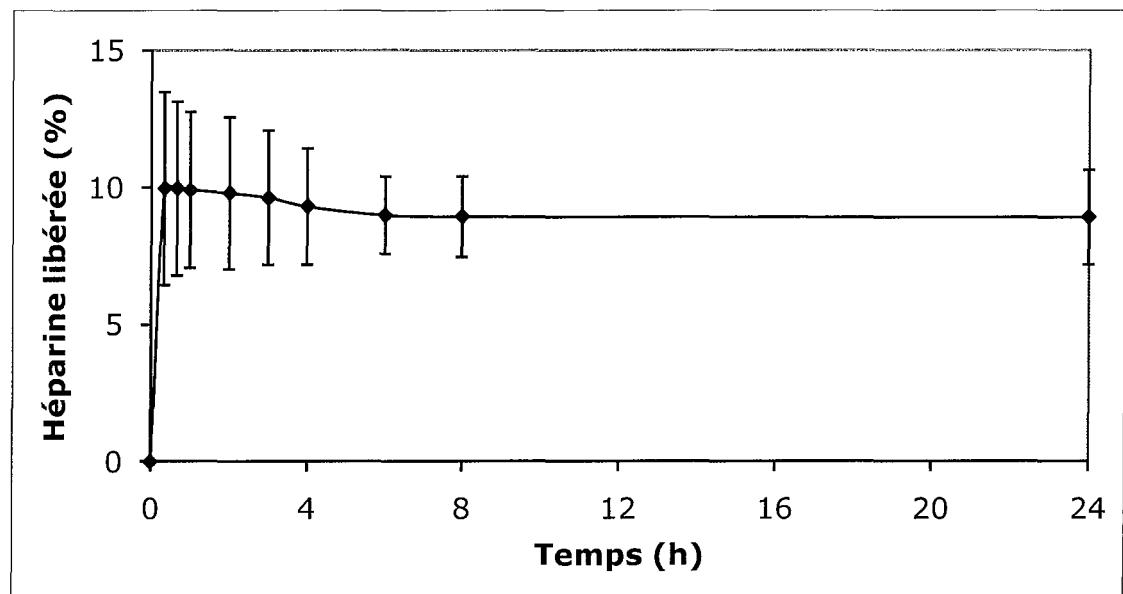


Figure 34 : Cinétique de libération in vitro de l'héparine en fonction du temps à partir de NP d'Eudragit® RS/PCL furtives. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=3)

3. Etude in vivo

31. Cas du chlorhydrate de propranolol

311. Cinétique plasmatique

Les concentrations plasmatiques de chlorhydrate de propranolol après administration intraveineuse de la solution, des NP non furtives et des NP furtives à des lapins sont rapportées respectivement dans les figures 35, 36 et 37. Logiquement, les concentrations plasmatiques diminuent au cours du temps ; on observe, dans un premier temps, une chute rapide des concentrations sanguines correspondant à la phase de distribution, suivie, dans un second temps, de la phase d'élimination pendant laquelle les concentrations diminuent moins rapidement.

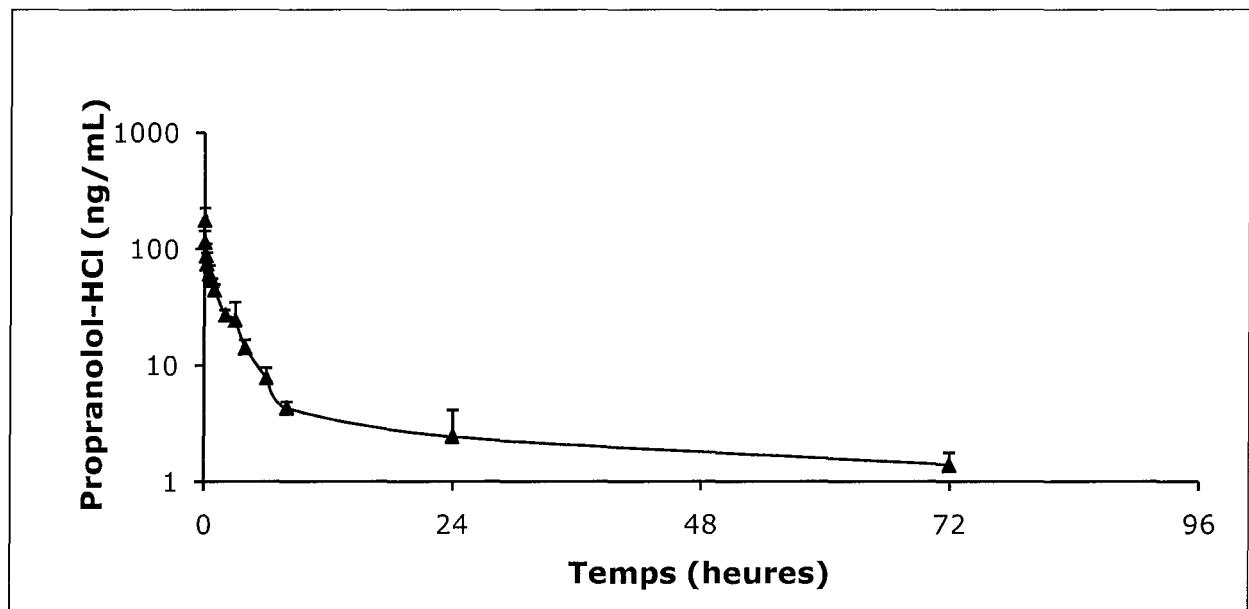


Figure 35 : Evolution chronologique des concentrations plasmatiques de chlorhydrate de propranolol après administration intraveineuse d'une solution de chlorhydrate de propranolol (1 mg/kg) à des lapins. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=4)

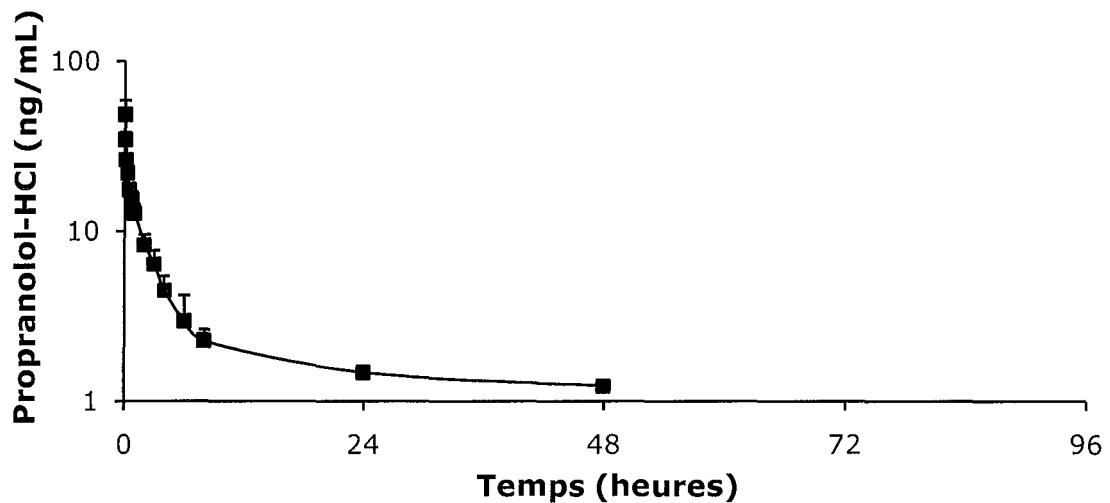


Figure 36 : Evolution chronologique des concentrations plasmatiques de chlorhydrate de propranolol après administration intraveineuse de NP d'Eudragit® RS/PCL non furtives (1 mg/kg) à des lapins. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=4)

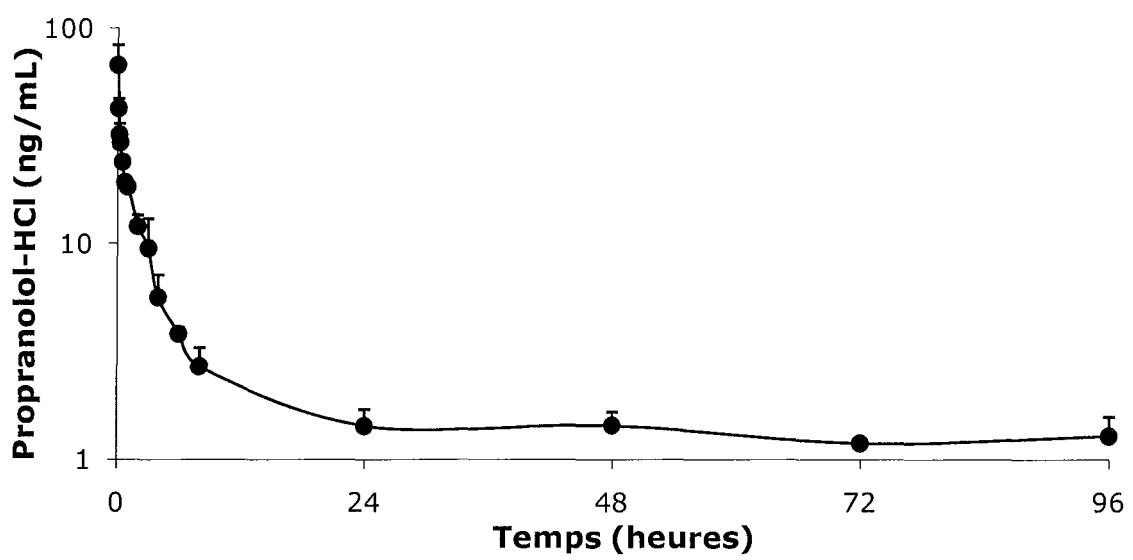


Figure 37 : Evolution chronologique des concentrations plasmatiques de chlorhydrate de propranolol après administration intraveineuse de NP d'Eudragit® RS/PCL furtives (1 mg/kg) à des lapins. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=4)

312. Demi-vie

Les valeurs de demi-vie du chlorhydrate de propranolol après administration IV des différentes formulations sont présentées dans la figure 38. Il est démontré que la demi-vie du chlorhydrate de propranolol administré en solution est faiblement inférieure à celle obtenue après encapsulation du principe actif dans les NP non furtives. D'autre part, la demi-vie du chlorhydrate de propranolol est statistiquement augmentée après administration de NP furtives par rapport aux NP non furtives et à la solution de chlorhydrate de propranolol.

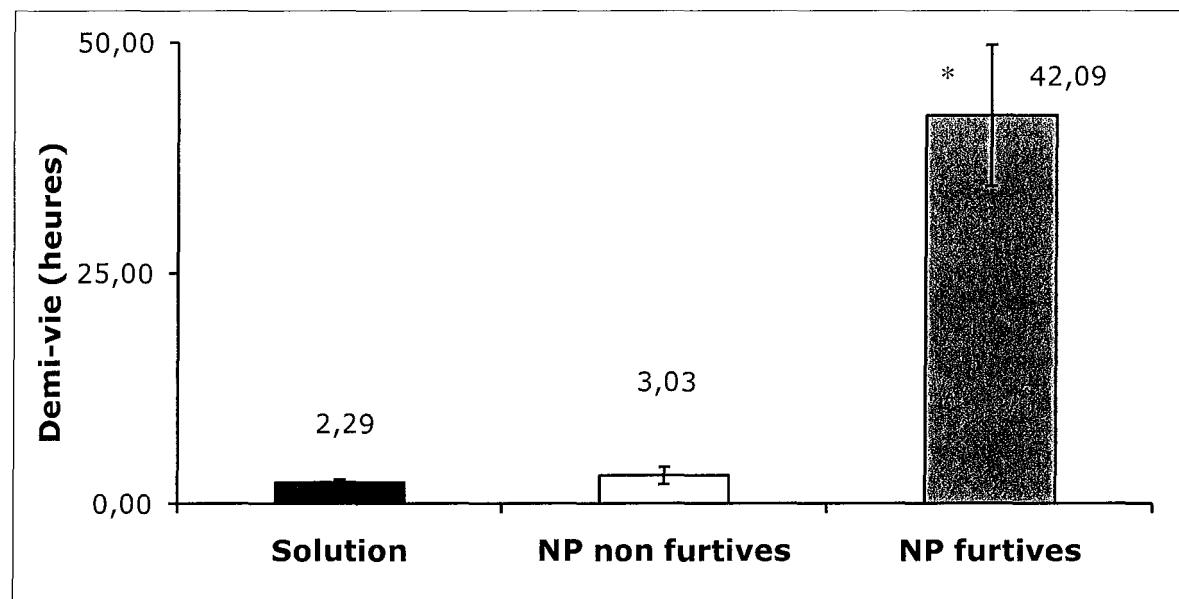


Figure 38 : Demi-vie du chlorhydrate de propranolol calculée à partir des profils des concentrations plasmatiques de chlorhydrate de propranolol et de NP d'Eudragit® RS/PCL furtives et non furtives de chlorhydrate de propranolol au cours du temps après administration IV. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=4) (*)Solution et NP non furtives statistiquement différentes à $p<0,05$ de NP furtives.

32. Cas de l'héparine

Les valeurs de l'activité anti-Xa plasmatique après administration des NP furtives sont représentées dans la figure 39. On peut remarquer qu'une activité anti-Xa est détectée dans le plasma entre 0 et 8 h, ce qui démontre un relargage, bien que relativement faible, de l'héparine de la surface des NP.

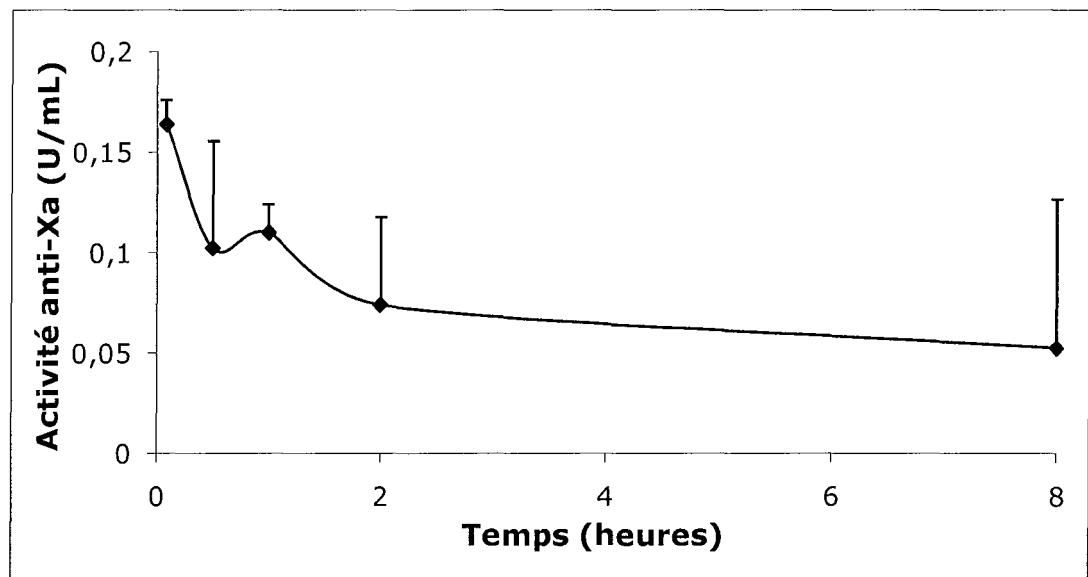


Figure 39 : Concentrations plasmatiques de l'activité anti-Xa en fonction du temps après administration IV de NP furtives RS/PCL. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. (n=4)

DISCUSSION

DISCUSSION

Notre objectif était de préparer, de caractériser et de comparer *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules furtives et non furtives de chlorhydrate de propranolol à partir d'un mélange d'un polymère non biodégradable (Eudragit® RS) et d'un polymère biodégradable (PCL). La technique d'encapsulation utilisée est la méthode de double émulsion suivie de l'évaporation du solvant organique. Celle-ci permet l'incorporation de principes actifs hydrophiles. On réalise tout d'abord une première émulsion (H/L) entre une phase organique de polymères et la solution aqueuse de chlorhydrate de propranolol puis on procède à la préparation de la deuxième émulsion (H/L/H) en ajoutant la première émulsion dans la phase aqueuse dispersante (solution de PVA) contenant l'héparine dans le cas des NP furtives. Lors de l'évaporation du solvant organique, les polymères hydrophobes précipitent au contact de la phase aqueuse et le chlorhydrate de propranolol est alors piégé dans les particules solides.

Les rendements obtenus suite à la préparation des différentes formulations sont comparables (67-72 %). Des pertes d'environ 30 % sont observées et sont probablement dues aux différentes étapes de transvasement des émulsions dans un premier temps, puis de la suspension colloïdale dans un second temps, avant et après centrifugation.

Les NP préparées ont un diamètre variant de 350 à 525 nm. Celui des NP furtives est légèrement supérieur à celui des NP non furtives. Ceci peut s'expliquer par le fait que les molécules d'héparine (polyanionique) forment des liaisons électrostatiques avec les groupements ammonium quaternaires de l'Eudragit® RS à la surface des NP, créant une couronne stérique qui augmente légèrement leur diamètre.

Les NP vierges sont plus grosses que les NP de chlorhydrate de propranolol. De par son caractère amphiphile, le chlorhydrate de propranolol joue en effet un rôle d'agent tensio-actif, comme cela a déjà été démontré [2]. La partie hydrophile se dirigerait vers la phase aqueuse interne et la partie hydrophobe vers la phase organique. Ceci permet une meilleure stabilité de l'émulsion primaire et donc une taille réduite des gouttelettes de polymères lors de la préparation des NP.

Les potentiels de surface des NP vierges et non furtives sont positifs en raison de la présence des groupements ammonium quaternaires de l'Eudragit® RS. Pour les NP furtives, notre objectif était d'approcher un potentiel neutre, a priori le plus favorable à la réalisation de NP furtives. Ceci peut être rendu possible par les interactions électrostatiques entre l'héparine polyanionique et les sites polycationiques de l'Eudragit® RS. Malgré l'optimisation de la quantité d'HBPM à ajouter (800 UI), nous n'avons pas réussi à obtenir un potentiel plus proche de zéro (-18 mV).

Le taux de fixation de l'héparine aux NP furtives est d'environ 75 %. Même si la quantité d'héparine à mettre en jeu a été optimisée, celle-ci ne se fixe pas en totalité. De plus, les liaisons électrostatiques sont des liaisons de faible énergie qui peuvent être rompues lors de la préparation des NP, et notamment lors de la phase d'évaporation du solvant organique.

Les taux d'encapsulation du chlorhydrate de propranolol varient de 19 % pour les NP non furtives à 32 % pour les NP furtives. Ces taux relativement faibles sont dus au fait que le pH de la solution de PVA est ajusté à 10,5, valeur supérieure au pKa du chlorhydrate de propranolol (9,45) permettant l'obtention de l'émulsion (absence de flocculation) mais n'est pas assez élevé pour empêcher la fuite du principe actif sous forme ionisée hors de la particule. Toutefois, on peut remarquer que l'encapsulation du chlorhydrate de propranolol est supérieure pour les NP furtives. L'interaction à la périphérie des NP entre le polymère cationique et l'héparine anionique présente dans la phase continue de PVA va créer une zone de microviscosité plus élevée qui semble ralentir la fuite du principe actif vers la phase aqueuse continue.

Les profils de libération in vitro du chlorhydrate de propranolol montrent une libération très rapide (dès les 20 premières minutes) du principe actif suivie d'un plateau entre 20 min et 24 h. La quantité de chlorhydrate de propranolol libéré varie de 33 % pour les NP furtives à 42 % pour les NP non furtives. Ces quantités ne sont pas très élevées et résultent sans doute du caractère hydrophobe de la PCL qui ne favorise pas l'entrée d'eau dans la particule et limite donc la libération du principe actif hydrophile. La couche de microviscosité évoquée précédemment dans

le cas des NP furtives provoque en parallèle une diminution de la quantité totale libérée.

Il y a une légère libération *in vitro* d'héparine, ce qui n'est pas de bon pronostic pour les essais *in vivo*. En effet, il est souhaitable que l'héparine ne soit pas relarguée par les NP afin de ne pas exercer son action anticoagulante. Comme il a été observé précédemment et malgré l'optimisation de la formulation, le potentiel zéta des particules furtives est négatif, démontrant qu'il y a un léger excès d'héparine à la surface des particules. De ce fait, cet excès est libéré lors des essais de dissolution *in vitro*. Cependant, cette quantité ne représente qu'environ 60 unités anti-Xa pour une formulation de NP de 250 mg de polymères et 80 mg de chlorhydrate de propranolol et reste donc relativement faible comparativement à la quantité prescrite pour un traitement anticoagulant (de 2850 unités en préventif jusqu'à 9500 unités en curatif).

Les profils de concentration sanguine du chlorhydrate de propranolol sont bien reproductibles d'un animal à l'autre. Le simple fait d'encapsuler le principe actif ne modifie pas significativement sa demi-vie expérimentale (2,3 à 3 h). En effet, les nanoparticules injectées dans la circulation sanguine semblent être rapidement reconnues par le système phagocytaire mononucléé, entraînant une élimination relativement rapide du principe actif qu'elles contiennent. Par contre, la fixation d'héparine aux NP permet d'augmenter cette demi-vie jusqu'à 42 h, ce qui démontre le caractère furtif des NP sur lesquelles l'héparine a été fixée par liaison électrostatique empêchant ainsi la fixation des opsonines qui interviennent dans la reconnaissance des éléments étrangers à l'organisme. Cette propriété des NP n'est pas due au potentiel de surface qui reste relativement élevé mais bien aux propriétés de l'héparine comme inhibiteur de l'activation du complément.

Cependant, cette observation doit être modulée par l'augmentation de l'activité anti-Xa dans le plasma. Il s'agit d'un point négatif car il n'est ni souhaitable, ni envisageable dans le cadre d'un traitement thérapeutique. On peut toutefois remarquer que l'activité anti-Xa reste faible (entre 0,18 et 0,05 unités anti-Xa/mL) alors qu'une activité préventive normale conduit à des concentrations de l'ordre de 0,4 unités anti-Xa/mL. Il va de soi que la quantité d'héparine absorbée devra faire, sur la base de ces résultats *in vivo*, l'objet d'une nouvelle optimisation consistant à diminuer la quantité d'héparine dans la phase aqueuse dispersante lors de la préparation des NP furtives.

Cette étude a été menée pour démontrer l'intérêt de NP chargées positivement permettant la fixation d'héparine pour rendre les NP furtives. Il est évident qu'il ne peut s'agir que d'un modèle théorique dans la mesure où l'Eudragit® RS est un polymère non biodégradable. Toutefois, l'utilisation d'autres polymères biodégradables et possédants des groupements cationiques pourra permettre d'apporter une réponse à ce problème.

Quoi qu'il en soit, on peut remarquer que l'objectif assigné à ce travail a été atteint puisque le système proposé a permis d'augmenter la demi-vie du chlorhydrate de propranolol par un facteur 18 par rapport à la solution de chlorhydrate de propranolol.

Notre système furtif basé sur la formation d'interactions électrostatiques entre un polymère polycationique et l'héparine, glycosaminoglycane polyanionique, se révèle être un système original d'encapsulation de principe actif en vue d'une administration intraveineuse.

En effet, la fabrication de ces particules est relativement simple et rapide comparativement à celle de particules précédemment mises au point et constituées de polymères chimiquement modifiés par greffage de molécule hydrophile (héparine ou autre polymère hydrophile) [41-51].

De plus, nos nanoparticules furtives ont démontré leur capacité à encapsuler un principe actif et à le relarguer *in vivo* après injection intraveineuse en augmentant ainsi sa demi-vie plasmatique par rapport au principe actif en solution. Les travaux antérieurs effectués avec des nanoparticules fluorescentes dont la surface a été modifiée par greffage d'héparine démontrent également une persistance de celles-ci *in vivo* ; cependant, à l'inverse de nos nanoparticules furtives, ces nanoparticules ne sont pas chargées en principe actif [51].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

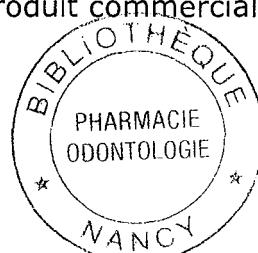
L'objectif de ce travail était de préparer des nanoparticules furtives susceptibles d'être faiblement reconnues par le système phagocytaire mononucléé (SPM) après injection dans la circulation sanguine. En effet, des nanoparticules classiques (non furtives) sont rapidement opsonisées, phagocytées et éliminées quand elles sont introduites dans le système sanguin, entraînant la dégradation du principe actif qu'elles encapsulent. Notre hypothèse était de modifier la surface des nanoparticules par ajout d'héparine dans leur formulation. Cette dernière, chargée négativement, peut se fixer de façon électrostatique au polymère polycationique constitutif des particules et ainsi former une barrière stérique hydrophile capable de limiter la fixation des opsonines et donc la dégradation des nanoparticules et de leur principe actif.

Nous avons alors pu mettre au point et caractériser *in vitro* des nanoparticules chargées en chlorhydrate de propranolol rendues furtives par la fixation d'héparine, inhibiteur du complément.

Le caractère de furtivité a été mis en évidence par l'augmentation de la demi-vie du chlorhydrate de propranolol *in vivo* après administration d'une formulation de NP furtives, comparativement à des NP simples (non furtives) et à une solution de chlorhydrate de propranolol de référence.

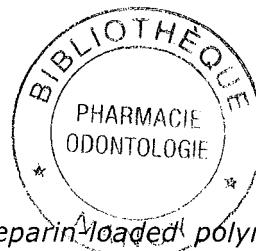
Toutefois, ces NP devront encore être optimisées pour éviter la libération d'héparine dans le sang après administration intraveineuse.

D'autre part, le chlorhydrate de propranolol n'était qu'une molécule modèle sans intérêt thérapeutique chez l'homme. Son utilisation dans notre travail a permis de démontrer, de façon simple, le caractère furtif des NP. Les peptides et/ou protéines thérapeutiques, en raison de leur très faible demi-vie (quelques minutes), sont les candidats les plus intéressants pour ce type de vecteur furtif. Le travail devra se poursuivre en sélectionnant un composé de ce type et en remplaçant l'Eudragit® RS par un autre polymère polycationique biodégradable afin d'achever la construction globale du système. Des molécules, comme l'interféron alfa qui existe aujourd'hui sous forme PEGylée sur le marché, permettraient de tester et de comparer l'intérêt des NP furtives développées avec un produit commercial.



BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE



1. Jiao, Y., et al., *In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits*. Circulation, 2002. **105**(2): p. 230-5.
2. Ubrich, N., et al., *Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study*. J Control Release, 2004. **97**(2): p. 291-300.
3. Gref, R., et al., 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000. **18**(3-4): p. 301-313.
4. Peracchia, M.T., et al., *Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles*. Biomaterials, 1999. **20**(14): p. 1269-75.
5. Vittaz, M., et al., *Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators*. Biomaterials, 1996. **17**(16): p. 1575-81.
6. Passirani, C., et al., *Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system*. Life Sci, 1998. **62**(8): p. 775-85.
7. Labarre, D.J., *Heparin-like polymer surfaces: control of coagulation and complement activation by insoluble functionalized polymers*. Int J Artif Organs, 1990. **13**(10): p. 651-7.
8. Lappégard, K.T., et al., *Artificial surface-induced cytokine synthesis: effect of heparin coating and complement inhibition*. Ann Thorac Surg, 2004. **78**(1): p. 38-44; discussion 44-5.
9. Mehvar, R., *Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents*. J Control Release, 2000. **69**(1): p. 1-25.
10. Shiah, J.G., et al., *Biodistribution and antitumour efficacy of long-circulating N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-doxorubicin conjugates in nude mice*. Eur J Cancer, 2001. **37**(1): p. 131-9.
11. Yoo, H.S. and T.G. Park, *Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer*. J Control Release, 2001. **70**(1-2): p. 63-70.
12. Tsunoda, S., et al., *Molecular design of polyvinylpyrrolidone-conjugated interleukin-6 for enhancement of in vivo thrombopoietic activity in mice*. J Control Release, 2000. **68**(3): p. 335-41.
13. Greenwald, R.B., *PEG drugs: an overview*. J Control Release, 2001. **74**(1-3): p. 159-71.
14. Kabanov, A.V., et al., *A new class of drug carriers: micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood to brain*. Journal of Controlled Release, 1992. **22**(2): p. 141-157.
15. Kwon, G.S. and K. Kataoka, *Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1995. **16**(2-3): p. 295-309.
16. Benoit, J.P., et al., *Les formes vectorisées ou à distribution modulée, nouveaux systèmes d'administration des médicaments*. J. Pharm. Belg., 1986. **5**: p. 319-329.
17. Le, U.M. and Z. Cui, *Long-circulating gadolinium-encapsulated liposomes for potential application in tumor neutron capture therapy*. Int J Pharm, 2006. **312**(1-2): p. 105-12.
18. Cansell, M., et al., *Liposomes coated with chemically modified dextran interact with human endothelial cells*. J Biomed Mater Res, 1999. **44**(2): p. 140-8.
19. Henriksen, I., G. Smistad, and J. Karlsen, *Interactions between liposomes and chitosan*. International Journal of Pharmaceutics, 1994. **101**(3): p. 227-236.
20. Christensen, K.L., G.P. Pedersen, and H.G. Kristensen, *Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **212**(2): p. 187-194.
21. Pedersen, G.P., et al., *Solid state characterisation of a dry emulsion: a potential drug delivery system*. International Journal of Pharmaceutics, 1998. **171**(2): p. 257-270.

22. Brigger, I., C. Dubernet, and P. Couvreur, *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(5): p. 631-51.
23. Dellacherie, E., R. Gref, and P. Quellec, *Les naosphères "furtives" comme nouvelles formes galéniques injectables : espoirs et réalités*. Médecine/Sciences, 2001. **17**(5): p. 619-626.
24. Lemarchand, C., et al., *Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems*. Biomaterials, 2006. **27**(1): p. 108-18.
25. Peracchia, M.T., et al., *Complement consumption by poly(ethylene glycol) in different conformations chemically coupled to poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles*. Life Sci, 1997. **61**(7): p. 749-61.
26. Gbadamosi, J.K., A.C. Hunter, and S.M. Moghimi, *PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance*. FEBS Lett, 2002. **532**(3): p. 338-44.
27. Gaur, U., et al., *Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system*. Int J Pharm, 2000. **202**(1-2): p. 1-10.
28. Ogawara, K., et al., *Pre-coating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles*. J Control Release, 2004. **100**(3): p. 451-5.
29. Fang, C., et al., *In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor-alpha-loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size*. Eur J Pharm Sci, 2006. **27**(1): p. 27-36.
30. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
31. Blunk, T., et al., *Colloidal carriers for intravenous drug targeting: plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Electrophoresis, 1993. **14**(12): p. 1382-7.
32. Labarre, D., et al., *Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush*. Biomaterials, 2005. **26**(24): p. 5075-84.
33. Bocca, C., et al., *Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 1998. **175**: p. 185-193.
34. Roser, M., D. Fischer, and T. Kissel, *Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats*. Eur J Pharm Biopharm, 1998. **46**(3): p. 255-63.
35. Fontana, G., et al., *Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake*. Biomaterials, 2001. **22**(21): p. 2857-65.
36. Huang, M., et al., *Body distribution and in situ evading of phagocytic uptake by macrophages of long-circulating poly (ethylene glycol) cyanoacrylate-co-n-hexadecyl cyanoacrylate nanoparticles*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(12): p. 1512-8.
37. Luck, M., et al., *Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics*. J Biomed Mater Res, 1998. **39**(3): p. 478-85.
38. Jeon, S.I. and J.D. Andrade, *Protein--surface interactions in the presence of polyethylene oxide : II. Effect of protein size*. Journal of Colloid and Interface Science, 1991. **142**(1): p. 159-166.
39. Jeon, S.I., et al., *Protein--surface interactions in the presence of polyethylene oxide : I. Simplified theory*. Journal of Colloid and Interface Science, 1991. **142**(1): p. 149-158.
40. Bazile, D., et al., *Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system*. J Pharm Sci, 1995. **84**(4): p. 493-8.
41. Beletsi, A., Z. Panagi, and K. Avgoustakis, *Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers*. Int J Pharm, 2005. **298**(1): p. 233-41.
42. Peracchia, M.T., et al., *Development of sterically stabilized poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly(ethylene glycol)*. J Biomed Mater Res, 1997. **34**(3): p. 317-26.
43. Nakada, Y., et al., *Evaluation of long-circulating nanoparticles using biodegradable ABA triblock copolymers containing of poly(L-lactic acid) A-blocks attached to central*

- poly(oxyethylene) B-blocks in vivo.* International Journal of Pharmaceutics, 1998. **175**: p. 109-117.
44. Verrecchia, T., et al., *Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers.* Journal of Controlled Release, 1995. **36**(1-2): p. 49-61.
45. Li, Y., et al., *PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats.* J Control Release, 2001. **71**(2): p. 203-11.
46. Shi, B., et al., *Stealth MePEG-PCL micelles: effects of polymer composition on micelle physicochemical characteristics, in vitro drug release, in vivo pharmacokinetics in rats and biodistribution in S180 tumor bearing mice.* Colloid Polym Sci, 2005. **283**: p. 854-967.
47. Müller, R.H., et al., *Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes.* Journal of Controlled Release, 1997. **47**: p. 261-269.
48. Moghimi, S.M., K.D. Pavey, and A.C. Hunter, *Real-time evidence of surface modification at polystyrene lattices by poloxamine 908 in the presence of serum: in vivo conversion of macrophage-prone nanoparticles to stealth entities by poloxamine 908.* FEBS Lett, 2003. **547**(1-3): p. 177-82.
49. Vandorpe, J., et al., *Long circulating biodegradable poly(phosphazene) nanoparticles surface modified with poly(phosphazene)-poly(ethylene oxide) copolymer.* Biomaterials, 1997. **18**(17): p. 1147-52.
50. Zambaux, M.F., et al., *Involvement of neutrophilic granulocytes in the uptake of biodegradable non-stealth and stealth nanoparticles in guinea pig.* Biomaterials, 2000. **21**(10): p. 975-80.
51. Passirani, C., et al., *Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate).* Pharm Res, 1998. **15**(7): p. 1046-50.
52. Ekre, H.P., et al., *Anti-inflammatory effects of heparin and its derivatives: inhibition of complement and of lymphocyte migration.* Adv Exp Med Biol, 1992. **313**: p. 329-40.
53. Maillet, F., et al., *Heparin prevents formation of the human C3 amplification convertase by inhibiting the binding site for B on C3b.* Mol Immunol, 1983. **20**(12): p. 1401-4.
54. Fundaro, A., et al., *Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats.* Pharmacol Res, 2000. **42**(4): p. 337-43.
55. Hoffart, V., et al., *Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers.* Drug Deliv, 2003. **10**(1): p. 1-7.
56. Scott, J.E., *The reaction of long-chain quaternary ammonium salts with acidic polysaccharides.* Chem. and Ind., 1995. **12**: p. 168-169.
57. Ardy, M., *Dosage de l'héparine : étude cinétique.* Bull. Ordre., 1976. **137**: p. 699-707.
58. Kim, H.K., et al., *Determination of propranolol concentration in small volume of rat plasma by HPLC with fluorometric detection.* Biomed Chromatogr, 2001. **15**(8): p. 539-45.
59. Rekhi, G.S., et al., *A fluorimetric liquid chromatographic method for the determination of propranolol in human serum/plasma.* J Pharm Biomed Anal, 1995. **13**(12): p. 1499-505.
60. Ryu, J.M., et al., *Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum.* J Control Release, 1999. **59**(2): p. 163-72.



