



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 1

2009

UFR DE PHARMACIE

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ – NANCY 1**

Mention Pharmacologie

Par **Julien SCALA-BERTOLA**

Développement de formes orales d'héparine et de
formes à libération prolongée de warfarine : une réponse
à l'amélioration de la prévention de la thrombose ?

Soutenance publique prévue le 04 Novembre 2009

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs :

Professeur A. GAYOT (Faculté de Pharmacie, Lille)

Professeur A. LAMPRECHT (Faculté de Pharmacie, Besançon)

Juges :

Professeur M. RABISKOVA (Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Vétérinaires, Brno)

Professeur P. GILLET (Faculté de Médecine, Nancy)

Professeur T. LECOMPTE (Faculté de Médecine, Nancy)

Co-Directeur de Thèse

Professeur P. MAINCENT (Faculté de Pharmacie, Nancy)

Directeur de Thèse

Membre Invité :

Docteur F. BONNEAUX (Faculté de Pharmacie, Nancy)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement Monsieur le Professeur Philippe MAINCENT pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Pharmacie de Nancy, pour m'avoir accordé toute sa confiance ainsi que pour son soutien au cours de toutes ces années.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE d'avoir accepté de co-diriger ce travail après la disparition de Madame le Docteur Nathalie UBRICH. Je lui suis reconnaissant pour toute la bienveillance et toute la sympathie dont il a toujours fait preuve à l'égard des personnes du laboratoire.

Je remercie très sincèrement Madame le Professeur Anne GAYOT et Monsieur le Professeur Alf LAMPRECHT de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je veux exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Pierre GILLET de me faire l'honneur de juger ce travail mais aussi pour la confiance dont il m'a témoignée en m'accueillant au sein de son service et de son unité.

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le Docteur François BONNEAUX pour sa grande disponibilité, sa sympathie et sa bonne humeur mais aussi pour tous ses bons conseils et ses encouragements ;

Je tiens à exprimer toute mon amitié ainsi que ma gratitude à Madame le Professeur Mila RABISKOVA pour sa très grande gentillesse, sa disponibilité, ses précieux conseils mais également pour m'avoir accueilli au sein de son département, pour m'avoir fait découvrir la République Tchèque et pour toutes les discussions que nous avons eues ensemble ;

Je veux remercier Madame le Docteur Anne SAPIN-MINET pour son soutien et ses encouragements ainsi que pour toutes les conversations que nous avons eues ensemble ;

Je n'oublierai pas d'adresser mes très sincères remerciements à Madame Pascale CARNET pour sa grande gentillesse, sa disponibilité et son efficacité qui n'ont nulles autres pareilles ;

Je remercie profondément toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au sein du laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Pharmacie de Nancy pour toutes nos discussions et tous les bons moments passés ensemble. Je pense tout particulièrement à Javier, Julianna, Myriem, Marc, Marie, Ahmed, Houssam, Fatima, Emeric, Johanna, Eliza, les deux Cristina, Miha, Benjamin, Nabil, Abdel, Paulo et Christophe.

A mes amis et à ma famille, qui m'ont soutenu et encouragé pendant toutes ces années, à vous qui avez su faire preuve de gentillesse, de patience et d'attention à mon égard tant dans les moments heureux que difficiles, mille fois Merci ;

J'adresse un merci tout particulier à Lucie à qui j'adresse toute mon affection et ma tendresse. Merci Lucie d'avoir été à mes côtés pendant toutes ces heures et d'avoir su rendre plus légers tous mes moments de doute et de difficulté par ta présence, ton soutien et tes encouragements.

Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur Madame le Docteur Nathalie UBRICH qui nous a quittés le 24 Avril 2007. Jamais je n'oublierai ta bonne humeur, ta gentillesse, ton courage et le sourire que tu nous as laissé la veille de ton départ. Tu demeureras éternellement un modèle pour moi et j'espère de tout mon cœur que tu aurais été fière de ce travail. Merci mille fois pour tout.

Je veux dédier cette thèse à Madame le Docteur Nathalie UBRICH ainsi qu'à mes grands-parents Hélène et Camille LACROIX, Marie et Baptiste SCALABERTOLA qui restent à jamais gravés dans mon être.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ABREVIATIONS	4
LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX.....	8
INTRODUCTION.....	9
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	14
1. HEMOSTASE ET MALADIE THROMBOEMBOLIQUE VEINEUSE.	15
1.1. Hémostase primaire.....	16
1.1.1. Le temps vasculaire.....	16
1.1.2. Le temps plaquettaire.	16
1.1.2.1. L'adhérence plaquettaire.....	16
1.1.2.2. Agrégation plaquettaire.....	18
1.2. Activation de la coagulation plasmatique.	20
1.3. Fibrinolyse.....	23
1.4. Régulation de la coagulation.	23
1.4.1. Antithrombine.	23
1.4.2. Système protéine C.....	24
1.4.3. Inhibition de la voie du facteur tissulaire.....	24
1.4.4. Autres inhibiteurs.	25
1.5. La maladie thromboembolique veineuse.....	26
1.5.1. Epidémiologie.	26
1.5.2. Physiopathologie.	27
1.5.2.1. Thrombogénèse veineuse.....	27
1.5.2.2. Résolution du thrombus.	31
1.5.3. Complications.....	33
1.5.3.1. L'embolisme pulmonaire.	33
1.5.3.2. Le syndrome post-thrombotique.	34
1.5.4. Prévention de la maladie thromboembolique.....	35
1.5.5. Traitement de la maladie thromboembolique.....	41
2. HEPARINES.....	43
2.1. Héparine standard.....	43
2.1.1. Origine.....	43
2.1.2. Structure.	43
2.1.3. Propriétés physico-chimiques.	45
2.1.4. Action biologique.....	47
2.1.5. Formes commercialisées et posologies.	50
2.1.6. Caractéristiques pharmacocinétiques.	51
2.1.7. Limitations et effets secondaires.	53
2.2. Héparines de bas poids moléculaires (HBPM).	56

3. VOIE ORALE ET HEPARINES.	60
3.1. Administration orale d'agents thérapeutiques.	61
3.1.1. Anatomie de l'épithélium intestinal.	61
3.1.2. Transport transcellulaire.	66
3.1.2.1. Transport transcellulaire passif et facilité.	66
3.1.2.2. Principes de l'endocytose médiée par des récepteurs (RME).	67
3.1.3. Jonctions serrées et transport paracellulaire.	69
3.2. Barrière gastro-intestinale et héparine.	72
3.3. Systèmes favorisant l'absorption gastro-intestinale de l'héparine.	73
3.3.1. Complexes héparine/adjuvants.	73
3.3.2. Sels diamine d'héparine.	74
3.3.3. Acides non α amino acylés.	74
3.3.4. SNAC et SNAD.	76
3.3.5. Acide désoxycholique.	79
3.3.6. Carbopol® 934P.	84
3.3.7. Chitosane et dérivés.	85
3.3.8. Labrasol™, Gelucire 44/14™ et acides gras saturés.	86
3.3.9. Labrasol® et SMEDDS.	88
3.3.10. Thiomères.	89
3.3.11. Dendrons polycationiques à noyau lipophile.	90
3.3.12. Nano- et microparticules de polymères.	92
4. LES ANTIVITAMINES K.	104
4.1. La vitamine K.	105
4.2. Les Antivitamines K.	105
4.2.1. Structure.	105
4.4.2. Pharmacologie et mécanisme d'action.	107
4.4.3. Pharmacocinétique.	109
4.4.3.1. Cas général.	109
4.4.3.2. Cas des dérivés de la 4-hydroxycoumarine.	109
4.5. Suivi du traitement par AVK.	112
4.6. Limitations et effets indésirables.	113
4.6.1. Saignement et hémorragies.	113
4.6.2. Autres effets indésirables.	114
5. ANTIVITAMINES K et LIBERATION PROLONGEE.	116
5.1. Warfarine et Polyvinylpyrrolidone.	116
5.2. Warfarine et β -cyclodextrines.	117
5.3. Warfarine et matrice céramique à base d'hydroxyapatite.	118
5.4. Dicoumarol et microsphères biodégradables.	118
5.5. Dicoumarol et particules bioadhésives.	119
5.6. Warfarine et conjugués de polyéthylène glycol.	119

TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	121
RAPPELS SUR LES DOMAINES GALENIQUES EXPLORES.	122
1. GRANULATION, EXTRUSION ET SPHERONISATION.	122
1.1. Granulation.....	123
1.2. Extrusion.	124
1.3. Sphéronisation.....	127
1.4. Séchage.....	129
2. LA MICROENCAPSULATION PAR EXTRACTION/EVAPORATION DE SOLVANT.....	130
ARTICLES.....	136
Article 1 : Développement de granulés pour l’administration orale d’héparine.	138
Article 2 : Développement de pellets pour l’administration orale d’héparine.	159
Article 3 : La microencapsulation pour l’amélioration de la biodisponibilité de la warfarine.....	183
DISCUSSION GENERALE	203
1. DEVELOPPEMENT DE FORMES ORALES D’HEPARINE.....	208
2. DEVELOPPEMENT D’UNE FORME A LIBERATION PROLONGEE DE WARFARINE.....	221
CONCLUSION	235
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	238

LISTE DES ABREVIATIONS

ACT :	Temps de coagulation activée ou Activated Coagulation Time
ADP :	Adénosine Di phosphate
APC :	Activated Protein C ou Protéine C activée
aPTT :	Temps de Thromboplastine Partielle activée ou activated Partial Thromboplastin Time (voir TCA en français)
AqC :	Aquacoat [®] ECD
ATIII :	Antithrombine III
AVK :	Antagonistes de la vitamine K
C934P :	Carbopol [®] 934P
C_{max} :	Concentration maximale
CMC :	Cellulose MicroCristalline
CPA :	Cellules Présentatrices des Antigènes
CRC :	Compartiment commun de recyclage ou common recycling compartment
¹³C-RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire au Carbone 13
CYP2C9 :	Cytochrome P450 2C9
CYP3A4 :	Cytochrome P450 3A4
Da :	Dalton
DL50 :	Dose létale50
DMSO :	Diméthyl Sulfoxyde
DCEA :	Déoxycholyléthylamine
DOCA :	Acide désoxycholique ou deoxycholic acid
DRESS :	Syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse ou Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms
DSC :	Calorimétrie différentielle à balayage ou Differential Scanning Calorimetry
EC :	Cellules Endothéliales ou Endothelial Cells
ECM :	Matrice extracellulaire ou ExtraCellular Matrix
EGF :	Facteur de croissance des épidermes ou Epidermal Growth Factor.
EP :	Embolie Pulmonaire
FII :	Facteur II ou prothrombine
FIIa :	Facteur II activé ou thrombine
FV :	Facteur V
FVa :	Facteur V activé
FVII :	Facteur VII
FVIIa :	Facteur VII activé
FVIII :	Facteur VIII
FVIIIa :	Facteur VIII activé
FIX :	Facteur IX
FIXa :	Facteur IX activé
FX :	Facteur X
FXa :	Facteur X activé
FXI :	Facteur XI
FXIa :	Facteur XI activé

FXII :	Facteur XII
FXIIa :	Facteur XII activé
FT-IR :	Spectroscopie infrarouge et transformée de Fourier
GALT :	Tissu lymphoïde associé au tube digestif ou Gut-Associated Lymphoid Tissue
GSH :	Glutathion réduit
HBP :	Protéines se fixant à l'héparine ou Heparin Binding Proteins
HBPM :	Héparine de Bas Poids Moléculaire
HCII :	Co-facteur II de l'héparine ou Heparin Cofactor II
HEC :	Hydroxyéthylcellulose
HMCC :	Mono-N-carboxyméthyl chitosane de haute viscosité
HNF :	Héparine Non Fractionnée
IEL :	Lymphocytes intraépithéliaux ou IntraEpithelial Lymphocytes
Il-1β :	Interleukine 1 β
Il-13 :	Interleukine 13
INR :	Ratio international normalisé ou International Normalized Ratio
IRP :	Préparation de référence internationale ou International Reference Preparation
ISI :	Indice de sensibilité international
ITF :	ItalFarmaco
JAM :	Molécule d'adhésion des jonctions ou junctional adhesion molecule
KHPM :	Kininogène de Haut Poids Moléculaire
LAAs :	Acides aminolipoïques
LMCC :	Mono-N-carboxyméthyl chitosane de faible viscosité
MCC :	Mono-N-carboxyméthyl chitosane
MCP-1 :	Protéine chimioattractive monocytaire ou Monocyte Chemotactic Protein-1
MMP :	Métalloprotéinases matricielles ou Matrix MetalloProteinase
MTEV :	Maladie ThromboEmbolique Veineuse
NaEDTA :	Sel de sodium de l'acide éthylène diaminetétraacétique
NOEL :	Dose sans effet observé ou No-Observed-Effect-Level
OMS :	Organisme Mondial de la Santé
PCL :	Poly- ϵ -CaproLactone
PCP-Cys :	Conjugué de cystéine et de polycarbophile
PEEA :	Poly(éther-ester-amide)
PEG :	PolyEthylène Glycol
P(FA:SA) :	Copolymère d'acide fumarique et d'acide sébacique
PF4 :	Facteur 4 Plaquettaire
PIVKA :	Précurseurs des facteurs vitamino K dépendants ou Protein Induced by Vitamin K absence
PLGA :	Acide Poly(DL-Lactique-co-Glycolique) ou Poly(DL-Lactic-co-Glycolic Acid)
PM :	Poids Moléculaire
PPSB :	Complexe prothrombinique ou Prothrombine-Proconvertine-facteur Stuart-facteur antihémophilique B
PSGL-1 :	Ligand glycoprotéique 1 de la P-sélectine ou P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PT :	Temps de prothrombine ou Prothrombin Time
PVA :	Alcool polyvinylique ou PolyVinyl Alcohol

PVP :	PolyVinylPyrrolidone
RME :	Endocytose médiée par des récepteurs ou Receptor-Mediated Endocytosis
RL :	Eudragit [®] RL
RS :	Eudragit [®] RS
RS30D :	Eudragit [®] RS 30 D
SGLT1 :	Transporteur du D-glucose sodium dépendant ou Sodium Glucose coTransporter
SMEDDS :	Systèmes auto-émulsionnables de délivrance de principes actifs ou Self-MicroEmulsifying Drug Delivery System
SNAC :	Sodium N-[10-(2 hydroxybenzoyl)amino]decanoate ou salcaprozate de sodium
SNAD :	Sodium N-[8(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate
SNOCC :	N-sulfonato-N,O-carboxyméthyl chitosane
SPT :	Syndrome post-thrombotique
TEER :	Résistance électrique transépithéliale ou Transepithelial Electrical Resistance
TEM :	Tomographie par Emission Monophotonique
TF :	Facteur Tissulaire
TFPI :	Inhibiteur de la Voie du Facteur Tissulaire ou Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGF-β :	Facteur de croissance transformant β ou Transforming Growth Factor
TGN :	Réseau trans golgien ou Trans Golgi Network
TIH :	Thrombocytopénies Induites par Héparine
TIMP :	Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases ou Tissue Inhibitor of Metalloproteases
T_{max} :	Temps correspondant à la concentration maximale.
TMC :	N-triméthyl Chitosane
TNFα :	Facteur de nécrose tumorale alpha ou Tumor Necrosis Factor alpha
t-PA :	Activateur tissulaire du plasminogène ou Tissue Plasminogen Activator
TRIS :	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TVP :	Thrombose Veineuse Profonde
UI :	Unités Internationales
u-PA :	Activateur du plasminogène de type urokinase ou Urokinase-type Plasminogen Activator
vWF :	Facteur von Willebrand
ZO :	Zona Occludine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Activation des plaquettes et coagulation.	17
Figure 2 : Initiation de l'hémostase.....	19
Figure 3 : Représentation classique de la cascade de la coagulation.	21
Figure 4 : Représentation schématisée de la formation et de la dégradation de la fibrine.	22
Figure 5 : Mécanismes anti-thrombotiques importants.	25
Figure 6 : Mécanismes inflammatoires et thrombose.	29
Figure 7 : Génération d'une microparticule.	30
Figure 8 : Microparticules et sélectines.	30
Figure 9 : Modèle simplifiée d'une molécule d'héparine ou d'un de ses fragments.	45
Figure 10 : Inactivation des enzymes de la coagulation par l'héparine.	47
Figure 11 : Différents sites de fixation de l'héparine.	51
Figure 12 : Pharmacocinétique de l'héparine.	52
Figure 13 : Distribution des poids moléculaires des héparines non fractionnées et des héparines de bas poids moléculaire.	56
Figure 14 : Mécanismes d'action des HNF et des HBPM.....	57
Figure 15 : Représentation schématisée de l'anatomie d'un villus et d'une plaque de Peyer de l'intestin grêle.	64
Figure 16 : Structure de la barrière intestinale.	65
Figure 17 : Composants structuraux et facteurs potentiels de modulation du complexe de jonction apical de l'épithélium intestinal.	70
Figure 18 : Structures chimiques des acides non α amino acylés.....	75
Figure 19 : Mécanismes d'action proposés de coopération du DOCA conjugué et du DOCA libre pour l'amélioration de l'absorption des HBPM au sein de l'intestin grêle (Lee et al., 2006 [145]).	82
Figure 20 : Représentation schématisée de la synthèse du mono-N-carboxyméthyl chitosane (MCC).	85
Figure 21 : Dendrons polycationiques à noyau lipophile (2-6).	90
Figure 22 : Photographies de microparticules d'héparine par microscopie.....	93
Figure 23 : Différentes formes de la vitamine K.....	106
Figure 24 : Antivitamines K disponibles en France.....	107
Figure 25 : Mécanisme d'action des antivitamines K.....	108
Figure 26 : Structure chimique d'un conjugué Warfarine-PEG [197].	120
Figure 27 : Granulateur centrifuge.	123
Figure 28 : Granulateur rotatif à lit d'air fluidisé.	124
Figure 29 : Schéma d'extrudeurs à vis (a), (b), (c), par gravité (d), (e), (f) et à piston (g).	125
Figure 30 : Etapes d'extrusion d'un extrudeur à piston [199].	127
Figure 31 : Disques de sphéronisation.	128
Figure 32 : Représentation du mécanisme de sphéronisation.	128
Figure 33 : Etapes de fabrication des microparticules par extraction/évaporation de solvant.	131
Figure 34 : Facteurs influençant la fabrication des microparticules.	132
Figure 35 : Structure chimique de la famille des Polyesters.....	133
Figure 36 : Mode d'action des nouveaux anticoagulants.	206
Figure 37 : Activités anti-Xa mesurées après administration orale de granulés d'énoxaparine à la dose de 600 IU/kg 1, 2 et 4 mois après leur fabrication (n=3).	210
Figure 38 : Activités anti-Xa mesurées après administration orale de granulés de bémiparine 1, 2 et 3 mois après leur fabrication (n=3).	211
Figure 39 : Activités anti-Xa mesurées après administration orale de pellets d'énoxaparine chargés d'Eudragit® RS à la dose de 600 IU/kg 1, 2, 4, 5, 6 et 7 mois après leur fabrication (n=3).	212
Figure 40 : Thermogrammes des composés utilisés lors de la granulation.	216
Figure 41 : Thermogrammes de granulés d'énoxaparine.	218
Figure 42 : Thermogrammes des granulés de bémiparine 0, 1, 3, 10 et 12 mois après fabrication.	218
Figure 43 : Etude de dissolution in vitro en milieu tampon phosphate à pH 7,4 (n=3).	224
Figure 44 : Etude de dissolution in vitro dans un diluant (n=3).	225
Figure 45 : Etude de dissolution in vitro en milieu NaCl 0,9 % (n=3).	226
Figure 46 : Concentrations plasmatiques de warfarine et INR obtenus après administration sous-cutanée des microparticules de warfarine à des lapins (n=3).	229

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1: Stratification du risque de thrombose chez les patients chirurgicaux en l'absence de thromboprophylaxie.</i>	<i>36</i>
<i>Tableau 2 : Thromboprophylaxie de la maladie thromboembolique veineuse.</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 3 : Traitement anticoagulant de la maladie thromboembolique.</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 4 : Paramètres biologiques et physiques du tractus intestinal humain.</i>	<i>61</i>
<i>Tableau 5 : Paramètres influençant l'absorption des médicaments administrés par voie orale.</i>	<i>62</i>
<i>Tableau 6 : Etudes réalisées sur l'administration orale d'héparines.</i>	<i>95</i>
<i>Tableau 7 : Paramètres pharmacocinétiques des AVK.</i>	<i>111</i>
<i>Tableau 8 : Caractéristiques de nouveaux anticoagulants</i>	<i>207</i>
<i>Tableau 9 : Paramètres pharmacocinétiques après administration orale de granulés ou de pellets d'HBPM. ..</i>	<i>213</i>
<i>Tableau 10 : Paramètres pharmacocinétiques obtenus après administration des microparticules aux lapins (n=3).</i>	<i>230</i>

INTRODUCTION

Seul tissu liquide de l'organisme humain, le sang est un tissu unique. Ce tissu conjonctif est constitué d'une matrice liquide appelée plasma dans laquelle sont suspendus érythrocytes, leucocytes et thrombocytes. Le plasma se compose essentiellement d'eau et de substances dissoutes telles que protéines, sels inorganiques, nutriments, déchets organiques, hormones et gaz. Contenu dans le compartiment vasculaire, le sang permet le transport de toutes ces molécules et participe à l'homéostasie de l'ensemble des cellules de l'organisme. Il va de soi que l'intégrité du système vasculaire est alors un point critique et essentiel de l'homéostasie tissulaire. Pour faire face à de possibles ruptures des parois vasculaires, l'organisme fait appel aux phénomènes physiologiques de l'hémostase et de la coagulation qui permettent la création d'un bouchon hémostatique capable de colmater les brèches vasculaires. Pour être efficace, ce bouchon hémostatique doit être rapidement formé, capable de résister à la pression intravasculaire ainsi qu'aux tractions mécaniques et doit empêcher la reprise de l'hémorragie pour permettre la guérison complète de la plaie. Fluide à l'état normal, le sang possède ainsi la capacité de modifier sa viscosité au contact des parois vasculaires lésées et agit comme un véritable « tissu hémostatique d'urgence ». Toutefois, des systèmes de régulation capables d'inhiber l'action thrombotique des mécanismes de l'hémostase et de la coagulation existent afin d'en limiter la propagation à l'ensemble du système vasculaire (thrombose ou coagulation intravasculaire disséminée). L'équilibre qui existe entre les systèmes pro- et anticoagulants est fragile et rend la frontière entre thrombose et hémorragie très ténue.

Parmi les pathologies de l'hémostase et de la coagulation, les accidents thromboemboliques sont à l'origine des maladies cardiovasculaires les plus fréquentes et les plus graves telles que l'infarctus du myocarde, les accidents ischémiques cérébraux, la thrombose veineuse profonde ou l'embolie pulmonaire. Ces pathologies cardiovasculaires sont un véritable problème de santé publique et représentent la première cause de mortalité des pays industrialisés. Pour faire face à ces pathologies, l'éventail thérapeutique peut faire appel à des traitements médicamenteux (molécules anticoagulantes et fibrinolytiques) ou à des traitements non médicamenteux (conseils hygiéno-diététiques, kinésithérapie ou chirurgie). Qu'ils soient utilisés pour la prévention ou pour le traitement des thromboses, les héparines et les antagonistes de la vitamine K constituent les deux pierres angulaires du traitement anticoagulant.

Tout comme les antagonistes de la vitamine K, les héparines sont utilisées en clinique depuis près de 40 ans. Si l'activité anticoagulante des héparines provient de leur interaction avec l'antithrombine, celle des antagonistes de la vitamine K provient de l'inhibition de la synthèse des facteurs de la coagulation dépendants de la vitamine K. Cependant, malgré leur efficacité, ces médicaments présentent un certain nombre d'inconvénients qui limite leur utilisation : administration parentérale pour les héparines, marge thérapeutique étroite et nombreuses précautions d'emploi pour les antagonistes de la vitamine K, sans compter la nécessité d'une surveillance biologique étroite et régulière de ces molécules en raison du risque hémorragique important lié à leur utilisation. Au vu de ces limitations, de nombreuses recherches ont été menées afin d'améliorer la sécurité des traitements anticoagulants.

Découvertes en 1976, les héparines de bas poids moléculaire ont constitué la première amélioration du traitement anticoagulant et ont supplanté très rapidement les héparines non fractionnées grâce à des propriétés plus intéressantes tant du point de vue pharmacologique que pharmacocinétique. Cliniquement, cette supériorité des héparines de bas poids moléculaire se traduit par une plus grande efficacité, un rythme d'administration moins soutenu, une surveillance simplifiée et surtout un effet hémorragique moins important. Malgré les avantages certains apportés par les héparines de bas poids moléculaire, de nombreuses études ont été menées durant les quatre dernières décennies afin de surmonter un obstacle majeur des traitements par héparines à savoir leur administration obligatoire par voie parentérale. Même si les voies nasale, pulmonaire, ou transcutanée ont pu être étudiées, la majorité des travaux rapportés eurent pour objectif de permettre l'administration des héparines par voie orale ; la voie orale étant la voie d'administration la plus physiologique et la plus confortable pour le patient. Le défi de ces études consiste à maintenir l'activité biologique des héparines au sein du tractus digestif en empêchant leur dégradation par voie chimique ou enzymatique et à permettre leur passage à travers la muqueuse gastro-intestinale. Différentes stratégies ont été envisagées telles que l'utilisation de polymères polycationiques (chitosane, carbopol[®] 934P), de dérivés des sels biliaires, de composés aminés (L-arginine, peptide AT1002), de dendrons ou de systèmes particuliers (microparticules et nanoparticules). Malgré tous ces efforts, seul les études sur les SNAC (salcaprozate de sodium) ont pu être menées jusqu'aux études cliniques de phase III. Cependant, cette nouvelle forme orale d'héparine ne sera jamais

mise sur le marché en raison d'une toxicité digestive trop importante (nausées, vomissements, douleurs thoraciques, dyspepsie).

Comparé aux études menées sur les héparines, le nombre d'études réalisées sur les antagonistes de la vitamine K demeure très marginal. L'une des options choisies a été d'essayer d'améliorer les propriétés physicochimiques des antagonistes de la vitamine K. C'est ainsi que deux équipes focalisèrent leur étude sur l'amélioration de la solubilité de la warfarine en milieu gastrointestinal. Si la première équipe eut recours à la polyvinylpyrrolidone, la seconde préféra faire appel aux cyclodextrines. L'option choisie par les autres équipes a été de mettre au point un système permettant une libération prolongée des antagonistes de la vitamine K. Pour ce faire, différentes stratégies furent adoptées : matrice céramique d'hydroxyapatite, microsphères de polymères biodégradables (polycaprolactone/poly(éther-ester-amide)), microparticules bioadhésives à base d'acide polyfumarique ou encore, pour l'étude la plus récente, l'utilisation du polyéthylène glycol dans la fabrication de conjugués de warfarine.

Ce mémoire est présenté en deux parties distinctes. La première partie se compose d'une étude bibliographique où sont rappelées les généralités relatives à l'hémostase, la maladie thromboembolique veineuse, les héparines et les antagonistes de la vitamine K. Cette première partie fait également la revue de la littérature dans le domaine de l'administration orale des héparines et s'intéresse aux différentes stratégies galéniques mises au point pour améliorer le traitement anticoagulant par antagonistes de la vitamine K.

La seconde partie, expérimentale, se nourrit des résultats des travaux menés au cours du doctorat. L'ensemble de ces résultats est présenté sous forme de trois articles. Les deux premiers articles concernent la mise au point de deux nouveaux systèmes galéniques permettant l'administration orale de deux héparines de bas poids moléculaire (énoxaparine et bémiparine). Les deux nouveaux systèmes mis au point utilisent des procédés de fabrication très simples et largement répandus dans l'industrie pharmaceutique : la granulation et la pelletisation. L'utilisation de suspensions aqueuses commerciales d'éthylcellulose et de polyméthacrylate a permis l'éviction des solvants organiques des étapes de fabrication des granulés et des pellets d'héparine ce qui constitue un avantage certain en terme de sécurité, tant pour les opérateurs de production que pour les patients. Après avoir évalué la capacité des granulés et des pellets d'héparine à libérer leur principe actif en milieu tamponné, les

formulations retenues ont été administrées par voie orale chez le lapin. Les paramètres pharmacocinétiques de ces deux systèmes ont été déterminés et leur biodisponibilité évaluée par rapport aux mêmes héparines administrées seules par voie sous-cutanée.

Le dernier article, quant à lui, décrit la fabrication de microparticules de warfarine à base de poly- ϵ -caprolactone. L'objectif de ce travail était de mettre au point un système à libération prolongée de warfarine permettant d'améliorer l'observance du patient, point essentiel pour une bonne conduite du traitement. La préparation des microparticules est basée sur la technique de la simple émulsion avec extraction et évaporation du solvant. Les particules ont été caractérisées du point de vue de leur taille, de leur taux d'encapsulation et testées *in vitro* dans un milieu tamponné. Incorporée au sein des microparticules, l'influence de la polyvinylpyrrolidone (comme formateur des pores) sur la libération *in vitro* de la warfarine a également été évaluée. Ces microparticules de poly- ϵ -caprolactone ont ensuite été administrées à des lapins par voie sous-cutanée et les concentrations plasmatiques de warfarine ainsi que les temps de Quick, exprimés en rapport normalisé international, déterminés.

La dernière partie de ce mémoire présentera les résultats non soumis à publication et proposera une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus. Cette réflexion *a posteriori* permettra ainsi de dégager les conclusions et les perspectives de notre travail.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. HEMOSTASE ET MALADIE THROMBOEMBOLIQUE VEINEUSE.

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

Ce phénomène nécessite l'intervention à la fois du vaisseau sanguin, des plaquettes et des protéines de la coagulation.

Plusieurs mécanismes interviennent dans la réponse hémostatique. Ils mettent en jeu des phénomènes mécaniques, physico-chimiques, biochimiques et enzymatiques qui sont imbriqués dans le temps et interdépendants. Toutefois, schématiquement, il est possible de les décomposer en trois grandes étapes :

- L'**hémostase primaire** comprenant l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes,
- L'**activation de la coagulation plasmatique**,
- La **fibrinolyse**.

La maladie thromboembolique est définie comme un ensemble de troubles de l'hémostase conduisant à la formation de caillots à l'intérieur des vaisseaux sanguins. La maladie atteint le plus souvent des sujets âgés de plus de 40 ans. Les facteurs de risque sont multiples. Les plus fréquents sont l'âge, l'alitement, la grossesse, le post-partum, les pathologies infectieuses et malignes, l'obésité, la prise d'oestrogénostatifs, le tabagisme, l'hypertension artérielle, le diabète, l'hypercholestérolémie, l'existence de varices, l'insuffisance cardiaque, les interventions chirurgicales en particulier orthopédiques.

1.1. Hémostase primaire.

L'hémostase primaire, d'une durée de 3 à 5 minutes, conduit à la formation d'un agrégat plaquettaire. Elle peut être divisée en deux phases successives : le temps vasculaire et le temps plaquettaire.

1.1.1. Le temps vasculaire.

Le débit sanguin est ralenti pendant une brève période par une vasoconstriction passive des petits vaisseaux sanguins liée à l'élasticité de la paroi vasculaire. Les fibres musculaires lisses se contractent ensuite par réflexe sympathique sous l'effet de substances humorales telles que l'adrénaline, la noradrénaline, la sérotonine et le thromboxane A₂ libérés par les plaquettes.

1.1.2. Le temps plaquettaire.

Le temps plaquettaire peut également être décomposé en deux étapes, l'une conduisant à l'adhérence des plaquettes et l'autre à l'agrégation plaquettaire.

1.1.2.1. L'adhérence plaquettaire.

L'adhérence des plaquettes s'effectue au niveau du sous-endothélium exposé. Elle fait intervenir le complexe glycoprotéique transmembranaire Ib/IX de la membrane plaquettaire sur lequel se fixe le facteur von Willebrand.

Le facteur von Willebrand est une glycoprotéine constituée de sous-unités reliées par des ponts disulfures formant des multimères de masse moléculaire élevée (jusqu'à 2 millions de daltons). Son mécanisme d'action est séquentiel : il se fixe aux fibres de collagène de type III et IV entraînant une modification de sa conformation spatiale qui lui permet de s'amarrer aux plaquettes par la glycoprotéine Ib/IX. Ceci conduit à la formation de ponts entre les plaquettes et le sous-endothélium.

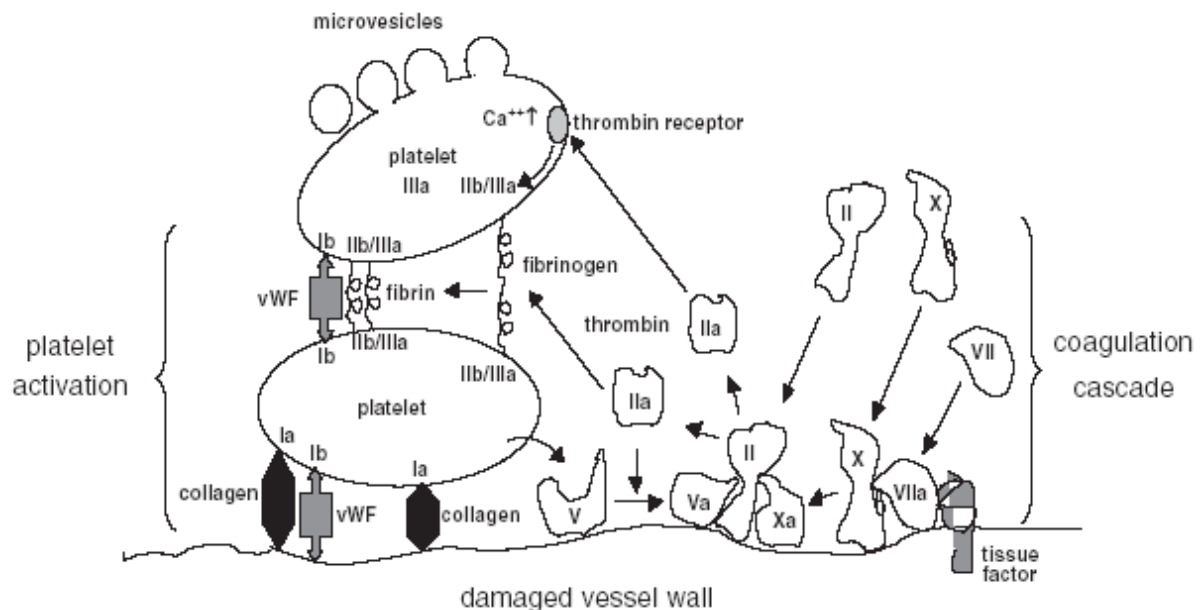


Figure 1 : Activation des plaquettes et coagulation.

La partie de gauche montre l'adhésion des plaquettes au niveau du site de lésion par l'intermédiaire du facteur von Willebrand (vWF) et du collagène ; suivie par l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine et la fibrine. La partie de droite montre la production initiale du facteur Xa par le complexe Facteur Tissulaire (TF) / Facteur VII et l'activation du facteur V, libéré des plaquettes, par la thrombine (Facteur IIa). Le complexe prothrombinase (Va-Xa) convertira par la suite beaucoup plus de prothrombine (Facteur II) en thrombine (Van der Putten et al., 2006 [1]).

Cette adhérence entraîne l'activation des plaquettes. Les plaquettes discoïdes au repos deviennent plus sphériques et plus volumineuses. Elles s'étalent car l'anneau de microtubules qui les constitue se rompt, les microfilaments d'actine et de myosine se dépolymérisant en présence de calcium. Des pseudopodes sont émis.

Les plaquettes subissent également une modification ultrastructurale importante nommée « flip-flop » : la polarité des phospholipides de la membrane des plaquettes activées s'inverse ce qui expose le facteur 3 plaquettaire au plasma sanguin.

Diverses substances concourent également à l'activation plaquettaire : le collagène, l'ADP à faible concentration provenant de la lyse due à la lésion vasculaire des globules rouges et des traces de thrombine. Les granules denses et alpha des plaquettes fusionnent alors avec les invaginations de la membrane plaquettaire entraînant ainsi une dégranulation et une libération de leur contenu dans le plasma. Ainsi, les granules denses libèrent du calcium, de l'ADP responsable de l'agrégation ADP-dépendante et de la sérotonine qui a un effet vasoconstricteur. Les granules alpha

quant à eux libèrent diverses substances comme la β -thromboglobuline, le facteur 4 plaquettaire capable de neutraliser l'héparine, des protéines adhésives, du facteur de croissance dérivé des plaquettes et du facteur V.

Les constituants ainsi libérés vont amplifier l'adhérence et augmenter le recrutement des plaquettes.

1.1.2.2. Agrégation plaquettaire.

A ce stade, les plaquettes sont réunies entre elles par des ponts de fibrinogène et forment un agrégat plaquettaire retenant quelques leucocytes et quelques érythrocytes.

Le facteur 3 plaquettaire est extériorisé vers le plasma à la surface de chaque plaquette. Constitué de phospholipides chargés négativement (phosphatidylsérine essentiellement), c'est un support physique de la coagulation sur lequel vont se concentrer dans un petit espace un grand nombre de facteurs de la coagulation (fixation directe des facteurs V et VIII, fixation par l'intermédiaire de ponts calciques des facteurs de la coagulation vitamines K dépendants). De ce fait, un rapprochement physique facilite les interactions et donc une génération rapide de thrombine.

Le caillot formé au cours de l'hémostase primaire est fragile : il va être consolidé par de la fibrine au cours de l'hémostase secondaire.

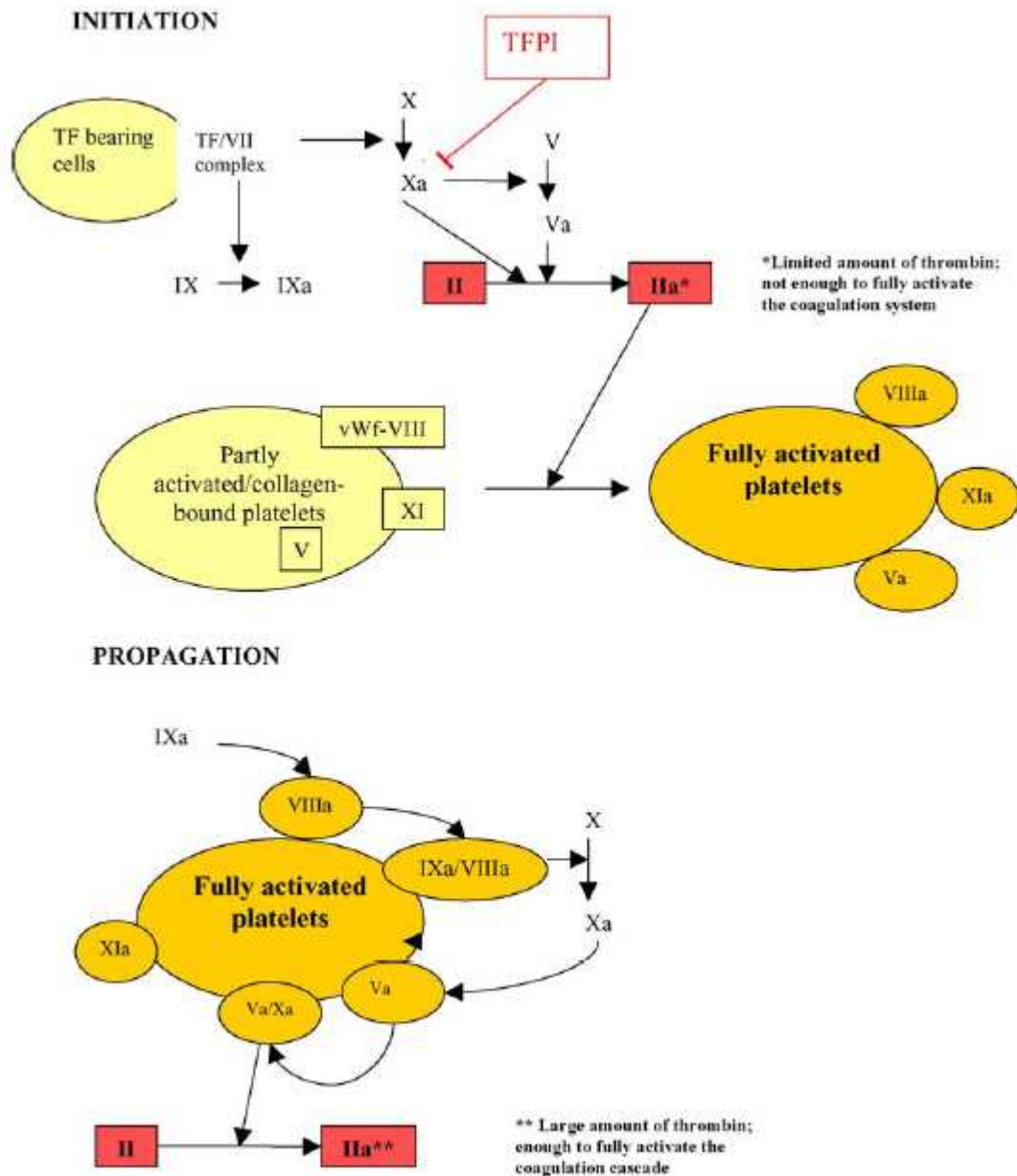


Figure 2 : Initiation de l'hémostase.

Une lésion de la paroi vasculaire permet le contact entre le plasma et le facteur tissulaire. Les plaquettes adhèrent au niveau du site de lésion et deviennent activées. Dans la phase d'initiation, FVII et le facteur tissulaire sont activés. Le complexe FVII/TF active le FIX et le FX, et ce dernier active le FV. Les facteurs Xa et Va clivent la prothrombine et génèrent alors la thrombine. Les plaquettes fixées au collagène et partiellement activées deviennent davantage activées par la petite quantité de thrombine générée. Dans la phase de propagation, les plaquettes complètement activées libèrent du FV activé à son tour par le FXa et la thrombine. De plus, la thrombine libère le FVIII du vWF et active le FXI fixé à la surface des plaquettes. Le FX est recruté par les plaquettes et activé par le complexe FIXa/VIIIa. Le complexe FXa/Va à la surface des plaquettes génère une quantité suffisante de thrombine et permet la formation d'un clou hémostatique stable (Ajjan et Grant, 2006 [2]).

1.2. Activation de la coagulation plasmatique.

La coagulation plasmatique résulte de l'action des différents facteurs de la coagulation :

- cofacteurs sans activité enzymatique pour les facteurs V et VIII,
- zymogènes de sérine protéases pour les facteurs II, VII, IX et X d'une part et les facteurs XI, XII et prékallikréine d'autre part,
- zymogène d'une transglutaminase pour le facteur XIII.

Les zymogènes sont activés par scission protéolytique d'une ou deux liaisons peptidiques qui démasquent la partie C terminale de la molécule portant le site catalytique caractéristique.

Génération de thrombine.

La génération de thrombine est la résultante d'une succession d'étapes (figure 2) :

- la lésion pariétale entraîne l'exposition de la thromboplastine tissulaire ou facteur III. Le facteur VII se fixe sur ce support, change de conformation ce qui augmente considérablement son activité et forme le complexe facteur tissulaire / facteur VII (FT-VII).
- Le facteur VII est activé en facteur VIIa par un mécanisme qui demeure encore mal connu. Toutefois, son activation augmente la production de facteur Xa qui forme alors, avec le facteur 3 plaquettaire et le calcium, un complexe prothrombinase. Ce dernier hydrolyse alors les premières molécules de prothrombine ou facteur II, en thrombine ou facteur IIa [3],
- Les molécules de thrombine ainsi produites vont intervenir dans une boucle de rétrocontrôle. Elles vont stimuler les plaquettes et permettre leur recrutement [4], puis activer les facteurs V [5] et VIII [6]. Ceci va permettre d'augmenter de façon explosive la génération de thrombine, d'activer le facteur XI renforçant ainsi sa propre production [7] et activer d'autres types cellulaires participant à la réaction inflammatoire, au remodelage vasculaire et à la cicatrisation,

- Le facteur VIIa hydrolyse également le facteur IX. Cette voie d'activation, lente à se mettre en place mais très importante quantitativement si la concentration en facteur tissulaire est faible, est appelée boucle de Josso. Le facteur IXa associé au facteur 3 plaquettaire, à du calcium et au facteur VIIIa forme le complexe ténase qui à son tour hydrolyse le facteur X ; le facteur Xa formé participe à la formation de prothrombinase [8],
- Le facteur XI est aussi activé suite au contact des protéines plasmatiques avec le sous-endothélium. Ces protéines dites de la phase contact sont d'une part des zymogènes de sérine protéases comme le facteur XII et la prékallikréine et d'autre part un cofacteur, le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) [9].

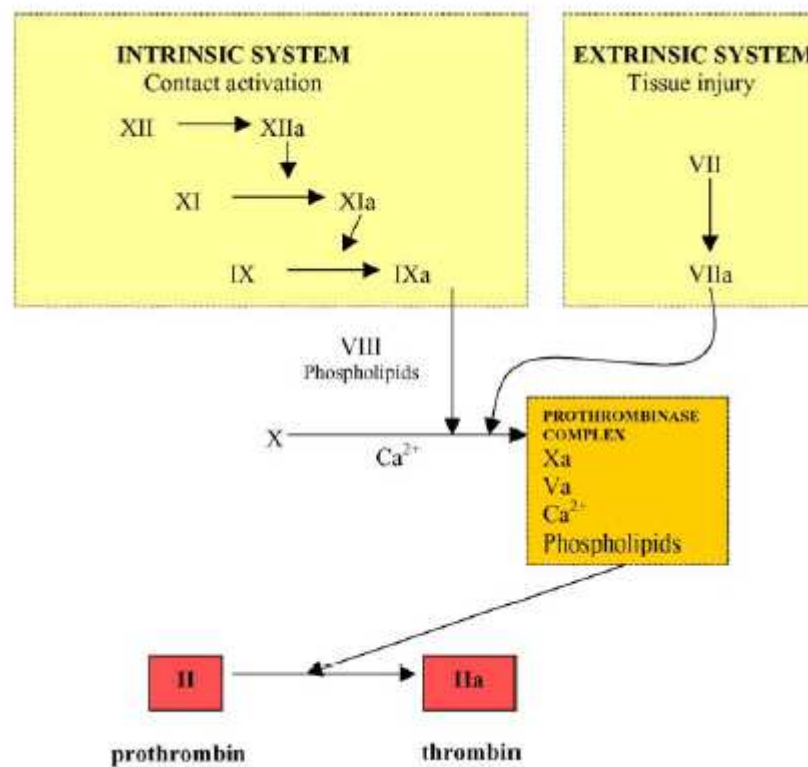


Figure 3 : Représentation classique de la cascade de la coagulation.
(Ajjan et Grant, 2006 [2]).

Transformation du fibrinogène en fibrine.

La thrombine clive le fibrinogène soluble, glycoprotéine composée de trois paires de chaînes polypeptidiques, au niveau des extrémités N terminales de ces chaînes [10]. Des fibrinopeptides A et B de masse moléculaire respective de 2000 et 2400 sont alors libérés. La molécule change de conformation et ses charges électriques sont modifiées : c'est un monomère de fibrine.

Les monomères de fibrine vont ensuite s'associer par des liaisons hydrogènes pour constituer un réseau de fibrine encore peu stable. Le réseau de fibrine sera alors stabilisé par des polymérisations longitudinales et transversales. Le facteur XIIIa activé par la thrombine étant une transglutaminase, il établit des liaisons covalentes γ -glutamine-lysine entre les chaînes γ de deux monomères de fibrine adjacents et entre les chaînes α de plusieurs monomères.

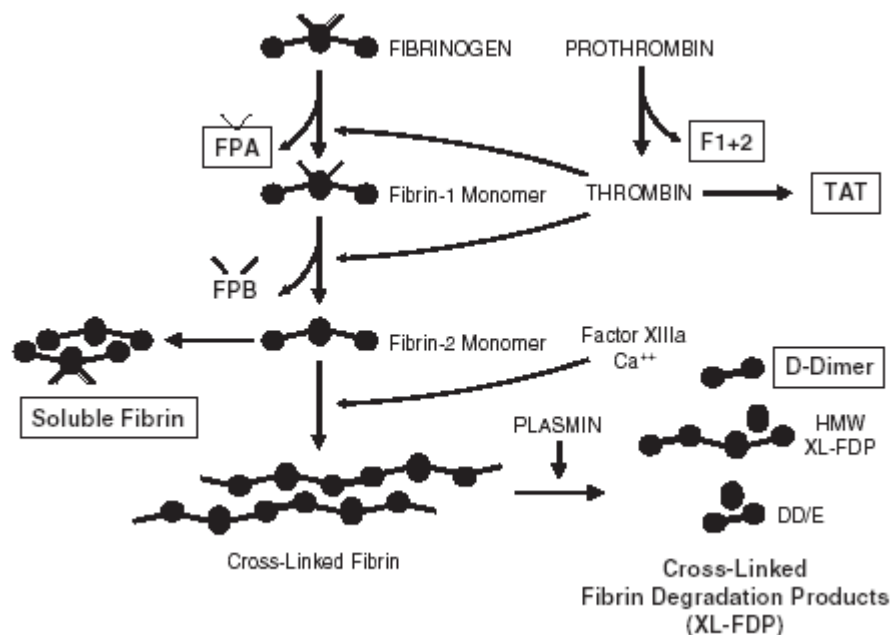


Figure 4 : Représentation schématique de la formation et de la dégradation de la fibrine.

DD/E = Complexe D-Dimère/Fragment E ; F1+2 = Fragments 1 et 2 de la prothrombine ; FPA = Fibrinopeptide A ; FPB = Fibrinopeptide B ; HMW XL-FDP = Produits croisés de dégradation de la fibrine à haut poids moléculaire ; TAT = complexe thrombine/antithrombine (Van der Putten et al., 2006 [1]).

1.3. Fibrinolyse.

Le système fibrinolytique permet à la fois de limiter la propagation du caillot qui s'étend naturellement suite aux nombreux cycles de rétrocontrôle positif et de dissoudre ce caillot une fois la lésion réparée.

Une enzyme plasmatique inactive, le plasminogène, est intégrée dans la composition du caillot en formation. Cette enzyme protéolytique dissout le caillot de fibrine permettant ainsi la reperméabilisation des vaisseaux.

1.4. Régulation de la coagulation.

La réponse hémostatique étant déclenchée par une lésion des vaisseaux sanguins, des systèmes de régulation négative sont nécessaires afin d'éviter une accumulation excessive de thrombine à distance de la brèche vasculaire et donc une hypercoagulation.

Ces inhibiteurs physiologiques sont d'une grande importance puisqu'un déficit constitutionnel en antithrombine, en protéine C ou en protéine S augmente le risque de thrombose veineuse.

1.4.1. Antithrombine.

L'antithrombine, glycoprotéine de 63000 Da, est une serpine capable de neutraliser *in vitro* les sérine-protéases de la coagulation à l'exception du facteur VIIa. Après liaison aux héparanes sulfates dans sa partie N-terminale, l'antithrombine ayant changé alors de conformation peut inhiber ses enzymes cibles par liaison dans sa partie C-terminale.

Les héparanes sulfates possèdent un motif de cinq résidus : le pentasaccharide. Ce motif va se lier à des domaines spécifiques de l'antithrombine qui avait jusqu'à présent une structure en hélice. Cette fixation entraîne un changement de conformation exposant ainsi la boucle réactive de l'antithrombine qui contient une arginine reconnue par les enzymes cibles [11]. Après clivage enzymatique, ces enzymes sont inhibées de façon irréversible car elles forment un complexe covalent avec l'antithrombine.

In vivo, l'antithrombine peut inhiber les enzymes de la coagulation qui ne sont pas liées aux phospholipides de la membrane plaquettaire.

Les complexes formés sont dégradés dans les lysosomes des hépatocytes après internalisation, les héparanes sulfates étant au préalable recyclés [12].

1.4.2. Système protéine C.

Le système protéine C comprend plusieurs molécules comme la protéine C, la protéine S, la thrombomoduline, le facteur du complément C4b BP, des inhibiteurs protéiques, des récepteurs membranaires, et a pour cibles les facteurs Va et VIIIa [13].

La protéine C est activée à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire par un complexe thrombine/calcium et ceci après fixation sur le récepteur membranaire thrombomoduline. La protéine C activée forme alors un complexe stoechiométrique avec la protéine S libre qui joue un rôle de cofacteur. Ce complexe va se lier à son tour sur le facteur 3 plaquettaire. Il inactive alors les facteurs Va et VIIIa par protéolyse ce qui ralentit la génération de thrombine [14]. Ces systèmes de régulation sont très complexes puisque ce système protéique C est lui-même régulé par au moins deux inhibiteurs connus : l'inhibiteur de la protéine C et l' α 1-antitrypsine.

1.4.3. Inhibition de la voie du facteur tissulaire.

Les cellules endothéliales produisent un inhibiteur qui est sécrété dans le plasma sanguin et qui régule la voie du facteur tissulaire : le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor). Cet inhibiteur de sérine protéases possède trois domaines de type Kunitz et peut se lier au facteur Xa, au complexe FT-VIIa et aux lipoprotéines.

Lorsqu'une faible quantité de facteur X est activée, le TFPI se fixe sur le facteur Xa avant de s'associer au complexe FT-VIIa pour former un complexe quaternaire inactif, bloquant ainsi la production des facteurs Xa et IXa [15].

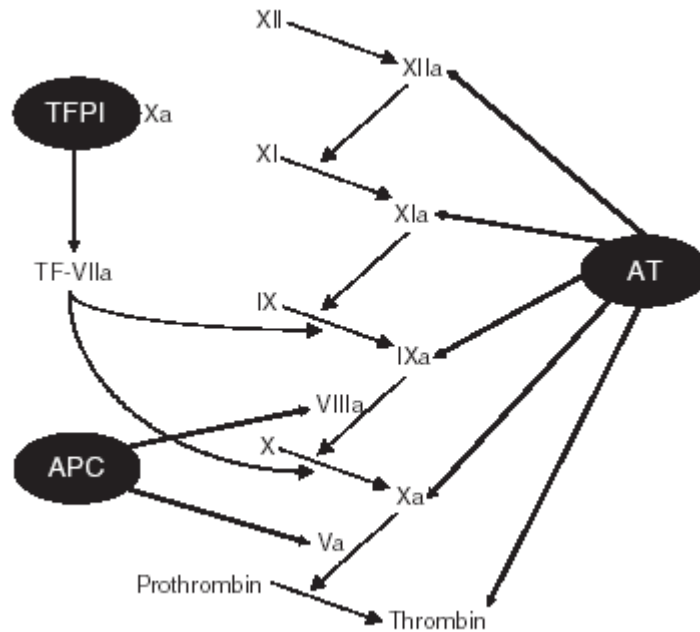


Figure 5 : Mécanismes anti-thrombotiques importants.

AT = Antithrombine ; TFPI = Tissue Factor Pathway Inhibitor ; APC = Activated Protein C (Van der Putten, 2006 [2]).

1.4.4. Autres inhibiteurs.

D'autres molécules impliquées dans la régulation de la génération de thrombine ont été identifiées mais leur intervention est plus limitée.

L' α 2-macroglobuline intervient pour environ 25% dans l'inhibition de la thrombine. Elle forme un complexe avec toutes les endopeptidases connues et peut donc inactiver la thrombine et la kallikréine.

Le cofacteur II de l'héparine est une serpine neutralisant le facteur IIa préalablement activé par le dermatane sulfate présent dans les matrices extracellulaires. L'importance physiologique de cette régulation reste néanmoins faible.

La lipocortine V est une protéine de la famille des annexines, synthétisée par les cellules endothéliales et capable de déplacer les protéines vitamine K dépendantes de la surface des phospholipides anioniques. Les complexes d'activation sont alors rendus inopérants. Toutefois, cette activité anticoagulante n'est obtenue physiologiquement que lorsque la cellule endothéliale est endommagée [16].

1.5. La maladie thromboembolique veineuse.

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) se présente sous deux aspects : la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP), complication immédiate de la TVP. La MTEV représente la quatrième cause de décès dans les pays occidentaux et la troisième cause de mortalité cardiovasculaire derrière l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral. Malgré les progrès de la prophylaxie anti-thrombotique, la maladie thromboembolique veineuse, par sa morbidité et sa mortalité, représente toujours un enjeu de santé publique.

1.5.1. Épidémiologie.

Selon les sources, l'incidence annuelle de la maladie thromboembolique veineuse varie de 180/100 000 (120/100 000 (TVP) et 60/100 000 (EP)) à 619/100 000 (518/100 000 (TVP) et 101/100 000 (EP)) dans la population générale française selon que les études épidémiologiques furent réalisées avec des critères exhaustifs et objectifs ou sur un mode déclaratif. Chez les patients hospitalisés, les prévalences des TVP et des EP ont été respectivement estimées à 1,4 % et à 0,17 %. Aussi, 52,3 % des patients hospitalisés pour la prise en charge d'une MTEV confirmée avaient une TVP associée à une EP. Il est important de noter que la prévalence des TVP asymptomatiques à l'admission des patients hospitalisés est estimée à 5,5 % et qu'en ambulatoire la fréquence des EP sans manifestation clinique se situerait entre 40 et 50 %. La TVP et l'EP seraient responsables au niveau national de taux de mortalité respectifs de 1,9/1 000 000 et de 7,2/100 000 [17].

Aux Etats-Unis, la TVP touche près de 2 millions de personnes et l'EP près de 600 000 personnes par an dont un tiers décèdera des suites de cette maladie [18]. La prévalence de la MTEV est estimée à 108/100 000 dans la population blanche et 78/100 000 dans la population noire. L'incidence de la maladie augmente exponentiellement avec l'âge mais est néanmoins retrouvée plus fréquemment chez les hommes (114/100 000) que chez les femmes (105/100 000). Si l'incidence de la MTEV ne semble pas avoir changé de façon significative durant les derniers 25 ans, il est à noter la progression de l'EP dans les cas de MTEV chez les hommes comme chez les femmes [19]. La MTEV représente un coût de l'ordre de 1,5 milliard de dollars par an à la société américaine.

Sur le plan international, les incidences annuelles de la TVP et de l'EP sont respectivement comprises entre 60 à 100 pour 100 000 et entre 23 et 107 pour 100 000 et la MTEV serait responsable d'une mortalité estimée entre 0,5 et 6,5 % [17].

1.5.2. Physiopathologie.

Malgré son incidence importante dans la population générale, la physiopathologie de la maladie thromboembolique demeure assez méconnue. L'une des plus importantes avancées dans la compréhension de la maladie thromboembolique est attribuée à Rudolph Virchow qui décrit dès 1856 les principaux déterminants pathogéniques de la TVP et de l'EP, toujours valables de nos jours : altérations de la paroi vasculaire, altérations du flux sanguin et hypercoagulabilité [20-22].

1.5.2.1. Thrombogénèse veineuse.

Selon les postulats de Virchow, trois facteurs sont d'une importance primordiale dans le développement de la thrombose veineuse : les anomalies du débit sanguin, les anomalies du sang et les lésions de la paroi vasculaire. Toutefois, il est maintenant clairement établi que l'importance de ces trois facteurs varie d'un patient à un autre. Même si l'influence des lésions endothéliales sur le phénomène de thrombose est mise de plus en plus en évidence, une lésion manifeste de la paroi veineuse ne constitue ni une condition nécessaire ni une condition suffisante pour générer une thrombose. De même, une stase veineuse seule, en l'absence de faibles taux de facteurs activés de la coagulation, demeure un stimulus insuffisant de la thrombose veineuse. Cependant, la stase veineuse peut favoriser l'adhésion leucocytaire, l'hypoxie du tissu endothéliale et l'accumulation des facteurs activés de la coagulation. Un déséquilibre de l'activation du système de la coagulation semble être le facteur le plus important et à l'origine de nombreux épisodes de thrombose veineuse profonde aiguë. Ce déséquilibre est généralement associé à de nombreux facteurs de risque thrombotique, dont l'âge, le cancer, la chirurgie, un traumatisme, les états d'hypercoagulabilité primaire, la grossesse, ou la contraception orale. Les thrombi des extrémités inférieures proviennent de déséquilibres de la coagulation

localisés dans les zones de stase veineuse – au niveau des sinus veineux soléaires, des nids valvulaires, ou aux confluences veineuses [23]. Sous des conditions locales favorables à la propagation, la croissance se réalise vers l'extérieure de manière appositionnelle à partir de la tête du thrombus où les plaquettes sont entourées d'un réseau de globules rouges, de fibrine et de leucocytes. Par convention, les thromboses sont classées comme « distales » lorsqu'elles sont limitées aux veines sous poplitées et comme « proximales » lorsqu'elles siègent en poplitée ou au dessus. Les thromboses sont dites « superficielles » lorsqu'elles touchent le réseau superficiel extra-aponévrotique, constitué des troncs saphènes (grande et petite) et de leurs affluents. Les thromboses sont dites « profondes » lorsqu'elles touchent soit les veines collectrices intermusculaires, accompagnant les artères (fibulaires, tibiales antérieures et postérieures, poplités, fémorales superficielles et communes, iliaques), soit les veines intramusculaires (gastrocnémiennes, soléaires, fémorales profondes, circonflexes) [24]. Il est à noter que les veines distales constituent les sites les plus communément retrouvés à l'origine d'une thrombose.

Après thrombose de la veine, une réponse inflammatoire aiguë à chronique survient au niveau de la paroi veineuse et aboutit à l'amplification du thrombus, à son organisation et à sa recanalisation. L'augmentation initiale des neutrophiles dans la paroi veineuse est suivie par celle des monocytes et des macrophages. Cytokines, chimiokines et facteurs pro-inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) favorisent l'inflammation. La réponse inflammatoire définitive dépendra de la balance entre les médiateurs pro- et anti-inflammatoires. Les sélectines (P- et E-sélectine) semblent être d'une importance cruciale dans ces processus et sont les premières glycoprotéines à la surface des cellules endothéliales activées et des plaquettes [25] à voir leur expression induite. Cette induction des sélectines est associée à la formation de microparticules, fragments de membranes cellulaires riches en phospholipides anioniques et en récepteurs généralement retrouvés à la surface des plaquettes activées [26]. Les microparticules circulantes, principalement d'origine plaquettaire, fournissent dans le compartiment vasculaire des surfaces phospholipidiques additionnelles, riches en phosphatidyl sérine, permettant l'assemblage des complexes enzymatiques de la coagulation tenase (Facteurs VIIIa/IXa) et prothrombinase (Facteurs Va/Xa) et la génération de thrombine. A la surface des microparticules et des cellules stimulées, la phosphatidyl sérine augmente considérablement l'activité procoagulante du facteur tissulaire, initiateur cellulaire

majeur de la coagulation. Les microparticules constituent la quasi totalité de l'activité facteur tissulaire circulante. Les microparticules et la thrombine générée participent à l'amplification de la réponse hémostatique en activant les différentes lignées cellulaires du compartiment vasculaire. Par le biais des microparticules, les cellules stimulées disséminent dans le flux des protéines membranaires fonctionnelles et des protéines adhésives ou cytoplasmiques. Ces caractéristiques membranaires favorisent la capture à distance du foyer d'émission par le biais d'interaction ligand/récepteurs, expliquant la formation de microparticules hybrides par multiples fusions membranaires. Les cellules stimulées notamment par la thrombine sont capables d'augmenter la synthèse de cytokines et de protéines membranaires comme les sélectines, (P-sélectine, E-sélectine, L-sélectine). Dans le cas des cellules endothéliales, les microparticules dérivées portent le facteur tissulaire. La P-sélectine soluble libérée de la membrane par protéolyse est provésiculante. Par liaison avec son ligand PSGL-1, elle permet de recruter les microparticules leucocytaires porteuses du facteur tissulaire au sein du thrombus. La P-sélectine est retrouvée dans différents réservoirs cellulaires (plaquettes, cellules endothéliales) et dans les microparticules circulantes [27]. Moins connues, les microparticules leucocytaires sont associées à l'activation des cellules endothéliales et à l'induction de l'expression des gènes des cytokines.

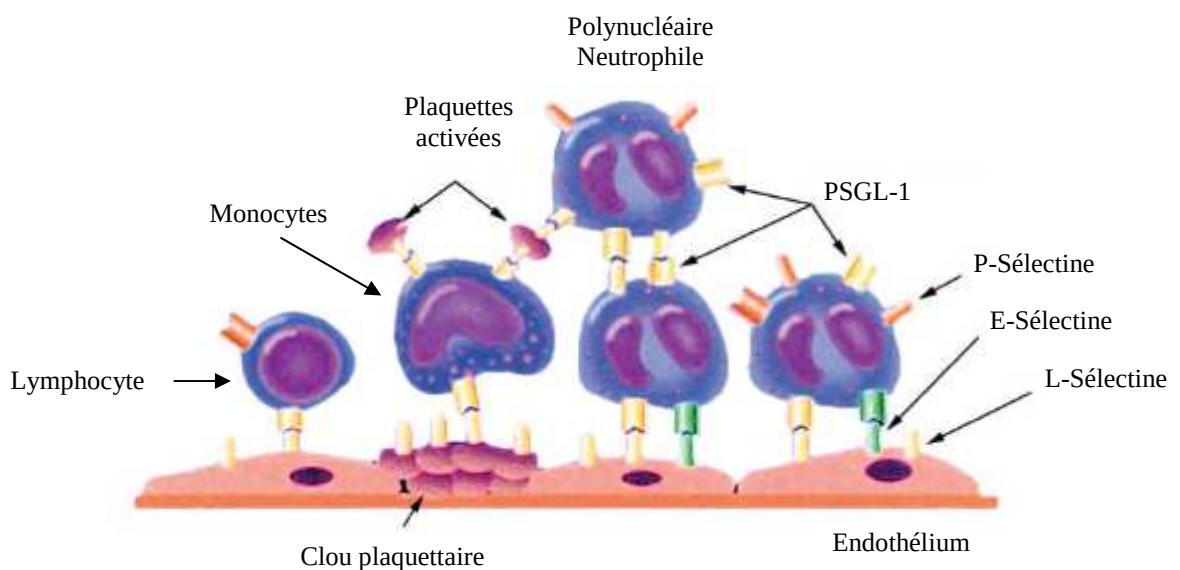


Figure 6 : Mécanismes inflammatoires et thrombose.

(d'après Wakefield et al., 2008 [28]).

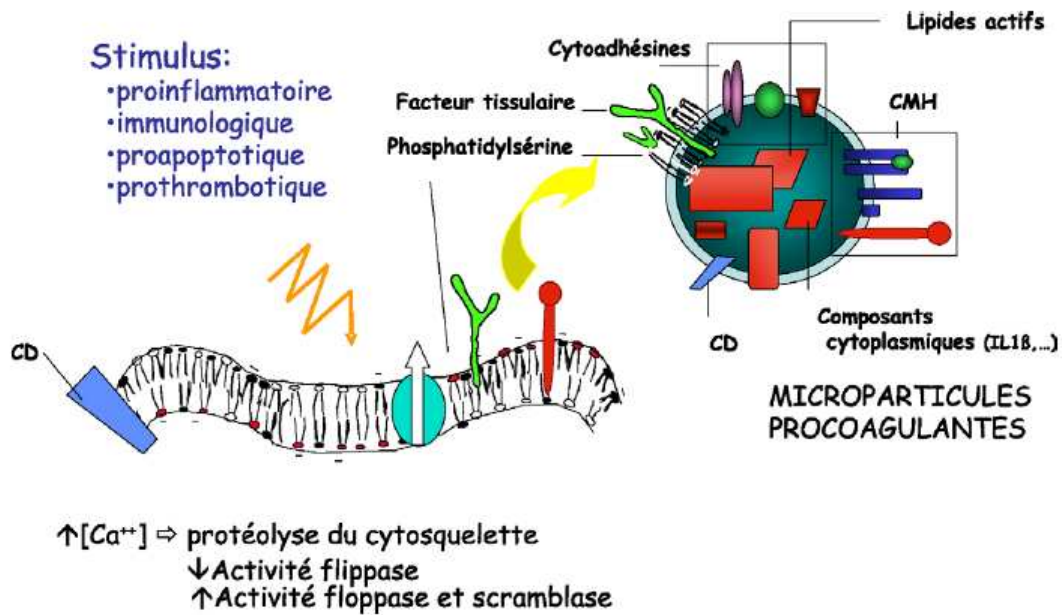


Figure 7 : Génération d'une microparticule.

(d'après Morel et al., 2005 [27]).

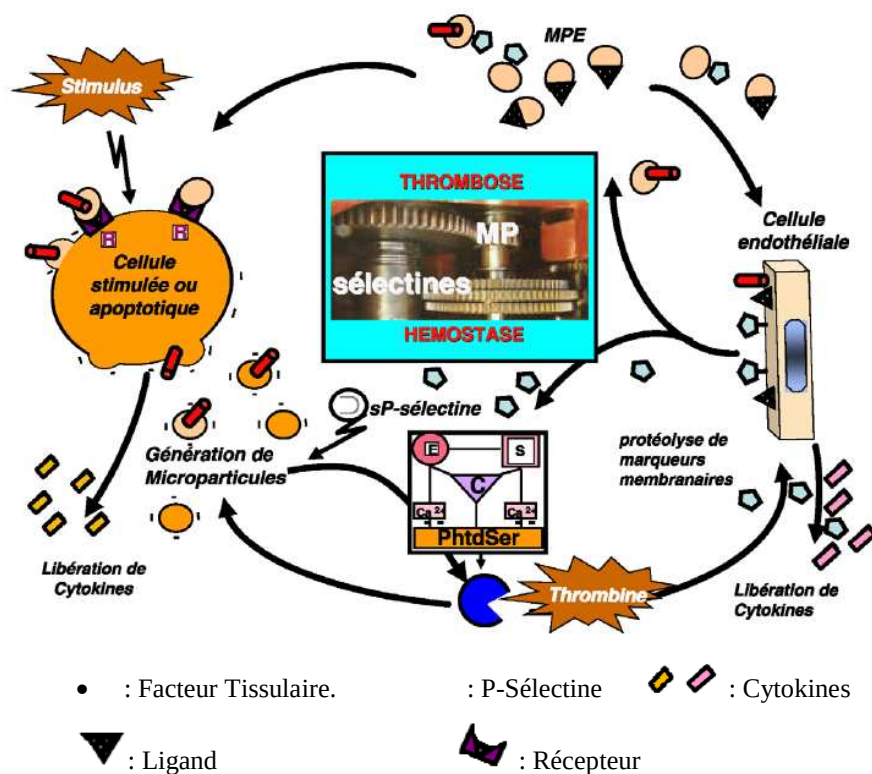


Figure 8 : Microparticules et sélectines.

Effecteurs circulants dans la réponse cellulaire hémostatique ou thrombotique (d'après Morel et al., 2005 [27]).

1.5.2.2. Résolution du thrombus.

Après un épisode aigu de thrombose veineuse profonde, la lumière vasculaire est le plus souvent rétablie. Dans la majorité des cas, la lyse du thrombus est totale mais s'accompagne d'un épaissement de la paroi veineuse et d'une diminution ou d'une perte de la compliance veineuse. Leucocytes, chimiokines et cytokines pro-inflammatoires sont impliqués dans le processus de résolution du thrombus et dans la réparation de la paroi veineuse. Ce processus est semblable au phénomène de cicatrisation et se décompose en différentes phases : une phase d'angiogénèse et d'influx des polynucléaires neutrophiles et des monocytes suivis par une phase de fibrose. Le signal de l'influx leucocytaire est réalisé par les chimiokines, petites protéines de signalisation essentielles pour l'activation et la chimiotaxie des leucocytes et de leurs précurseurs circulants [29]. Les premières cellules leucocytaires retrouvées dans le thrombus sont les polynucléaires neutrophiles qui contribuent tant à la lyse du thrombus qu'au dommage de la paroi vasculaire. Les polynucléaires neutrophiles sont essentiels dans la résolution précoce du thrombus en raison de leurs activités de fibrinolyse et de collagénolyse. Cependant, si les polynucléaires neutrophiles demeurent essentiels dans les étapes précoces de la résolution du thrombus, les monocytes sont essentiels dans les étapes plus tardives. L'influx monocyttaire au sein du thrombus atteint son pic huit jours après le début de la thrombogénèse et est corrélé avec l'élévation des taux de protéine chimioattractive monocyttaire (MCP-1) responsable du chimiotactisme et de l'activation des monocytes. Ces cellules, par l'intermédiaire de médiateurs fibrinolytiques et de cytokines, semblent jouer un rôle particulièrement important dans l'organisation et la reperméabilisation du thrombus. Les monocytes associés au thrombus constituent également une source primaire de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et de l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) [28]. Enfin, les précurseurs circulants des cellules endothéliales semblent également avoir un rôle dans le processus de réparation vasculaire, récemment mis en évidence, par leur action tant sur la ré-endothélisation vasculaire que sur la fibrose tissulaire. Au niveau du système veineux, ces précurseurs sont recrutés afin d'éliminer les thrombi et de contribuer à la néovascularisation et à la résolution du thrombus.

La réponse chronique à l'atteinte vasculaire se caractérise par la prolifération des cellules médiales et par des modifications de la matrice protéique. Cette réponse se traduit par un épaississement de la paroi veineuse et une perte de compliance ; conditions plus propices à une nouvelle thrombose. Les premières cellules mises en jeu dans cette réponse sont les cellules musculaires lisses vasculaires qui interviennent dans la réponse fibroproliférative et contribuent à l'influx des leucocytes. Ces cellules interviennent également dans le métabolisme du collagène par la libération de différentes protéinases et de facteurs de croissance. Les leucocytes agissent également sur la matrice protéique par l'intermédiaire de facteurs de croissance, de métalloprotéinases matricielles (MMP) et de médiateurs pro-inflammatoires. Après un épisode de TVP, le taux de différents facteurs augmente dans la paroi veineuse tels que le facteur nécrosant des tumeurs α (TNF α) ou l'interleukine 1 β (IL-1 β) et stimulent l'activité des pro-MMP. Les protéinases les plus importantes sont les MMP-2 et MMP-9 qui jouent un rôle dans la dégradation du tissu conjonctif vasculaire. Les polynucléaires neutrophiles libèrent une sérine protéinase, l'élastase, qui participe non seulement à la dégradation de l'élastine mais également à l'activation des MMP du système vasculaire. Pour contrebalancer la dégradation des protéines matricielles, l'inhibition des MMP est réalisée par des inhibiteurs naturels des MMP nommés inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP) et conduit à une importante accumulation du collagène. La plasmine activée participe à la thrombolyse mais est également un activateur des MMP. Au niveau du système veineux, l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) est l'activateur de plasminogène le plus important. Le système plasmine/plasminogène semble plus important lors de la résolution tardive du thrombus par son action sur l'influx monocyttaire.

L'atteinte précoce de la paroi veineuse issue de la TVP est associée à une augmentation des médiateurs profibrotiques tels que le facteur de croissance transformant β (TGF- β), l'interleukine 13 (IL-13) ou la protéine chimioattractrice monocyttaire (MCP-1). Ces médiateurs sont présents au sein de la paroi veineuse et du thrombus et participent au processus de fibrose. La perte de l'endothélium semble aussi contribuer à la fibrose de la paroi veineuse et à la survenue de thromboses récidivantes [29]. En l'absence de propagation du thrombus, ce processus aboutit à la restauration de la lumière vasculaire ; cependant il est à noter la présence d'une plaque fibro-élastique décrivant un léger relief à l'endroit où le thrombus initial était localisé.

Ces processus peuvent être accompagnés par des altérations de la compliance veineuse et du développement d'incompétence valvulaire.

Malgré l'importance des systèmes de recanalisation, il est à noter que les récurrences sont fréquentes. Les épisodes thromboemboliques veineux associés à un facteur de risque majeur et réversible présentent un faible risque de récurrence symptomatique, de l'ordre de 3 % au cours de la première année et de 10 % dans les cinq ans. Inversement, ce même risque de récurrence est augmenté, de l'ordre de 5 % au cours de la première année et de 15 % dans les cinq ans chez les patients à risque associé moins important. Dans le cas des patients présentant une maladie thromboembolique veineuse idiopathique, le risque de récurrences est relativement élevé, de l'ordre de 10 % au cours de la première année et de 30 % dans les cinq ans. Ainsi, l'évaluation des facteurs de risque associé peut constituer une source d'information quant au pronostic de récurrence. Enfin, il est intéressant de noter que la récurrence d'un épisode thromboembolique présente une manifestation généralement identique à celle de l'épisode initial. Ainsi, une thrombose veineuse profonde engendrera une autre thrombose veineuse profonde et une embolie pulmonaire engendrera une autre embolie pulmonaire [23].

1.5.3. Complications.

1.5.3.1. L'embolisme pulmonaire.

L'embolisme pulmonaire est la complication aigüe la plus fréquente après un épisode de TVP et il est important de rappeler que cette pathologie est responsable de 10 % des décès hospitaliers, qu'elle survient dans 76 % des cas chez des patients n'ayant subi aucune chirurgie et que 75 % des embolies pulmonaires sont asymptomatiques.

L'embolie pulmonaire survient le plus souvent à la suite d'une thrombose veineuse du bassin ou des membres inférieurs. Le thrombus se délodge alors de ces veines et entre dans les artères pulmonaires où il cause des troubles sur le plan hémodynamique et au niveau des échanges gazeux [30]. La réponse hémodynamique à la suite de l'embolie pulmonaire est déterminée par la taille de l'embolie, l'état cardio-pulmonaire sous-jacent du patient et les adaptations compensatoires neurohumorales. L'embolie pulmonaire aigüe conduit non seulement à une obstruction physique du

système circulatoire pulmonaire mais aussi aux augmentations de la résistance vasculaire pulmonaire et de la postcharge ventriculaire droite qui résultent de la libération de facteurs vasoconstricteurs et de l'hypoxémie. L'augmentation brutale de la postcharge ventriculaire peut causer une dilatation et une hypokinésie du ventricule droit, une régurgitation tricuspide et finalement aboutir à une insuffisance du ventricule droit. Cette insuffisance ventriculaire droite peut rapidement évoluer vers une hypotension artérielle systémique et vers un arrêt cardiaque. La surpression au niveau du ventricule droit peut également aboutir au cours de la diastole à un déplacement du septum interventriculaire vers le ventricule gauche et à son aplatissement diminuant ainsi l'efficacité de remplissage du ventricule gauche. Cette manifestation se traduit également par une altération du flux transmitral mise en évidence par échocardiographie doppler et par une ischémie du tissu cardiaque qui résulte de la compression de l'artère coronaire droite par le ventricule droit. L'hypoxémie artérielle et l'augmentation du gradient d'oxygène alvéolo-artériel sont les deux anomalies des échanges gazeux les plus fréquemment rencontrées ; conséquence d'une redistribution des rapports perfusion/ventilation. L'atélectasie, résultant d'une perte du surfactant alvéolaire ou d'hémorragies alvéolaires, peut également contribuer à la diminution de ces rapports. L'atteinte des échanges gazeux peut aussi se traduire par une augmentation du volume mort total et l'existence d'un shunt droit-gauche. L'augmentation des volumes morts diminue l'élimination du dioxyde de carbone et se traduit par une augmentation de la ventilation minute. L'hyperventilation peut contribuer à une hypocapnie et à une alcalose respiratoire. Enfin, la présence d'une hypercapnie reflète une embolie pulmonaire massive marquée par une augmentation des volumes morts physiologique et anatomique. Le volume alvéolaire à chaque respiration est fortement diminué et les muscles ventilatoires, incapables de suivre l'augmentation nécessaire de la ventilation minute, ne peuvent maintenir une pression artérielle normale [31].

1.5.3.2. Le syndrome post-thrombotique.

Le syndrome post-thrombotique (SPT) ou maladie post-thrombotique est la complication tardive la plus importante après un épisode aigu de TVP. On estime que 40 à 60 % des patients ayant fait une TVP vont développer un syndrome post-thrombotique [32]. Les manifestations sévères et les ulcérations peuvent

respectivement survenir chez 7 à 23 % et 4 à 6 % des patients. L'évolution naturelle après TVP conditionne les lésions anatomiques et les troubles hémodynamiques du SPT. On sait cependant que la précocité de la mise en œuvre du traitement anticoagulant et que sa poursuite à dose efficace minimisent l'importance et surtout l'extension des lésions anatomiques et les désordres physiopathologiques qui en découlent. Les lésions peuvent toucher le réseau veineux profond comme le réseau superficiel et peuvent atteindre la paroi veineuse (épaississement et perte de compliance) ou les valves veineuses (insuffisance valvulaire). L'hypertension veineuse ambulatoire et les mécanismes hémodynamiques sous-jacents d'insuffisance veineuse chronique peuvent résulter d'un reflux veineux, d'une obstruction veineuse ou de leur association. Le dysfonctionnement de la pompe du mollet aggrave le reflux et l'obstruction. Les facteurs de la manifestation post-thrombotique ne sont pas tous connus. Cependant, parmi ces facteurs, peuvent être cités le taux de recanalisation, les récurrences de thrombose, la part de reflux ou encore la distribution anatomique des reflux et des obstructions. Du point de vue clinique, le SPT se manifeste par des douleurs (pesanteur et fatigabilité à la marche), des œdèmes des membres inférieurs, des varices, des troubles trophiques (dermoépidermites, hypodermes ou ulcères) et des troubles musculo-articulaires avec rétraction des muscles du mollet et ankylose de l'articulation de la cheville.

1.5.4. Prévention de la maladie thromboembolique.

La prévention de la maladie thromboembolique peut être réalisée selon deux approches. La première approche tend à apprécier le risque de MTEV pour chaque patient et à prendre en compte leurs prédispositions et les risques associés à leur pathologie ou leur thérapeutique. La seconde approche consiste à mettre en œuvre la même thromboprophylaxie pour tous les patients d'un même groupe cible. Cette seconde approche semble être préférée du fait d'un grand nombre d'études réalisées sur des groupes de population à risque et d'une réalisation pratique plus aisée permettant ainsi une meilleure participation des praticiens à cette prévention qui, rappelons-le, reste faible [33].

Suivant les cas, différents types de thromboprophylaxie sont possibles : les méthodes de thromboprophylaxie mécanique ou médicamenteuse avec l'utilisation de des héparines, des antagonistes de la vitamine K, ou bien encore du fondaparinux.

Tableau 1: Stratification du risque de thrombose chez les patients chirurgicaux en l'absence de thromboprophylaxie.

(d'après Leclerc et al., 1999 [34]).

Catégorie de risque	Thrombose du mollet*	Thrombose proximale*	Embolie pulmonaire fatale	Options prophylactiques
Bas	<10 %	<1 %	<0,01 %	
Chirurgie abdominale ou pelvienne non compliquée, âge <40 ans, durée <30 minutes sous anesthésie générale et sans autre facteur de risque**				Ambulation précoce Bas anti-emboliques
Modéré	10-40 %	2-10 %	0,1-0,7 %	
Chirurgie abdominale ou pelvienne non compliquée, âge >40 ans, durée >30 minutes sous anesthésie générale et sans autre facteur de risque**				Héparine non fractionnée à faible dose ou dose intermédiaire Héparine de bas poids moléculaire Méthodes mécaniques
Chirurgie abdominale ou pelvienne chez femmes <40 ans utilisant des contraceptifs oraux				
Chirurgie thoracique autre que cardiaque				Héparine non fractionnée à faible dose ou dose intermédiaire Héparine de bas poids moléculaire Méthodes mécaniques
Chirurgie prostatique				Méthodes mécaniques
Ménisectomie				Héparine de bas poids moléculaire
Neurochirurgie				Héparine de bas poids moléculaire ? Méthodes mécaniques
Élevé	40-80 %	10-30 %	1-5 %	
Chirurgie abdominale ou pelvienne chez patients >40 ans et avec autres facteurs de risque**				Héparine de bas poids moléculaire Héparine standard en dose intermédiaire ou ajustée Combinaison de méthodes mécaniques et pharmacologiques
Arthroplastie de la hanche ou du genou				Héparine de bas poids moléculaire Anticoagulants oraux
Fracture de la hanche				Héparine de bas poids moléculaire Anticoagulants oraux
Blessés médullaires				Méthodes mécaniques Héparine de bas poids moléculaire
Polytraumatisés				Héparine de bas poids moléculaire Héparine standard en dose ajustée Combinaison de méthodes mécaniques et pharmacologiques
Amputation de la jambe				Héparine de bas poids moléculaire ?

* Évaluation phlébographique ou par scintigraphie au fibrinogène marqué.

** Facteurs de risque : Antécédents de thrombose veineuse, cancer, thrombophilie (diminution de l'activité d'antithrombine III, protéine C ou S, facteur V Leiden, mutation du gène de la prothrombine, syndrome antiphospholipide, déficience fibrinolytique, dysfibrinogénémie), âge avancé, immobilisation prolongée, insuffisance cardiaque.

La thromboprophylaxie mécanique inclut la marche, lorsque celle-ci est possible, les bas de contention et la compression pneumatique intermittente. Cette thromboprophylaxie a pour objectif de diminuer la stase veineuse des membres inférieurs. Si cette approche se révèle moins efficace que l'utilisation d'anticoagulants, elle présente néanmoins l'avantage de ne pas provoquer de saignement. Ainsi l'utilisation de la thromboprophylaxie mécanique est recommandée en première intention chez les patients présentant des risques élevés de saignement ou en complément du traitement anticoagulant. Cependant, une attention toute particulière doit être portée quant à une bonne compliance et à une bonne utilisation de ces méthodes.

L'héparine standard non-fractionnée (HNF), administrée à faible dose par voie sous-cutanée, 5 000 unités internationales 2 fois par jour ou 3 fois par jour, a été la méthode de choix durant de nombreuses années. Cette méthode repose sur la libération graduelle au cours du temps de l'héparine à partir du réservoir sous-cutané. Les faibles niveaux d'activité d'héparine plasmatique obtenus avec cette méthode suffisent car la prophylaxie nécessite une concentration sanguine d'héparine plus faible que dans le traitement de la thrombose établie. Les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) ont peu à peu remplacées les HNF en raison de leur meilleure biodisponibilité, d'une demi-vie plus longue (environ 3 heures) et d'un risque de thrombopénie plus faible.

L'utilisation des AVK dans la prévention de la maladie thromboembolique veineuse est essentiellement limitée aux patients « chirurgicaux » concernés par une opération orthopédique telle que la pose d'une prothèse totale de hanche ou de genou. Des travaux ont en effet démontré que ces agents ont une efficacité comparable aux HBPM dans ces deux types de chirurgie lorsque l'INR est maintenu entre 2,0 et 3,0.

Le fondaparinux (Arixtra[®]) est un pentasaccharide synthétique qui agit comme un inhibiteur pur du facteur Xa par fixation à l'antithrombine. Le fondaparinux présente l'avantage d'une demi-vie longue (18-19 heures) qui permet une administration unique journalière par voie sous-cutanée. Cependant en cas de saignements, le fondaparinux nécessite l'administration de facteur VII activé (Novoseven[®]) qui présente un coût important. Le fondaparinux est contre-indiqué chez les patients dont le poids est inférieur à 50 kg du fait d'un risque de saignement augmenté. Enfin, étant entièrement éliminé par voie urinaire, le fondaparinux est contre-indiqué chez les patients présentant des atteintes rénales sévères (clairance de la créatinine < 30 mL/min).

Les recommandations concernant la thromboprophylaxie de la maladie thromboembolique émises par l’American College of Chest Physicians sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Thromboprophylaxie de la maladie thromboembolique veineuse.
(d’après Geerts et al., 2008 [33]).

Types de Chirurgie	Nature de l’intervention et risque(s) associé(s)	Recommandations.
Chirurgie générale	Acte chirurgical mineur	Déambulation fréquente et précoce
	Acte chirurgical modérée	HBPM, HNF ou Fondaparinux
	Acte chirurgical majeur (Cancer)	HBPM, HNF 3x/j ou Fondaparinux
	Facteurs de risque multiples.	HBPM, HNF 3x/j ou Fondaparinux + Thromboprophylaxie mécanique
	Risque élevé de saignement	Thromboprophylaxie mécanique puis substitution ou association possible d’un anticoagulant lorsque diminution du risque de saignement
	Acte chirurgical majeur	Thromboprophylaxie jusqu’à la sortie de l’hôpital
	Acte chirurgical majeur à risque élevé	Thromboprophylaxie jusqu’à la sortie de l’hôpital et durant 28 jours après la sortie par HBPM
Chirurgie vasculaire	Aucun facteur de risque associé	Déambulation fréquente et précoce
	Acte chirurgical majeur + Facteurs de risque thromboembolique associés	HBPM, HNF ou Fondaparinux
Chirurgie gynécologique	Acte chirurgical mineur sans risques associés	Déambulation fréquente et précoce
	Laparoscopie	Déambulation fréquente et précoce
	Laparoscopie + Facteurs de risque thromboembolique associés	HBPM, HNF, Méthode mécanique, seul ou en association
	Acte chirurgical majeur	Thromboprophylaxie en routine jusqu’à la sortie de l’hôpital
	Acte chirurgical majeur + Risques associés	HBPM, HNF ou CPI
	Chirurgie cancéreuse ou	HBPM ou HNF 3x/j ou CPI OU HBPM ou HNF + Méthode mécanique ou Fondaparinux
	Aucun facteur de risque thromboembolique associé	Thromboprophylaxie jusqu’à la sortie de l’hôpital et durant 28 jours après la sortie par HBPM
Chirurgie urologique	Acte chirurgical à risque faible	Toute méthode de thromboprophylaxie à l’exception de la déambulation.
	Acte chirurgical urologique majeur à ciel ouvert	Thromboprophylaxie en routine HNF 2-3x/j, BC et/ou CPI, HBPM, Fondaparinux ou association d’un anticoagulant et d’une méthode mécanique
	Risque élevé de saignement	BC et/ou CPI puis substitution ou association possible d’un anticoagulant lorsque diminution du risque de saignement

Chirurgie laparoscopique	Aucun facteur de risque thromboembolique associé	Déambulation précoce et fréquente
	Facteurs de risque thromboembolique associés	HBPM, HNF, Fondaparinux, CPI ou BC utilisés seul ou en association
Chirurgie bariatrique		HBPM, HNF 3x/j, Fondaparinux utilisés seul ou en association avec CPI
		Utilisation de doses plus élevées de HBPM ou de HNF par rapport aux doses utilisées chez les patients non obèses
Chirurgie thoracique	Acte chirurgical majeur	HBPM, HNF, Fondaparinux
	Risque élevé de saignement	Thromboprophylaxie mécanique
Chirurgie coronaire		HBPM, HNF ou BC ou CPI
		HBPM à préférer à HNF
	Risque élevé de saignement	Thromboprophylaxie mécanique
Chirurgie orthopédique	Prothèse totale de hanche	HBPM à forte dose 12 h avant l'acte chirurgical <u>ou</u> 12 à 24 h après l'acte chirurgical <u>ou</u> 4 à 6 h après l'acte chirurgical à demi-dose puis augmentation de dose jusqu'à dose entière <u>ou</u> Fondaparinux 2,5 mg 6 à 24 h après la chirurgie <u>ou</u> AVK (INR cible 2,5/INR 2-3) avant l'acte chirurgical ou la veille au soir
	Chirurgie élective de prothèse de hanche + Risque élevé de saignement	Thromboprophylaxie mécanique
	Prothèse totale de genou	HBPM, Fondaparinux ou AVK (INR cible 2,5/INR 2-3) CPI comme option alternative
	Chirurgie élective de prothèse de genou + Risque élevé de saignement	Thromboprophylaxie mécanique puis substitution ou association possible d'un anticoagulant lorsque diminution du risque de saignement
	Arthroscopie du genou + Aucun facteur thromboembolique associé	Mobilisation précoce
	Arthroscopie du genou + Facteurs thromboemboliques associés	HBPM
	Chirurgie des fractures de la hanche	Fondaparinux, HBPM, AVK (INR cible 2,5/INR 2-3) ou HNF
	Chirurgie retardée des fractures de la hanche	HBPM ou HNF pendant l'intervalle de temps entre admission et chirurgie
	Chirurgie des fractures de la hanche + Risque élevé de chirurgie	Thromboprophylaxie mécanique puis substitution ou association possible d'un anticoagulant lorsque diminution du risque de saignement
Chirurgie rachidienne	Aucun facteur de risque thromboembolique associé	Déambulation précoce et fréquente
	Facteurs de risque thromboembolique associés	HNF postopératoire, HBPM postopératoire ou CPI BC comme option alternative
	Facteurs de risque thromboembolique multiples	Anticoagulant + méthode mécanique
Neurochirurgie		CPI HBPM ou HNF comme option alternative
	Risque élevé de thrombose	Méthode mécanique + anticoagulant

Trauma		Thromboprophylaxie en routine si possible et jusqu'à la sortie de l'hôpital Thromboprophylaxie par HBPM ou AVK (INR cible 2,5/INR 2-3) après la sortie de l'hôpital pour les patients à mobilité réduite
	Trauma majeur + Absence de contre-indication	HBPM HBPM + méthode mécanique comme option alternative
	Trauma majeur + Contre-indication à l'utilisation des héparines (risque élevé de saignement)	Thromboprophylaxie mécanique puis substitution ou association possible d'un anticoagulant lorsque diminution du risque de saignement
Lésion aiguë de la moelle épinière		HBPM en routine CPI + HNF ou HBPM comme option alternative
	Risque élevé de saignement	Thromboprophylaxie mécanique puis substitution ou association possible d'un anticoagulant lorsque diminution du risque de saignement
	Présence d'un hématome spinal	Thromboprophylaxie mécanique au moins les premiers jours
	Patients en réadaptation	Continuation de la thromboprophylaxie par HBPM ou conversion pour un AVK (INR cible 2,5/INR 2-3)
Brûlures	Facteurs de risque thromboembolique associés	HBPM ou HNF en routine
Patients « médicaux »	Insuffisance cardiaque congestive <u>ou</u> Atteinte respiratoire sévère <u>ou</u> Patient alité + Facteur(s) de risque associé	HBPM, HNF ou Fondaparinux
	Facteurs de risque thromboembolique associés + Contre-indication des anticoagulants	Thromboprophylaxie mécanique
Patients cancéreux	Si acte chirurgical	Voir les recommandations pour la chirurgie correspondante
	Si patient alité ou souffrant d'une pathologie aiguë	Voir les recommandations pour les patients « médicaux »
Patients admis en soins intensifs	Facteur de risque thromboembolique modéré	HBPM ou HNF en routine
	Facteur de risque thromboembolique élevé	HBPM en routine
	Facteur de risque thromboembolique élevé + Risque élevé de saignement	Thromboprophylaxie mécanique puis substitution ou association possible d'un anticoagulant lorsque diminution du risque de saignement
Voyage longue-distance	Si vol > 8 h	Eviter le port d'habits trop serrés Penser à bien s'hydrater Contraction fréquente du mollet
	Facteur de risque thromboembolique élevé	BC (pression de contention : 15 à 30 mm de Hg) <u>ou</u> Dose unique d'HBPM avant le départ

Légende : HBPM : Héparine de Bas Poids Moléculaire
HNF : Héparine non fractionnée
AVK : Antagonistes de la vitamine K
Méthode mécanique : Bas de contention (BC) et/ou Compression pneumatique intermittente (CPI)

1.5.5. Traitement de la maladie thromboembolique.

Le traitement de la maladie thromboembolique peut faire appel à différentes stratégies telles que l'administration de molécules anticoagulantes, la thrombolyse par cathéter, la chirurgie ou la thrombectomie mécanique par voie endoveineuse ou bien encore l'interruption de la veine cave inférieure. Cependant, nous n'aborderons ici, que le traitement médicamenteux anticoagulant de la maladie thromboembolique constitué essentiellement par les héparines de bas poids moléculaire et les antagonistes de la vitamine K. Les recommandations concernant le traitement anticoagulant de la maladie thromboembolique émises par l'American College of Chest Physicians sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Traitement anticoagulant de la maladie thromboembolique.

(d'après Hirsh et al., 2008 [35]).

Pathologies	Recommandations	
TVP symptomatique	Traitement initial	HBPM, HNF ou Fondaparinux pendant au moins 5 j et jusqu'à l'obtention d'un INR ≥ 2 durant 24 h. Initiation simultanée des AVK et des héparines.
	Traitement initial par HNF par voie intraveineuse.	Bolus initial : 80 U/kg ou 5000 U. Perfusion continue (dose initiale : 18 U/kg/h ou 1300 U/h) Ajustement de dose : aPTT 0,3-0,7 IU aXa/ml
	Traitement initial par HNF par voie sous-cutanée avec suivi de l'activité	Dose initial : 17500 U ou 250 U/kg 2x/j Ajustement de dose : aPTT 0,3-0,7 IU aXa/ml mesuré 6 h après l'injection
	Traitement initial par HNF à dose fixe sans suivi de l'activité	Dose initial : 333 U/kg Puis dose de 250 U/kg 2x/j
	Traitement initial par HBPM	1-2 x/j A préférer aux HNF sauf si insuffisance rénale Suivi de l'activité anti-Xa non recommandé
	Traitement au long cours : - Si TVP secondaire : AVK pendant 3 mois. - Si TVP idiopathique : AVK pendant 3 mois puis réévaluation de la balance bénéfice/risque du traitement au long cours. - Si TVP proximale idiopathique avec absence de facteurs de risque de saignement et suivi de l'activité anticoagulante réalisable : Traitement au long cours recommandé. - Si second épisode de TVP idiopathique : Traitement au long cours. - Si premier épisode de TVP distal idiopathique : 3 mois de traitement anticoagulant. - Si TVP + Cancer : HBPM pendant 3-6 mois puis AVK ou HPBM à vie ou jusqu'à résolution du cancer.	

	Intensité du traitement anticoagulant : - AVK : INR 2-3 avec INR cible à 2,5 - TVP idiopathique, après les 3 premiers mois : INR 1,5-1,9	
TVP asymptomatique	Même recommandations que pour TVP symptomatique.	
EP	Traitement initial	HBPM, HNF ou Fondaparinux pendant au moins 5 j et jusqu'à l'obtention d'un INR ≥ 2 durant 24 h.
	Traitement par HNF par voie IV	Bolus initial : 80 U/kg ou 5000 U. Perfusion continue (dose initiale : 18 U/kg/h ou 1300 U/h) Ajustement de dose : aPTT 0,3-0,7 IU aXa/ml
	Traitement par HNF par voie sous-cutanée avec suivi de l'activité	Dose initial : 17500 U ou 250 U/kg 2x/j Ajustement de dose : aPTT 0,3-0,7 IU aXa/ml mesuré 6 h après l'injection
	Traitement par HNF à dose fixe sans suivi de l'activité	Dose initial : 333 U/kg Puis dose de 250 U/kg 2x/j
	Remarques : - EP non massive : Traitement initial par HBPM préféré à HNF par voie IV. - EP massive : HNF par voie IV préféré à HBPM, Fondaparinux ou HNF par voie SC. - Traitement par HBPM : suivi de l'activité anti-Xa non recommandé. - PE + Insuffisance rénale : HNF à préférer aux HBPM.	
	Traitement au long cours : - EP secondaire : AVK pendant 3 mois. - EP idiopathique : AVK pendant 3 mois puis réévaluation de la balance bénéfice/risque du traitement au long cours. - EP comme premier épisode de MTEV avec absence de facteurs de risque de saignement et suivi de l'activité anticoagulante réalisable : Traitement au long cours recommandé. - Second épisode d'EP idiopathique : Traitement au long cours. - EP + Cancer : HBPM pendant 3-6 mois puis AVK ou HBPM à vie ou jusqu'à résolution du cancer.	
	Intensité du traitement anticoagulant : - AVK : INR 2-3 avec INR cible à 2,5 - EP idiopathique, après les 3 premiers mois : INR 1,5-1,9	
HPTC	Traitement à vie par AVK : INR 2-3	
TVS	HBPM ou HNF à doses modérées pendant au moins 4 semaines. <u>ou</u> Chevauchement HNF ou HBPM avec AVK : INR 2-3 avec INR cible à 2,5 pendant 5 j puis AVK pendant 4 semaines comme option alternative	

Légende : TVP : Thrombose veineuse profonde
 EP : Embolie pulmonaire
 HPTC : Hypertension artérielle pulmonaire thromboembolique chronique
 TVS : Thrombose veineuse superficielle

2. HEPARINES.

L'héparine et les héparines de bas poids moléculaire ainsi que les héparinoïdes comme le danaparoïde exercent leur effet anticoagulant en activant des protéines. En effet, ils inhibent la thrombine et le facteur Xa en activant l'antithrombine.

2.1. Héparine standard.

2.1.1. Origine.

En 1916, Mac Lean, alors étudiant en médecine, met en évidence, sur une fraction de foie de chien une substance anticoagulante qu'il appelle « antithrombine » [36]. En 1923, Howell poursuit ces travaux puis isole et purifie cette substance qu'il rebaptise héparine, par analogie avec son lieu d'extraction, le foie (*hépar* en grec). En 1939, Crafoord met en évidence l'efficacité de l'héparine sur une thrombose expérimentale pendant que Brinkhous et ses associés démontrent que l'héparine est un anticoagulant indirect nécessitant un cofacteur plasmatique [37]. Ce cofacteur fut par la suite appelé antithrombine III (ATIII) par Abildgaard en 1968 [38]. L'action anticoagulante principale de l'héparine est ainsi médiée par l'interaction héparine/ATIII. Ce mécanisme d'interaction fut élucidé par Rosenberg et ses collègues [39, 40] d'une part et par Lindahl et ses associés [41] d'autre part dans les années 1970. Depuis, l'héparine est utilisée de façon importante en clinique pour prévenir ou traiter la maladie thromboembolique. Les héparines commercialisées sont essentiellement extraites à partir du poumon de bœuf ou de la muqueuse intestinale de porc. Leur degré de purification permet leur administration chez l'homme bien qu'elles soient d'origine animale.

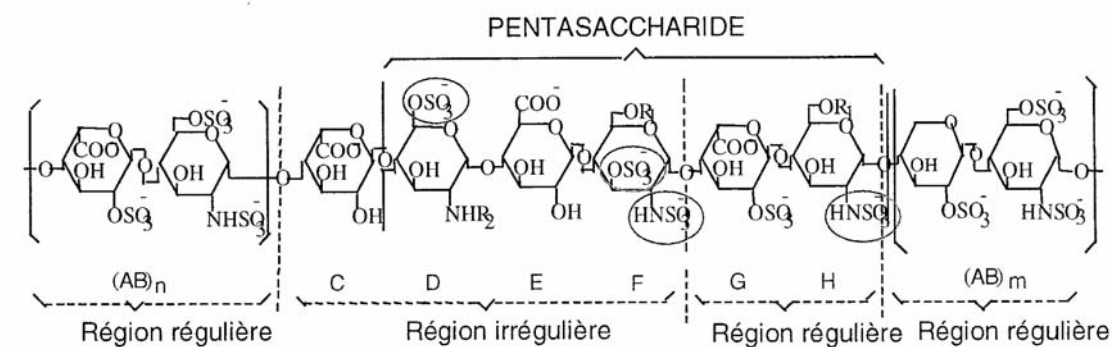
2.1.2. Structure.

Les héparines sont des mucopolysaccharides anioniques polydispersés appartenant à la famille des glycosaminoglycanes, c'est-à-dire qu'elles sont constituées de longues chaînes linéaires saccharidiques, fortement acides et de taille variable. Le protomère de ces chaînes est composé d'un acide uronique et d'une osamine liés par une liaison osidique. Dans l'héparine, l'acide uronique est l'acide L-iduronique ou l'acide D-glucuronique lié par une liaison α -1,4 avec une D-

glycosamine liée, elle-même, à l'acide iduronique suivant. Un certain nombre de fonctions alcools ou amines sont sulfatées : fonction amine de la glycosamine, fonction alcool primaire de la glycosamine, fonction alcool secondaire du carbone n°3 de la glycosamine et quelquefois fonction alcool secondaire du carbone n°2 de l'acide iduronique [39]. Ces groupements jouent un rôle important dans l'activité spécifique des héparines. La masse moléculaire de chaque chaîne est fonction du nombre d'unités osidiques présentes et de leur richesse en groupements sulfatés. Les caractéristiques structurales des héparines dépendent de leur origine tissulaire et de leur procédé de fabrication [42].

La nature des motifs saccharidiques constitutifs de l'héparine a été caractérisée par Casu [43-45] grâce à la résonance magnétique nucléaire. Ces différents motifs ne se rencontrent pas au hasard dans les molécules et il est possible de distinguer trois types de séquences qui constituent trois régions intramoléculaires [40, 46, 47] (Figure 9) :

- Des régions régulières, majoritaires au sein des molécules d'héparine, constituées de la répétition de la séquence disaccharidique acide iduronique 2-O-sulfate / glycosamine N-sulfate-6-O-sulfate ;
- Des régions irrégulières intercalaires contenant d'autres motifs osidiques, régions encore mal connues ;
- Des régions irrégulières particulières, constituées par la séquence responsable de la liaison de l'héparine à l'antithrombine III (ATIII). Ces régions n'existent donc que dans les molécules possédant une haute affinité pour cette protéine (environ 1/3 des chaînes constituant les héparines issues de muqueuses [48].



○ Groupements fonctionnels sulfates essentiels à l'activité biologique de l'héparine.

Figure 9 : Modèle simplifiée d'une molécule d'héparine ou d'un de ses fragments.

R_1 = sulfate ou H ; R_2 = sulfate ou acétyle, d'après Choay (1986) [49].

Le pentasaccharide comprenant les saccharides DEFGH (Figure2) est la séquence minimale possédant encore une assez haute affinité pour l'ATIII [50]. Le complexe pentasaccharide-ATIII inhibe très efficacement le facteur Xa. En substituant le groupe sulfate en position 3 du motif F, toute affinité pour l'ATIII et toute activité anti-Xa sont abolies. Les quatre groupements sulfates essentiels pour l'interaction avec l'ATIII sont entourés sur la figure 9. La présence d'une telle structure pentasaccharidique dans une molécule d'héparine est indispensable pour lui conférer une haute affinité pour l'ATIII et une activité anti-Xa.

2.1.3. Propriétés physico-chimiques.

L'héparine est un mucopolysaccharide anionique sulfaté naturel constitué d'unités osidiques de D-glucosamines et d'acides glucuroniques ou iduroniques, synthétisé par les mastocytes et extrait industriellement du poumon de bœuf ou de l'intestin de porc [51]. L'hétérogénéité des molécules d'héparine se manifeste par des différences à la fois physique et chimique.

- Propriétés ioniques : constituée d'un squelette polysaccharidique substitué par des groupements sulfates ou sulfamates ayant des propriétés acides forts et ionisée à tous les pH, et des groupements carboxylates conférant des propriétés acides faibles, l'héparine est le sel d'un des acides les plus forts de l'organisme. Ces fonctions acides sont porteuses de charges négatives et confèrent au produit un champ électrostatique considérable duquel résultent des propriétés ioniques particulièrement marquées.
- Solubilité : Les sels d'héparine habituellement utilisés en thérapeutique (sels de sodium, calcium, magnésium) sont très solubles dans l'eau ou dans les solutés de chlorure de sodium ou de glucose. Par contre, ils sont insolubles dans la plupart des solvants organiques. Ceci permet de les extraire facilement de solutions aqueuses par simple addition d'un solvant miscible à l'eau comme l'alcool éthylique. L'excellente solubilité des sels d'héparine permet de préparer des solutions très concentrées (25000 UI/ml à 40000 UI/ml).
- Masse moléculaire : La masse moléculaire de l'héparine peut varier de 3000 à 30000 Daltons. La masse moléculaire moyenne est de 15000 Daltons et elle correspond à une molécule d'héparine d'environ 45 unités osidiques [49, 52]. Du fait de cette hétérogénéité, la titration de l'activité anticoagulante s'impose. Elle s'exprime en Unités Internationales et la Pharmacopée Européenne exige qu'elle soit supérieure à 150 UI/mg d'héparine cristallisée.
- Action des acides et des bases sur l'héparine : L'héparine est sensible aux milieux acides et basiques, surtout à chaud et perd en partie ou totalement son activité biologique. En effet, il a été démontré qu'à pH 2,5 et à 80°C, l'héparine perd la moitié de son activité biologique en 1h30 [51]. De même à pH 13,4 et à 80°C, l'héparine perd la moitié de son activité en 2h. Dans ces conditions encore plus rigoureuses (NaOH 1N à ébullition), l'activité est complètement perdue en 1 heure.

2.1.4. Action biologique.

Les héparines possèdent des activités biologiques multiples. En effet, elles ont non seulement des propriétés anticoagulantes mais aussi anti-thrombotiques, anti-inflammatoires modérées et une action dans le métabolisme lipoprotéique. Ces activités sont dues à l'interaction des héparines avec différentes protéines dont l'anti-thrombine III (ATIII) et le co-facteur II de l'héparine (HCII) ainsi qu'à l'interaction avec les cellules endothéliales vasculaires [53].

- Interaction avec l'anti-thrombine III : l'ATIII est un inhibiteur des sérine-protéases de la coagulation. Physiologiquement, l'inhibition se produit lentement. L'héparine, en se fixant sur le site lysine de l'ATIII au niveau du pentasaccharide par des liaisons de haute affinité (Figure 10), modifie la conformation de l'ATIII et accélère son action anti-sérine protéase en réalisant un complexe équimolaire dans des conditions stoechiométriques. Une fois constitué, ce complexe expose idéalement le site actif de l'ATIII et peut alors se lier de façon non spécifique aux différentes protéases de la coagulation (facteurs IIa, Xa, IXa, XIa, XIIa) et inhiber leur action sans en modifier leur quantité. Cependant, il est à noter que les facteurs IIa et Xa sont les deux facteurs les plus sensibles à l'inhibition par le complexe héparine/ATIII. Aussi, la thrombine est environ 10 fois plus sensible à cette inhibition que le facteur Xa.

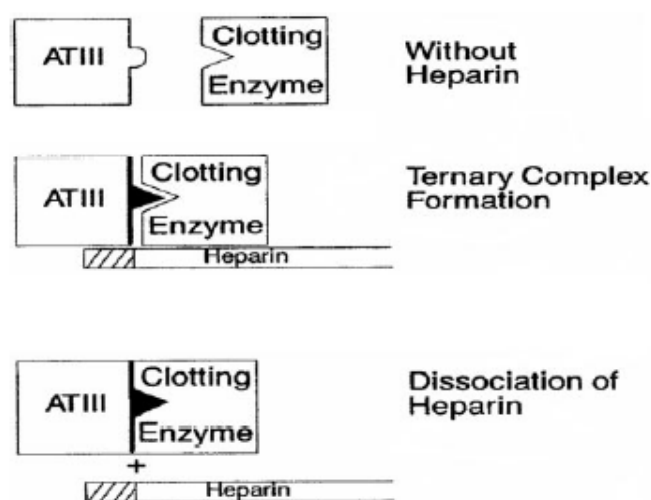


Figure 10 : Inactivation des enzymes de la coagulation par l'héparine.

Haut : Inhibition lente par l'ATIII en absence d'héparine. *Milieu* : Changement conformationnel de l'ATIII induit par l'héparine via le motif pentasaccharide ; inhibition rapide par l'ATIII en présence d'héparine. *Bas* : Liaison covalente de l'ATIII aux enzymes de la coagulation et dissociation de l'héparine du complexe, à nouveau disponible (Hirsh et Raschke, 2004 [54]).

La molécule d'héparine n'est pas catabolisée au cours de la réaction. Dès que la thrombine est fixée, l'affinité de l'héparine pour son cofacteur est de 100 à 1000 fois plus faible et chaque molécule d'héparine libérée pourra agir à nouveau sur une autre molécule d'ATIII disponible [53].

L'effet pharmacodynamique des héparines dépend de la longueur des chaînes oligosaccharidiques. En effet, pour inhiber la thrombine, il est nécessaire qu'un complexe ternaire se forme entre l'héparine, la thrombine et l'ATIII. En revanche, pour inhiber le facteur Xa, l'héparine par le biais du motif pentasaccharide ne devra se fixer qu'à l'ATIII, lui-même fixant le facteur Xa. Ainsi, les fragments de poids moléculaire (PM) inférieur à 5400 Da, soit 18 unités saccharidiques, perdent leur capacité à se fixer simultanément à la thrombine et à l'ATIII et de ce fait seront essentiellement anti-Xa. Quant à ceux de PM supérieur ou égal à 5400 Da, ils seront à la fois anti-Xa et anti-IIa. L'héparine standard comprend des fragments de poids moléculaire variant de 2000 à 30000 Da et possède donc des actions sur les deux facteurs, Xa et IIa [54]. Elle a donc à la fois une activité anti-thrombotique et anticoagulante, par opposition aux héparines de bas poids moléculaire qui sont essentiellement des agents anti-thrombotiques avec une prédominance de l'activité anti-Xa. Les HBPM sont donc moins hémorragiques que les héparines non fractionnées du fait d'une activité anti-IIa moindre.

Il est à noter que si la masse moléculaire influence l'effet pharmacodynamique des héparines, celle-ci influence également la clairance de ces molécules. En effet, les molécules de masse moléculaires importantes seront éliminées plus rapidement de la circulation sanguine que les molécules de faible masse moléculaire résultant sans doute de propriétés de fixation différentes aux protéines plasmatiques et de voies d'élimination différentes [54].

- Interaction avec le cofacteur II de l'héparine (HCII) : L'héparine catalyse aussi l'inactivation de la thrombine par un cofacteur plasmatique : le cofacteur II de l'héparine, inhibiteur sélectif de la thrombine. Dans les molécules d'héparine, il existe des chaînes dépourvues de pentasaccharide qui n'exercent aucune action sur les facteurs Xa et IIa. Une partie de ces chaînes possède néanmoins une activité anti-thrombine après liaison au HCII. Il neutralise près de 7% de la thrombine

formée (~80% est neutralisé par l'ATIII). L'inhibition, lente à l'état normal, est accélérée en présence d'une forte concentration d'héparine [55]. Cette action anticoagulante nécessite des concentrations plus importantes d'héparine que celles requises pour l'activité de l'antithrombine [56]. L'inactivation de la thrombine médiée par le HCII dépend également du poids moléculaire des fragments et requiert au minimum 24 unités saccharidiques. L'effet anticoagulant de l'héparine médié par le HCII pourrait opérer dans les cas de déficience sévère de l'ATIII [54].

- Interaction avec le facteur Xa : L'effet anticoagulant de l'héparine résulte ici d'une modulation ATIII et HCII indépendante de la génération de facteur Xa. Ce mécanisme est médié par la fixation de l'héparine au facteur IXa et nécessite des doses très importantes de polysaccharides sulfatés pour produire un effet anticoagulant [57]. D'un faible intérêt clinique, cet effet anticoagulant direct a cependant compliqué le développement des préparations d'héparine non anticoagulante destinées à la prévention des resténoses après angioplastie.
- Interaction avec les cellules endothéliales vasculaires : l'héparine se fixe sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, augmentant ainsi les charges électronégatives à leur surface et favorisant la résistance au processus thrombotique [58, 59].
- Rôle dans la fibrinolyse : l'héparine favorise la lyse du caillot en augmentant l'activation du plasminogène [60].
- Rôle préventif dans l'athérosclérose : l'héparine possède également un effet « clarifiant » du sérum en augmentant la libération de lipoprotéine lipases. Elle diminue également la synthèse hépatique de prothrombine [53].

Grâce à ses propriétés pharmacologiques, l'héparine est utilisée dans le traitement et la prévention des maladies thrombotiques. En curatif, l'héparine est administrée afin de maintenir une hypocoagulabilité suffisante et traiter les thromboses veineuses déclarées, l'embolie pulmonaire, les thromboses artérielles, les états de défibrination attribués à une coagulation intravasculaire disséminée (troubles sévères

de la coagulation sanguine), et l'infarctus du myocarde en phase aiguë. Dans un but préventif, l'héparine est administrée chez les malades alités à haut risque de thrombose. De plus, elle est utilisée pour prévenir la coagulation dans les circuits de perfusion, les circuits d'hémodialyse et la circulation extracorporelle (Elalamy et coll., 1995).

2.1.5. Formes commercialisées et posologies [55, 61].

Les héparines utilisées en thérapeutique et en prévention sont commercialisées sous forme de sels de sodium ou de calcium. Elles sont administrées par voie parentérale (intraveineuse ou sous-cutanée) car elles ne sont pas absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal. La voie intramusculaire est à proscrire en raison du risque de formation d'hématome. Les posologies sont fonction des indications thérapeutiques ou préventives et varient selon les maladies.

- Pour le traitement curatif : de fortes doses d'héparine sont utilisées et les doses nécessaires pour maintenir un effet anticoagulant suffisant et non dangereux sont très variables selon les malades. Chez les malades atteints de thrombose veineuse profonde, d'embolie pulmonaire, de coagulation intravasculaire disséminée, d'obstruction artérielle aiguë ou d'infarctus du myocarde, il est préférable d'administrer l'héparine par perfusion intraveineuse continue à l'aide d'une seringue électrique, sa demi-vie étant relativement courte. Il est ainsi possible d'éviter des pics d'incoagulabilité, suivis 3 à 4 heures plus tard par une coagulabilité normale du sang, situation rencontrée lors d'une injection intraveineuse en bolus d'héparine toutes les 4 à 6 heures. Une dose de 30 à 40 UI/kg est injectée, suivie immédiatement d'une perfusion intraveineuse continue de 15 à 20 UI/kg. Chez les malades atteints d'embolie pulmonaire, les besoins en héparine sont plus élevés. Le traitement débute à 60 UI/kg, suivie d'une perfusion intraveineuse continue de 20 à 25 UI/kg. Alternativement, on peut administrer par voie intraveineuse un bolus de 75 UI/kg toutes les 4 heures, ou injecter l'héparine par voie sous-cutanée dans la paroi abdominale périombilicale (120 UI/kg) toutes les 6 heures. Plusieurs essais cliniques ont montré qu'une anticoagulation efficace

peut-être obtenue par injection sous-cutanée de 80 à 100 UI/kg toutes les 12 heures.

- Pour le traitement préventif : on administre en général 5000 UI d'héparine standard toutes les 8 ou 12 heures par voie sous-cutanée.

2.1.6. Caractéristiques pharmacocinétiques [55].

Les deux principales voies d'administration des héparines non fractionnées sont la voie intraveineuse et la voie sous-cutanée. Quand la voie sous-cutanée est choisie, la dose initiale doit être augmentée de 10% par rapport à la dose initiale habituelle utilisée par voie intraveineuse afin de pallier une biodisponibilité plus faible [62]. Après avoir atteint la circulation sanguine, l'héparine se fixe à de nombreuses protéines plasmatiques. Ceci réduit l'activité anticoagulante de l'héparine et contribue à la variabilité de la réponse anticoagulante parmi les patients atteints de troubles thromboemboliques [63] ainsi qu'au phénomène de résistance à l'héparine [64]. L'héparine se fixe également sur les cellules endothéliales [65] et les macrophages ; ce qui complique sa pharmacocinétique (figure 11).

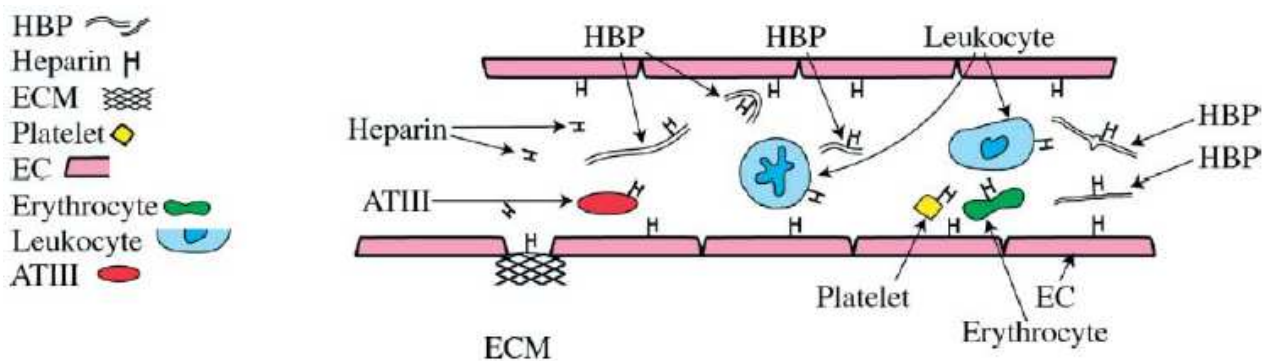


Figure 11 : Différents sites de fixation de l'héparine.

Une fois entrée dans la circulation, l'héparine se fixe à des protéines (HBP), aux cellules endothéliales, à la matrice extracellulaire, aux érythrocytes, aux autres cellules du sang, aux plaquettes et à l'ATIII (Norrby, 2006 [66]).

La clairance de l'héparine résulte de la combinaison de deux phases : une première phase rapide et saturable et une deuxième phase plus lente suivant une cinétique d'ordre 1 [67-69] (figure 12). La première phase fait appel à des fixations non spécifiques de l'héparine. Cette phase rapide et saturable semble être due à sa fixation aux récepteurs des cellules endothéliales [70, 71] et aux macrophages [72] dans lesquels elle est dépolymérisée [73, 74]. Cette phase est très variable et difficile à prédire. L'administration d'un bolus initial est nécessaire pour obtenir un effet anticoagulant suffisant avec les héparines non fractionnées. Après saturation des sites de fixation non spécifiques, on obtient une relation presque linéaire entre la dose et la réponse anticoagulante. La phase de clairance de l'héparine plus lente et non saturable semble dépendre du métabolisme hépatique et de la clairance rénale des fragments désulfatés. En conséquence, il est nécessaire de diminuer les doses d'héparine des patients présentant des pathologies hépatiques ou rénales afin d'éviter des situations de surdosage [75].

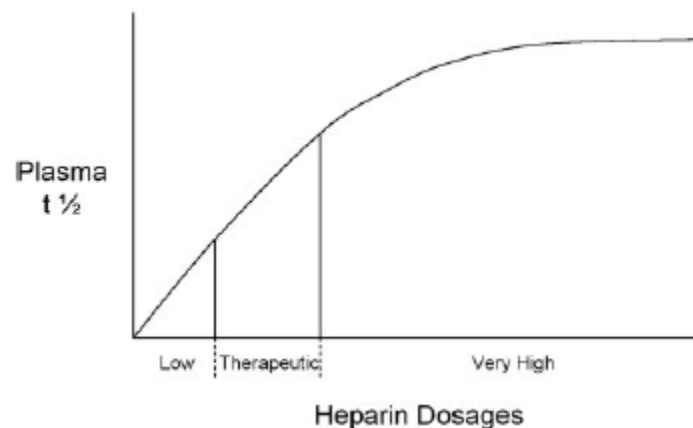


Figure 12 : Pharmacocinétique de l'héparine.

Les faibles doses d'héparine sont rapidement éliminées du plasma par les deux mécanismes. Les très fortes doses d'héparine sont essentiellement éliminées par le mécanisme lent, non saturable et dose indépendant (Hirsh et Raschke, 2004 [54]).

Le volume de distribution de l'héparine étant légèrement supérieur au volume plasmatique, celle-ci reste principalement dans le compartiment intravasculaire. Aussi, en raison de sa charge négative, l'héparine ne traverse pas les barrières placentaire et hémato-encéphalique. Cependant, par prudence, elle est toutefois déconseillée au premier trimestre de grossesse, sauf nécessité absolue [55].

2.1.7. Limitations et effets secondaires.

L'héparine présente des limitations de différents types :

- limitations pharmacocinétiques : l'héparine chargée négativement se lie de façon non spécifique à diverses protéines plasmatiques (glycoprotéines riches en histidine, vitronectine, lipoprotéines, fibronectine et fibrinogène), mais aussi à des protéines secrétées par les plaquettes (facteur 4 plaquettaire ou facteur Von Willebrand) ou par les cellules endothéliales. Ces liaisons indépendantes du motif pentasaccharide entraînent une biodisponibilité réduite à faible dose (au maximum 25 à 30%), une courte demi-vie plasmatique (1 à 3 heures après injection intraveineuse) et une variabilité de la réponse anticoagulante marquée chez les patients atteints de maladies thromboemboliques. Ainsi, dans le cas de maladies thromboemboliques, l'effet anti-coagulant n'étant pas prévisible, l'utilisation d'héparine non fractionnée nécessite une surveillance biologique en laboratoire particulièrement importante.
- limitations biophysiques : au sein du complexe héparine/antithrombine, la molécule d'héparine ne peut activer ni la thrombine lorsqu'elle est liée à la fibrine ou exposée à la matrice sous endothéliale, ni le facteur Xa lorsqu'il est lié aux phospholipides de surface. Ainsi, les enzymes associées au thrombus peuvent encore contribuer à la croissance du thrombus même lors d'un traitement à l'héparine. Ces défauts d'inactivation entraînent une efficacité limitée dans les cas d'angor, d'angioplastie coronaire à haut risque et de thrombolyse coronaire,
- effets secondaires :
 - o Hémorragies [76, 77] : L'effet secondaire le plus important de l'héparinothérapie est le risque hémorragique. Ce risque est influencé par quatre facteurs : la dose d'héparine administrée et la réponse anticoagulante du patient, le mode d'administration, l'état clinique du patient et enfin, l'utilisation concomitante d'aspirine ou d'agents thrombolytiques. Les hémorragies majeures, nécessitant des transfusions sanguines et l'arrêt du traitement, se produisent chez moins de 5% des malades contrôlés régulièrement au moyen du

temps de thromboplastine partielle activée et sont extrêmement rares lors du traitement prophylactique.

o Thrombocytopénies induites par héparine (TIH) [78] : Il s'agit d'une complication immuno-allergique redoutable des traitements hépariniques. L'incidence de la TIH est plus importante avec les héparines d'origine bovine par rapport à celles d'origine porcine. De même, l'incidence des TIH est généralement plus importante avec les héparines non fractionnées par rapport aux héparines de bas poids moléculaire. Selon Lee et Warkentin [79], la fréquence de TIH est de l'ordre de 0-7% chez les patients recevant des HNF d'origine porcine et de 0-8% selon Girolami [80] pour les patients recevant des HNF par voie sous-cutanée. Pour les héparines de bas poids moléculaire, cette fréquence est estimée à 0-8% [81] qu'elles soient utilisées à visée prophylactique ou curative. Cependant, au regard de nombreuses autres publications [81-84] où les héparines de bas poids moléculaire sont considérées comme présentant moins de risque par rapport aux héparines non fractionnées, ce résultat peut paraître surprenant. Lors de TIH, la numération plaquettaire commence à chuter 5 à 10 jours après le début de l'héparinothérapie et la numération plaquettaire chute généralement de plus de 50% [85, 86]. Occasionnellement, la TIH peut survenir au-delà de 10 jours et de façon exceptionnelle au-delà de 15 jours. Les thrombocytopénies sévères sont également inhabituelles (plaquettes $< 15 \times 10^9/L$). Il est à noter que la moitié des patients qui développent une TIH associe une thrombose. Dans le cas des TIH isolé, sans thrombose, le risque de thrombose est élevé si l'héparine n'est pas arrêtée et remplacée par un traitement anticoagulant alternatif.

La TIH est causée par le développement d'un anticorps IgG qui reconnaît les complexes multimoléculaires du facteur 4 plaquettaire (PF4) et de l'héparine [87]. Les anticorps reconnaissent le changement conformationnel du tétramère de PF4 induit par l'héparine [88]. L'induction du changement de conformation du PF4 dépend de la longueur et du degré de sulfatation des chaînes de glycosaminoglycanes, ce qui explique les différences d'incidence des TIH observées avec les différentes héparines. Les complexes PF4/héparine se fixent à la surface des plaquettes. Les anticorps reconnaissent les néo-épitopes sur les tétramères de PF4 conduisant à la formation de complexes IgG/PF4/héparine à la

surface des plaquettes. Il en résulte une agrégation intravasculaire des plaquettes et une activation de la coagulation.

o Ostéoporose secondaire [89] : L'ostéoporose est considérée comme l'un des effets indésirables potentiellement grave de l'héparinothérapie. L'ostéoporose induite par héparine semble être strictement reliée à la longueur du traitement (supérieure à 4-5 mois) et au dosage (≥ 15000 UI/jour) ; cependant sa pathogenèse reste encore peu comprise. Il a été suggéré que l'héparine pourrait supprimer la formation des ostéoblastes et augmenter le nombre et l'activité des ostéoclastes, conduisant ainsi à une perte osseuse.

o Atteintes hépatiques [90] : Une élévation des transaminases est observée chez 30 à 85% des patients traités avec l'héparine standard et apparaît dose dépendante. Une toxicité hépatique directe ou une interaction avec la lipase hépatique est supposée pour expliquer le mécanisme physiopathologique de cette toxicité.

o Réactions cutanées : Chez certains patient traités avec de l'héparine standard, il peut survenir des nodules inflammatoires, des lipodystrophies, ou des ecchymoses aux points d'injection [91]. Parfois, il est également possible d'observer des cas de nécrose cutanée induite par héparine. Cet effet indésirable résulte d'un mécanisme immuno-allergique médié par des complexes immuns. Ce mécanisme est reconnu être fortement associé aux anticorps héparine-dépendants activant les plaquettes et à un risque de thromboembolisme, pouvant survenir avec ou sans thrombocytopénie [92].

A la vue de tous ces facteurs limitant l'utilisation des héparines non fractionnées, de nombreuses modifications chimiques de l'héparine ont été réalisées pour à la fois augmenter son activité et réduire ses effets indésirables.

2.2. Héparines de bas poids moléculaires (HBPM).

Le développement des héparines pour un usage clinique a été stimulé par trois principales observations :

- o les HBPM permettent de réduire l'activité anti-IIa par rapport à l'activité anti-Xa [93, 94],
- o les HBPM présentent un meilleur rapport bénéfices/risques que les HNF dans les études chez l'animal [95, 96],
- o et les HBPM possèdent de meilleures propriétés pharmacocinétiques [97-102].

La plupart des héparines de bas poids moléculaires sont isolées des héparines non fractionnées par voie chimique, cette étape étant suivie par des techniques de chromatographie de filtration sur gel, de précipitation différentielle à l'éthanol, de dépolymérisation partielle (acide nitrique, benzylation suivie d'hydrolyse alcaline, digestion par le nitrate d'isoamyl, clivage peroxydatif, bêta élimination ou digestion à l'acide nitrique, etc...). Seule la tinzaparine est produite par hydrolyse enzymatique utilisant des héparinases [66]. Elles ont une masse moléculaire comprise entre 1000 et 10000 Da et une masse moléculaire moyenne de l'ordre de 5000 Da (figure 13). Leur structure biochimique élémentaire responsable de la liaison à l'antithrombine est le pentasaccharide.

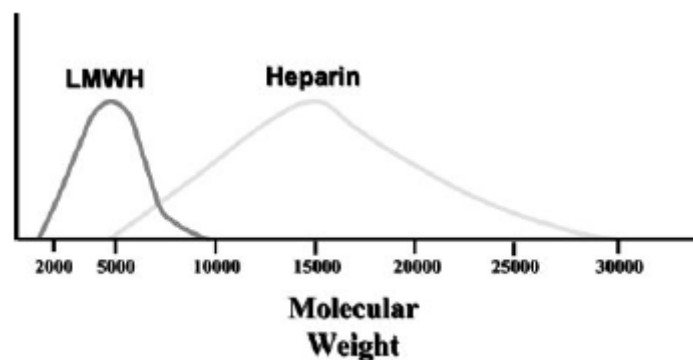


Figure 13 : Distribution des poids moléculaires des héparines non fractionnées et des héparines de bas poids moléculaire.

(Hirsh et Raschke, 2004 [54]).

Le mécanisme d'action des héparines de bas poids moléculaire est analogue à celui de l'héparine non fractionnée (figure 14) : elles n'agissent pas de façon directe mais en présence de leur cofacteur, l'antithrombine III. Leur faible masse moléculaire fait que le complexe qu'elles forment avec l'antithrombine est beaucoup plus actif vis-à-vis du facteur Xa que du facteur IIa car les plus petits fragments ne peuvent pas se lier à la thrombine. En effet, la masse moléculaire des chaînes polysaccharidiques influe sur les propriétés anticoagulantes des héparines de bas poids moléculaire : l'activité anti-Xa est indépendante de la masse moléculaire contrairement à l'activité inhibitrice de la thrombine qui requiert environ 18 unités monosaccharidiques (5400 Da). Les procédés de préparation des héparines de bas poids moléculaire pouvant varier, les molécules obtenues ont des activités biologiques très variables et le rapport entre les activités anti-Xa et anti-IIa qui les caractérise peut être situé entre 2 et 4 [54]

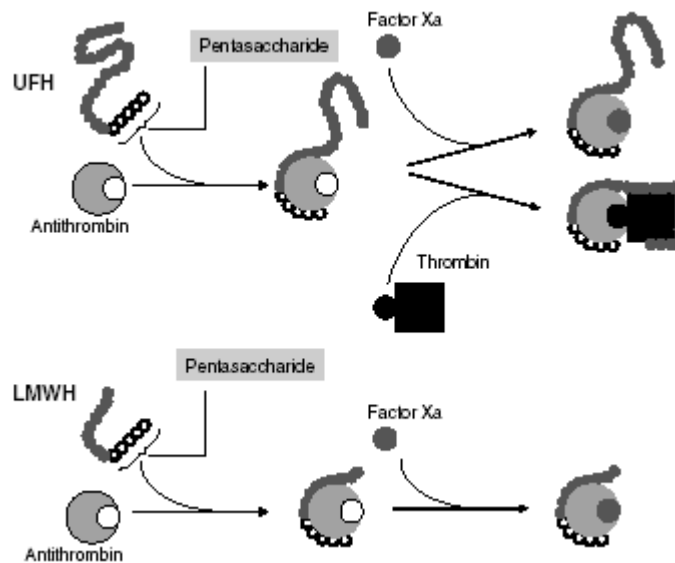


Figure 14 : Mécanismes d'action des HNF et des HBPM.
(Hetzel, 2005 [75]).

L'équipe de Hemker [103] distingue également deux types différents d'héparine en fonction de leurs masses moléculaires : les BCLM ou « Below Critical chain Length Material heparin » dont les masses moléculaires sont inférieures à 5400 Da et les ACLM ou « Above Critical chain Length Material heparin » dont les masses

moléculaires sont supérieures à 5400 Da. Les premiers possèdent seulement une activité anti-Xa alors que les seconds possèdent des activités anti-IIa et anti-Xa. De plus, cette équipe propose une division du groupe des ACLM en ELM ou « Extra Large Material » et en ACLM-low. Ces deux derniers groupes se distinguent aussi par leurs masses moléculaires : les premiers ont des masses moléculaires supérieures à 8000 Da et les seconds, comprises entre 5400 et 8000 Da. Cependant, cette équipe soupçonne les chaînes de masses moléculaires comprises entre 5400 et 8000 Da d'être davantage responsables de l'effet antithrombotique des HBPM par inhibition de la thrombine que les chaînes plus légères marquées par l'activité anti-Xa. Ainsi, peut-être est-il réducteur, toujours selon cette équipe, d'attribuer l'effet antithrombotique des HBPM à leur activité anti-Xa élevée et leur bonne tolérance à leur faible activité anti-IIa.

Cette bonne tolérance des héparines de bas poids moléculaire a, en effet, été évaluée au cours de nombreuses études cliniques randomisées qui ont démontré leur innocuité et leur efficacité dans la prévention et le traitement de la thrombose veineuse [104].

Dans les années 80, un grand nombre d'auteurs rapportent que les HBPM possèdent des propriétés pharmacocinétiques supérieures aux HNF. A faibles doses et par voie sous-cutanée, les HBPM possèdent une biodisponibilité approchant les 100%, le pic d'activité anti-Xa apparaît dès 3-5 heures avec une réponse à la dose plus prévisible [105], et la demi-vie d'élimination des HBPM est plus longue (3-6 heures après injection sous-cutanée) et non dose-dépendante comme elle pouvait l'être pour les HNF. La seule limitation pharmacocinétique qu'il est important de noter avec les HBPM est qu'elles sont principalement éliminées par voie rénale. Ainsi, leur demi-vie biologique est prolongée chez les patients présentant des atteintes rénales [106, 107].

Toutes les différences biologiques, d'activité anticoagulante ou de pharmacocinétique observées entre les HBPM et les HNF peuvent être expliquées par des propriétés de fixation relativement plus faibles des HBPM. En effet, comparées aux HNF, les HBPM possèdent une capacité réduite d'inactivation de la thrombine due à des fragments plus petits qui ne peuvent fixer simultanément l'antithrombine et la thrombine. De plus, la fixation réduite des HBPM aux protéines plasmatiques [108],

aux macrophages et aux cellules endothéliales [109], aux plaquettes et au facteur 4 plaquettaire [110], ainsi qu'aux ostéoblastes [111, 112] leur permet respectivement d'avoir une relation dose-réponse plus prévisible, une augmentation de leur demi-vie plasmatique, une diminution de l'incidence des TIH et également, une diminution de l'activation des ostéoclastes et de la perte osseuse.

3. VOIE ORALE ET HEPARINES.

Les héparines non fractionnées ou de bas poids moléculaire commercialisées actuellement sont administrées par voie parentérale. L'administration des héparines est effectuée soit par voie intraveineuse soit par voie sous-cutanée. Toutefois, l'héparine non fractionnée a non seulement une faible biodisponibilité par voie sous-cutanée à dose faible (25 à 30%) mais aussi une faible demi-vie (1h30 après injection intraveineuse, 2 à 3h après injection sous-cutanée). Ces caractéristiques pharmacocinétiques imposent non seulement des doses administrées importantes mais également répétées, ceci au risque d'augmenter l'activité biologique et favoriser les saignements au pic d'activité.

Les héparines de bas poids moléculaire, quant à elle, biodisponibles à 90 voire 95%, ont une demi-vie augmentée d'une à deux heures par rapport à celle de l'héparine non fractionnée. Le rythme des administrations a ainsi pu être diminué et les effets indésirables limités. Cependant, son administration par voie sous-cutanée une à deux fois par jour est toujours contraignante pour les patients.

Des travaux ont été menés dans le but de prolonger l'activité anticoagulante de l'héparine après une administration parentérale afin de réduire le nombre d'injections. Des formes pharmaceutiques ont été développées afin de protéger le principe actif des dégradations enzymatiques comme, par exemple, les liposomes multilamellaires. Ceux-ci sont composés en majeure partie de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine et ont un diamètre inférieur à 4 micromètres. Administrés par voie intraveineuse à des rats, ils ont conduit à augmenter la durée de l'activité biologique de l'héparine (pic d'activité après 80 min contre 20 min avec l'héparine non fractionnée non encapsulée) [113]. Ces travaux sont pourtant restés sans suite et ceci probablement parce qu'ils concernaient une forme parentérale pouvant être contraignante pour le patient.

La voie orale étant la voie d'administration la plus physiologique et la mieux acceptée par les patients, plusieurs équipes de recherche ont étudié l'absorption intestinale de l'héparine afin de développer une forme orale.

3.1. Administration orale d'agents thérapeutiques.

3.1.1. Anatomie de l'épithélium intestinal [114].

Le tractus gastro-intestinal est conçu d'une part pour digérer et absorber sélectivement les nutriments, les vitamines et les cofacteurs essentiels et d'autre part pour empêcher l'entrée des pathogènes, des toxines et des macromolécules non digérées. Contrairement à la peau qui utilise la kératine comme barrière physique contre l'entrée des agents extérieurs, la muqueuse intestinale utilise, quant à elle, des mécanismes biochimiques et physiologiques en complément de sa barrière physique. L'absorption des solutés dans le tractus gastro-intestinal survient, dans un premier temps, au niveau de l'intestin grêle (duodenum, jejunum et iléon) puis au niveau du gros intestin (colon). Chacun de ces segments possède des propriétés anatomiques, biochimiques et physiologiques uniques qui jouent sur la digestion et l'absorption des solutés (Tableau 4).

Tableau 4 : Paramètres biologiques et physiques du tractus intestinal humain.
(Daugherty et Mrsny, 1999 (a) [114]).

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

Luminal influences	Mucous and glycocalyx	Epithelia
• Residence time • Effect of luminal contents • Fasting versus fed state • Disease states • Patient's age • Drug stability: pH range • Drug stability: enzymatic activity • Drug solubility: pH range	• Diffusion of drug • Specific and nonspecific binding • Charge repulsion	• Molecular size (shape and surface area) • Lipophilicity/hydrophilicity (octanol/water partition coefficient) • H-bonding of peptides • Bioadherence • Efflux pathway • Transporters and receptors • Site of action

Tableau 5 : Paramètres influençant l'absorption des médicaments administrés par voie orale.
(Daugherty et Mrsny, 1999 (a) [114]).

La surface de l'intestin grêle présente trois types de structures qui lui permettent d'augmenter sa surface de contact :

- o les plis circulaires qui délimitent la lumière intestinale et qui augmentent la surface de contact de l'ordre de 3 fois,
- o les villi, à peine visible à l'œil nu et qui augmentent la surface de contact de l'ordre de 30 fois (figure 15),
- o les microvilli, projections de la membrane longs de 1 μm et qui augmentent la surface de contact de l'ordre de 600 fois. Les microvilli et le glycocalyx associé établissent la bordure en brosse, importante barrière catabolique douée d'activités enzymatiques.

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

Le mucus à la surface de l'épithélium gastro-intestinal est composé de glycoprotéines (mucine), d'enzymes et d'électrolytes. Le mucus est sécrété par les cellules à gobelet ou cellules caliciformes situées entre les entérocytes recouvrant les villi et représente un site potentiel d'interaction et de fixation pour les médicaments.

Le pH des différents segments de l'intestin varie entre des pH légèrement acides et des pH légèrement basiques. La légère acidité de l'environnement proche des entérocytes a été également décrite. Dans certains cas, il est à noter que les variations de pH peuvent influencer la stabilité et/ou la solubilité des médicaments.

Bien que le tractus gastro-intestinal constitue une barrière aux propriétés étonnantes, il est clairement établi que certains pathogènes possèdent la capacité de surmonter les mécanismes de protection de l'intestin et parviennent à atteindre la circulation systémique. Pour se protéger contre l'entrée de tels pathogènes, la paroi intestinale possède le nombre le plus important de cellules lymphoïdes et produit la plus importante quantité d'anticorps de l'organisme. Cette partie du système immunitaire est appelée GALT pour Gut-Associated Lymphoid Tissue. Les cellules lymphoïdes de l'intestin grêle et plus particulièrement de l'iléon sont connues sous le nom de « plaques de Peyer » (figure 15). Les autres cellules lymphoïdes sont constituées des lymphocytes intraépithéliaux (IEL) qui se trouvent intercalés entre les cellules épithéliales adjacentes.

En réponse aux signaux sécrétés par les lymphocytes sous-jacents, les cellules épithéliales recouvrant les plaques de Peyer peuvent se différencier en cellules M. Ces cellules sont, semble-t-il, dans le cadre de la surveillance immunologique, impliquées dans la capture et le transport de différents matériaux de la lumière intestinale tels que particules, antigènes et macromolécules. Dans le processus de surveillance immunologique, on pense que les cellules M absorbent les protéines sous une forme intacte. Les plaques de Peyer peuvent ainsi représenter un site intéressant pour la capture et le transport des principes actifs administrés par voie orale. Cependant, les plaques de Peyer sont peu abondantes et de faible surface. De ce fait, ce portail d'entrée ne semble pas le plus approprié au transport des protéines thérapeutiques aux doses pharmacologiques. De plus, les protéines entrant par cette voie peuvent induire une réponse immunologique due à la proximité des cellules présentatrices des antigènes (CPA). Toutefois, les cellules M étant dépourvues de la structure en brosse et du glycocalyx, les recherches autour des plaques de Peyer et de leur potentialité à constituer des sites de capture des macromolécules administrées par voie orale demeurent encore très actives.

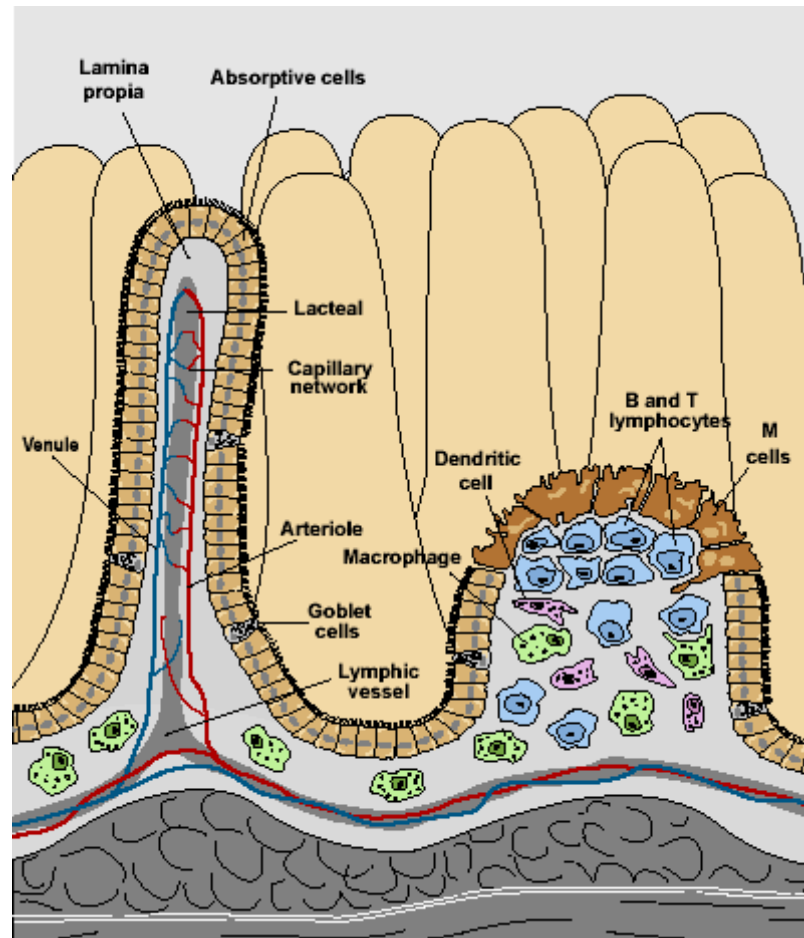


Figure 15 : Représentation schématique de l'anatomie d'un villus et d'une plaque de Peyer de l'intestin grêle.

Ce schéma illustre les associations entre la barrière épithéliale, la circulation systémique et les cellules du système immunitaire. (Daugherty et Mrsny, 1999 (a) [114]).

Théoriquement, il existe deux voies par lesquelles une molécule peut traverser l'épithélium intestinal : soit en passant entre les cellules adjacentes, la voie paracellulaire ou en passant à travers les cellules, la voie transcellulaire (Figure 16).

La surface de l'épithélium intestinal peut être comparée à une route pavée. Les jonctions serrées entre les cellules adjacentes peuvent s'apparenter au mortier situé entre les pierres qui permet de les tenir en place. On remarque ainsi que l'espace disponible à la voie paracellulaire semble faible comparé à celui disponible à la voie transcellulaire. Il est à noter que ces deux moyens de passage de la barrière intestinale peuvent être considérés comme deux possibilités différentes pour une même molécule. En effet, il n'existe pas de critères particuliers qui interdisent à une molécule d'emprunter les deux voies en même temps même si la plupart des molécules sont

transportées via une voie ou l'autre en fonction de leurs propriétés physiques et chimiques. Pour le transport et l'absorption des substances médicamenteuses, il est généralement retenu que :

- o les petites molécules amphiphiles évoluent aisément par la voie transcellulaire à travers la double couche lipidique,
- o les petites molécules hydrophiles sont limitées à la voie paracellulaire ou aux canaux à eau (aquaporines) qui absorbent habituellement les nutriments, les vitamines et les cofacteurs,
- o les peptides et les protéines sont faiblement absorbés sous forme intacte et nécessitent l'utilisation de promoteurs d'absorption ou de mécanismes particuliers de capture et de transport,
- o enfin, de façon générale, la perméabilité des molécules diminue le long de l'intestin, mais ceci est manifestement très dépendant du type de molécule et de la voie de transport empruntée.

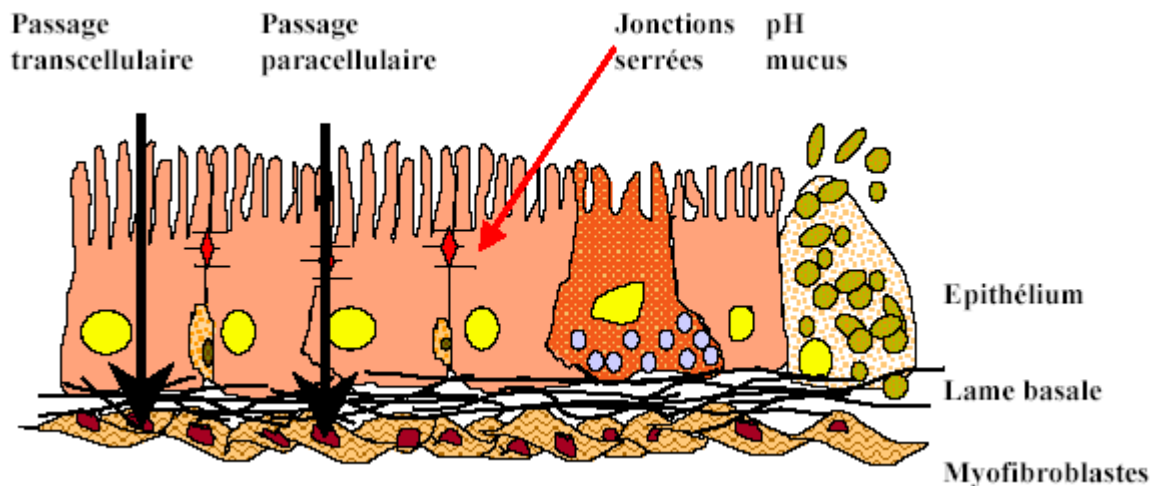


Figure 16 : Structure de la barrière intestinale.
(Haton, 2005 [115]).

3.1.2. Transport transcellulaire [114].

3.1.2.1. Transport transcellulaire passif et facilité.

La diffusion passive à travers les cellules épithéliales intestinales s'effectue par des voies non spécifiques. Ce type de transport transcellulaire se différencie du transport facilité qui utilise des canaux spécifiques ou des transporteurs. L'importance de ces structures et leur implication dans la modification de la solubilité et du coefficient de partage dans le cas de la diffusion passive des petites molécules et des peptides a aussi été discutée. Les coefficients de partage des molécules médicamenteuses entre la phase organique représentée par la bicouche lipidique et la phase aqueuse représentée par la lumière intestinale, le cytosol de l'épithélium ont, quant à eux, été utilisés pour prédire la diffusion passive. Les petites molécules qui sont trop hydrophiles ne peuvent pénétrer la bicouche lipidique, en revanche, celles qui sont trop lipophiles ne peuvent la quitter. Pour le transport des peptides à travers l'épithélium, on prendra plutôt en compte le nombre de liaisons hydrogènes qui doivent être rompues pour permettre la traversée des membranes. Dans certains cas, des prodrogues sont conçues dans le but de masquer les régions hydrophiles chargées de la molécule mère, améliorant ainsi sa diffusion passive. Pour les molécules de taille plus importante, telles que les peptides, les modifications portent sur des groupements permettant de donner plus de flexibilité à la molécule. Malheureusement, toutes les molécules ne peuvent être modifiées.

Les cellules intestinales possèdent de nombreuses voies de transport dont la fonction est d'absorber les ions, les acides aminés, les oligopeptides, les acides nucléiques, les sucres, les acides organiques, les vitamines, les cofacteurs et les nucléosides. Il a été montré que des médicaments de différentes classes thérapeutiques sont absorbés de façon spécifique par ces voies de transport. Par exemple, on peut citer le cas des β -lactames, substrats du transporteur oligopeptidique hPepT-1 ou encore celui de la ribavirine, transporté au niveau du jejunum par le transporteur sodium/nucléoside purique N1. Les activités de ces transporteurs peuvent être altérées par la présence ou l'absence d'une autre substance telle qu'une enzyme, une protéine ou un autre substrat nécessaire au transporteur. Pour illustrer cela, citons l'exemple du

transporteur du D-Glucose sodium dépendant (SGLT1) affecté par le statut redox du glutathion et des enzymes qui lui sont associées.

L'alimentation joue également un rôle dans le transport des molécules. En effet, des études menées chez des rats privés de nourriture ont montré une augmentation de la capacité de transport des acides aminés. La surface de contact des microvilli de ces rats s'est vue être augmentée tout comme le transport de la glycine et des acides aminés basiques, acides et iminiques dans les voies de transport sodium dépendantes ou indépendantes. De même, il est aussi montré que la nourriture peut inhiber le transport intestinal de certaines substances médicamenteuses. Ainsi, le régime et l'état physio-pathologique peuvent avoir un impact sur l'absorption de certaines molécules médicamenteuses et peuvent expliquer la variabilité de transport observée dans une population.

3.1.2.2. Principes de l'endocytose médiée par des récepteurs (RME).

Une très faible proportion de macromolécules présentes à la surface apicale des cellules intestinales pénètre l'épithélium par pinocytose aléatoire, et une faible partie de celles-ci est réellement libérée sous forme intacte du côté basolatéral. En général, les macromolécules absorbées au sein des cellules épithéliales par pinocytose aléatoire sont catabolisées dans les lysosomes et les corps multivésiculaires. Cependant, un groupe de macromolécules traverse aisément la barrière intestinale par voie transcellulaire. Ces molécules sont trop larges pour être prises en charge par transport facilité et souffrent d'une contrainte thermodynamique trop importante pour leur permettre de se déplier et se replier et ainsi traverser la bicouche lipidique. Ces molécules empruntent alors une voie de transport efficace et étroitement régulée appelée endocytose médiée par récepteurs ou RME. Le facteur de croissance des épidermes (EGF), les immunoglobulines, la transferrine et le complexe protéine intrinsèque/vitamine B12 utilisent cette voie par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Un certain nombre de facteurs contrôle la séquence des événements de la RME :

- les récepteurs spécifiques à la surface des cellules reconnaissent et fixent un ensemble de ligands sélectifs,

- o la fixation des ligands conduit au regroupement des récepteurs spécifiques à la surface des cellules,
- o les récepteurs regroupés induisent la formation des vésicules d'endocytose,
- o les canaux et les transporteurs ioniques des vésicules membranaires diminuent le pH au sein des endosomes aux alentours de 5,5 tout en maintenant des valeurs adéquates de la balance osmotique et de la charge superficielle.

Les vésicules endosomales naissant à l'intérieur du cytoplasme des cellules épithéliales peuvent avoir différentes destinations possibles dont celle où elles peuvent être recyclées vers la membrane plasmique apicale, soit avec, soit sans le ligand qui avait initié leur endocytose.

La libération du ligand s'effectue habituellement au sein des endosomes après acidification de ces derniers et les ligands libérés peuvent alors entrer dans le cytoplasme cellulaire. Un certain nombre de pathogènes utilise cette voie pour gagner directement le cytoplasme des cellules, échappant ainsi aux vésicules endosomales après le processus d'acidification. Les endosomes formés au niveau de la membrane apicale sont rarement dirigés directement vers la membrane plasmique basolatérale. En effet, les contenus endosomaux sont habituellement transportés vers un compartiment de tri intracellulaire dans lequel ils sont redirigés vers des sites spécifiques de la cellule. Les molécules atteignant ces compartiments de tri sont fréquemment envoyées vers une voie de dégradation et se retrouvent finalement à l'intérieur d'une structure lysosomale multivésiculaire. Occasionnellement, les molécules entrant dans les endosomes peuvent atteindre une vésicule se dirigeant vers la membrane basolatérale pour y être libérées, complétant de ce fait la séquence nécessaire à une parfaite « transcytose » via la voie de la RME.

Les deux compartiments de tri des cellules épithéliales intestinales sont appelés compartiment commun de recyclage (CRC) et réseau trans-golgien (TGN). Des protéines spécifiques de surface dirigent le trafic des endosomes vers les structures du CRC et du TGN. Bien que les protéines associées à la « transcytose » et au contrôle du trafic des vésicules aient été décrites, des efforts supplémentaires sont nécessaires afin de mettre en évidence les protéines requises à la signalisation du processus

d'endocytose dirigée de la membrane plasmique apicale vers la membrane basolatérale.

3.1.3. Jonctions serrées et transport paracellulaire [116].

Actuellement, on pense que différentes protéines transmembranaires participent aux contacts cellule/cellule extracellulaires existant entre les cellules épithéliales adjacentes au niveau des jonctions serrées (figure 17). L'occludine fut la première de ces protéines à être identifiée. Récemment, deux autres protéines ont été identifiées, la claudine-1 et la claudine-2. L'expression de ces deux protéines se traduit par l'établissement de liaisons intramembranaires caractéristiques des jonctions serrées. Des études de co-expression avec l'occludine montrent que les claudines semblent être les principales fixations de la jonction serrée et que l'occludine, semble jouer le rôle de coordinateur et de modulateur. De plus, bien que les interactions entre les différentes protéines de la jonction serrée ne soient pas encore parfaitement élucidées, des images obtenues par microscopie électronique après cryofracture suggèrent que la claudine-1, plus que la claudine-2, constitue le principal composant de la jonction serrée au niveau de l'épithélium intestinal. Une autre protéine transmembranaire, la molécule d'adhésion des jonctions (JAM) a aussi été localisée au niveau de la jonction serrée. Cette protéine s'apparente à une protéine de la superfamille des immunoglobulines.

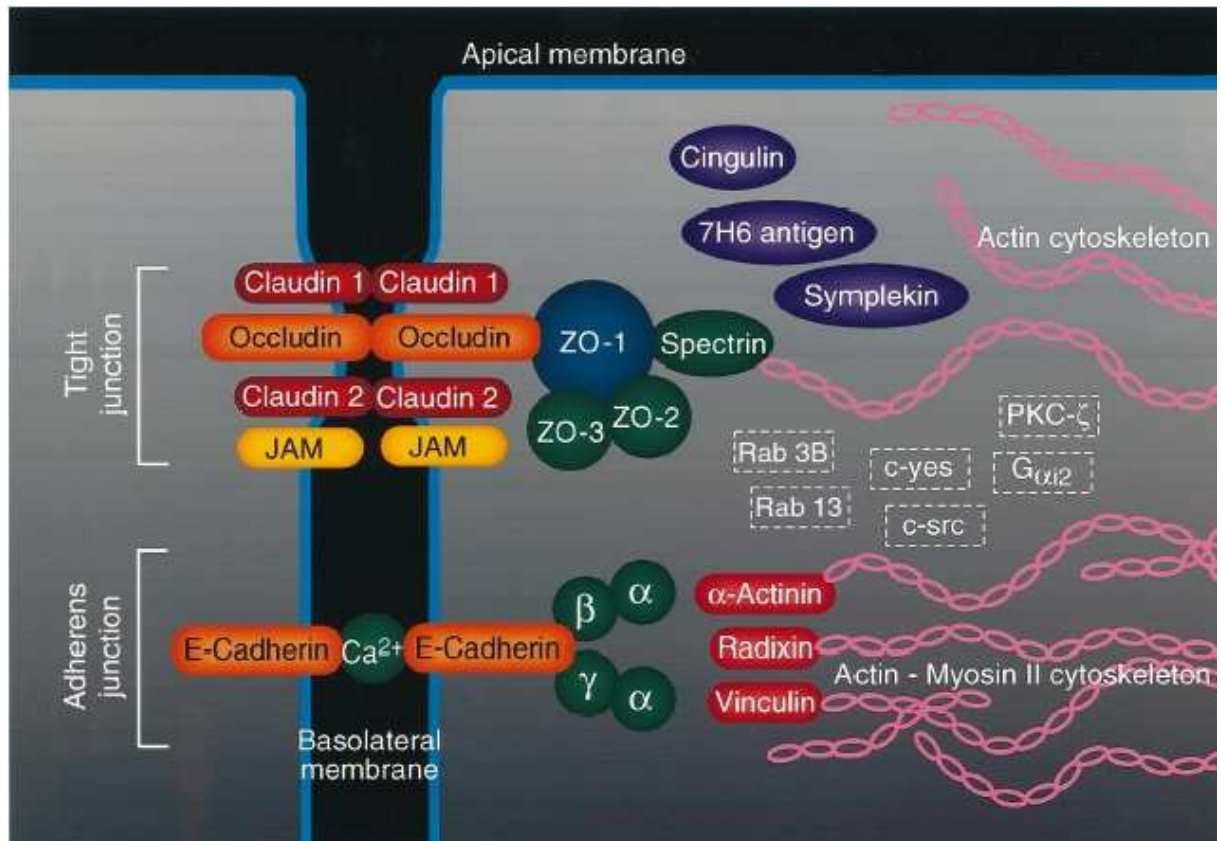


Figure 17 : Composants structuraux et facteurs potentiels de modulation du complexe de jonction apical de l'épithélium intestinal.

Le complexe, composé des jonctions serrées et des jonctions adhérentes, fait appel à des protéines qui interagissent avec les composants du cytosquelette par l'intermédiaire de protéines à multiples domaines de fixation (Daugherty et Mrsny, 1999 (b) [116]).

La claudine-1 et la claudine-2 possèdent de petits domaines intracellulaires et il est ainsi difficile d'imaginer comment ces protéines peuvent établir des interactions avec les autres composants nécessaires à la régulation de la jonction serrée. Le domaine intracellulaire de l'occludine est plus important et interagit avec la zona occludine-1 (ZO-1). La partie amino terminale de la ZO-1 contient de multiples domaines dont une région issue de l'épissage alternatif appelée α . L'expression de ZO-1 α^+ conduit à des structures plus stables de jonctions serrées alors que celle de ZO-1 α^- conduit à des structures plus dynamiques. Les ZO-1 des jonctions serrées de l'intestin sont issues de l'expression de ZO-1 α^+ . Les études de fixation ont suggéré l'interaction de ZO-1 avec deux autres protéines similaires, ZO-2 et ZO-3. Récemment, d'autres protéines intracellulaires telles que la cinguline, l'antigène 7H6, la symplekine ou l'AF-6 ont été localisées au niveau de la jonction serrée. Cependant leurs interactions avec les autres composants de la jonction serrée ne sont toujours pas élucidées.

Les jonctions serrées sont étroitement associées à d'autres systèmes impliqués dans le système de contact cellule/cellule tels que les jonctions adhérentes. De nombreuses jonctions adhérentes sont observées le long des faces latérales des cellules épithéliales intestinales, maintenant un rapprochement étroit mais non serré des cellules adjacentes. Les jonctions adhérentes sont constituées d' α , β et γ caténines complexées à une protéine transmembranaire, l'E-cadhérine. L'E-cadhérine forme des associations cations bivalents dépendantes entre les cellules épithéliales adjacentes. Les jonctions adhérentes et les jonctions serrées s'ancrent au sein de la cellule par l'intermédiaire des composants du cytosquelette. Les interactions entre le cytosquelette et l'occludine s'effectuent, pense-t-on, par l'intermédiaire de la spectrine qui joue le rôle de connecteur entre ZO-1 et l'actine. De même, un complexe protéique constitué de radixin, de vinculine et α -actinine relie le complexe cadhérine/caténine à une structure du cytosquelette connue sous le nom d'anneau périjonctionnel d'actine et de myosine II. Enfin, l'établissement et la maintenance des jonctions adhérentes semblent être importants au développement des jonctions serrées naissantes mais aussi fonctionnelles.

Une ouverture de la barrière intestinale paracellulaire, liée à une rupture des jonctions serrées, peut améliorer l'absorption des médicaments administrés par voie orale. Cependant, l'impact sur la santé des ruptures chroniques ou répétées de cette barrière n'est pas clairement établi. Une rupture complète des jonctions serrées ou une perte transitoire de leurs fonctions peut conduire à un dysfonctionnement aigu de l'épithélium. Une meilleure connaissance des relations entre la structure et la fonction des composants des jonctions serrées permettrait de manipuler ces dernières de façon plus contrôlée tout en respectant leur dynamique. De la sorte, l'administration des médicaments faiblement absorbés par voie orale tels que des protéines ou des peptides deviendrait possible sans pour autant y associer d'événements traumatiques.

Un certain nombre de composants des jonctions serrées a récemment été identifié et d'autres le seront certainement dans l'avenir. Une meilleure connaissance des rôles et des interactions de tous ces composants devrait permettre l'ouverture et la fermeture des jonctions serrées de façon sélective et de ce fait, acceptable pour des applications pharmaceutiques.

3.2. Barrière gastro-intestinale et héparine.

Les premiers travaux visant à mettre en évidence un éventuel passage de l'héparine dans le plasma sanguin après une administration intragastrique ont été décevants [117]. En effet, bien que 15570 UI d'héparine non fractionnée aient été administrées à des lapins, l'activité anti-Xa obtenue restait faible (0.042 ± 0.046 UI anti-Xa/ml).

D'autres travaux ont mis en évidence l'absorption de l'héparine marquée à l'iode¹²⁵, après une administration intragastrique à des rats, et détectée plus particulièrement au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins [118]. Cette même équipe a par la suite démontré que de l'héparine non fractionnée administrée par voie intragastrique (3.25 à 60 mg/kg) à des rats présentant une thrombose induite au niveau de la veine jugulaire permettait, après 4 heures, de diminuer le thrombus de façon dose dépendante [119]. Sur le même modèle de thrombose veineuse, d'autres travaux ont également mis en évidence la biodistribution d'héparine non fractionnée marquée au C¹⁴ administrée par voie intragastrique (appareil digestif, endothélium des veines caves et aortiques, rate, rein, urine, fèces, plasma sanguin) et son efficacité à diminuer l'incidence des thromboses [120]. L'effet antithrombotique de deux types d'héparine de bas poids moléculaire a également été vérifié après administration intragastrique à des rats souffrant de thromboses veineuses (logiparine [121], réviparine sodique [122]).

D'autres travaux viennent corroborer ces résultats : Costantini et coll. [123] ont évalué la biodisponibilité et l'activité antithrombotique d'un dérivé d'héparine non fractionnée radiomarké après administration intraduodénale à des rats. Les résultats obtenus suggèrent une dégradation importante du principe actif au cours de l'absorption gastro-intestinale. De l'héparine est absorbée car la radioactivité augmente très rapidement non seulement dans le plasma sanguin mais aussi à la surface des segments aortiques et caves. Toutefois, le pic de concentration plasmatique est atteint 5 minutes après administration. La concentration plasmatique diminue alors très rapidement et moins de 2.5% de la radioactivité totale circule encore 3 heures après administration. Néanmoins, cette administration prévient la formation d'un thrombus de façon dose dépendante (DE_{50} , 2000 UI/kg) et l'effet antithrombotique est maximal si l'héparine est administrée 30 à 60 minutes avant la ligature de la veine cave.

Toutefois, les travaux menés chez l'homme sont moins encourageants : aucune activité anticoagulante n'a pu être détectée dans le plasma sanguin d'individus sains ayant absorbé 5000 UI d'héparine non fractionnée [124] et l'administration orale de 40000 UI d'héparine non fractionnée à 17 volontaires sains n'a entraînée qu'un très faible allongement du temps de coagulation mesuré par le temps de céphaline activée [125].

En raison de ces résultats mitigés, de nombreux travaux ont été menés afin d'augmenter l'absorption intestinale de l'héparine.

3.3. Systèmes favorisant l'absorption gastro-intestinale de l'héparine.

Un promoteur d'absorption est un adjuvant pharmaceutique (c'est-à-dire une substance dénuée d'action thérapeutique) qui est ajouté à une préparation pharmaceutique de façon à en améliorer ses propriétés et destiné à favoriser l'absorption du principe actif.

3.3.1. Complexes héparine/adjuvants.

Les travaux menés par Windsor et Croheim (1961) [126] ainsi que par Tidball et Lipman (1962) [127] ont consisté à complexer une héparine estérifiée avec un chélateur de calcium comme le sel de sodium de l'acide éthylène diaminetétraacétique (NaEDTA). L'ajout de cet adjuvant médicamenteux permettait une augmentation de l'absorption de l'héparine au niveau du jéjunum de rat. Toutefois, une toxicité intestinale importante a pu être observée suite à l'utilisation de cet adjuvant.

De ce fait, les chercheurs furent confrontés à la question suivante : comment promouvoir l'absorption orale de cette molécule au caractère anionique sans entraîner trop de perturbations au niveau de l'épithélium intestinal ?

Différents types d'adjuvants furent alors testés : le diméthylsulfoxyde, la diéthylsulfone et leurs homologues [128], la glycine [129], la spermine ou la lysine [130]. Tous ces adjuvants ont permis de diminuer le caractère anionique de l'héparine et d'augmenter son absorption qui reste toutefois faible après administration par voie orale.

L'idée de diminuer la charge superficielle de la molécule pour augmenter son absorption se perpétue à travers des solutions de sels acides d'héparine [131] puis à travers des paires d'ions entre l'héparine de faible masse moléculaire et des composés organiques basiques plus ou moins lipophiles [132]. Ces promoteurs d'absorption ont également permis d'augmenter l'absorption intestinale chez l'animal mais, pour une même dose, l'activité biologique reste 10 fois plus faible que celle obtenue après administration sous-cutanée.

3.3.2. Sels diamine d'héparine [133].

Le but de former des sels d'héparine est similaire à celui de préparer des complexes d'héparine, à savoir la diminution de la charge superficielle des héparines. Pour cela, les héparines sont combinées à des molécules lipophiles mono ou diaminées qui jouent le rôle de contre-ion et appelées composés ITF pour ItalFarmaco. Si les sels de diamine sont bien absorbés au niveau intraduodéal, les sels de monoamine ne sont, quant à eux, que faiblement absorbés. Il a aussi été observé que tous ces composés tendent à former en solution des agrégats micellaires stables mais à des concentrations critiques différentes. Les études *in vivo* chez le chien et le lapin montrent que la biodisponibilité orale de l'héparine est augmentée. Cependant, ce système a été abandonné liée à une toxicité trop importante au niveau de l'appareil digestif.

3.3.3. Acides non α amino acylés [134].

Ces promoteurs d'absorption sont des composés synthétisés par N-acylation de la forme commerciale de l'acide 4-(4-aminophenyl)butyrique (figure 18).

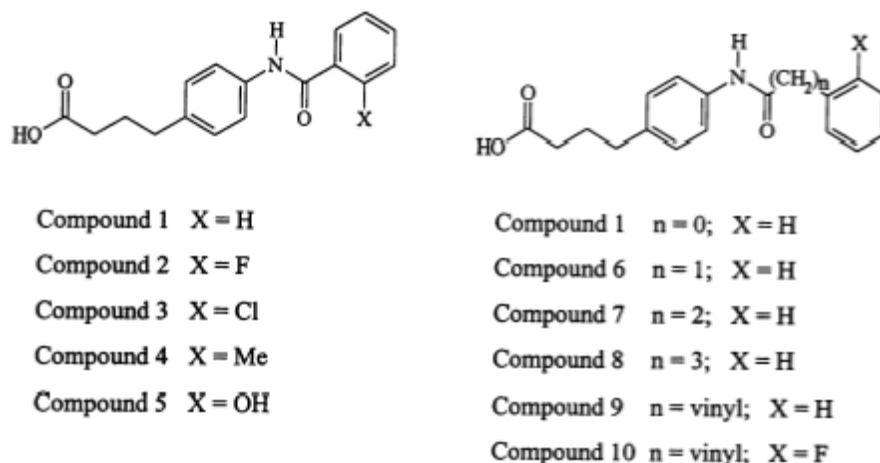


Figure 18 : Structures chimiques des acides non α amino acylés.
(Leone-Bay, 1998 [134]).

Ces composés ont été testés chez des rats mâles Sprague-Dawley afin d'évaluer leur capacité à promouvoir l'absorption gastro-intestinale de l'héparine après administration orale. En fonction du composé testé, l'augmentation de l'aPTT a été observée d'un facteur allant de 1,5 à 8 fois. Les composés 5 et 10 se sont révélés être les plus actifs et, de ce fait, ont été sélectionnés pour des études *in vivo* complémentaires menées chez le rat. Des solutions contenant le composé 5 à une concentration de 300 mg/kg associé à l'héparine à différentes doses (100, 50 et 25 mg/kg) ont été administrées par voie orale. Pour la plus forte dose d'héparine, tous les rats sont morts au bout de 30 minutes, dû probablement à des saignements trop importants. A la dose de 50 mg/kg, les valeurs de l'aPTT obtenues correspondent aux valeurs obtenues avec de l'héparine administrée par voie duodénale à la dose de 250 à 500 mg/kg ; l'activité anticoagulante est ainsi augmentée d'un facteur 5 à 10. Des administrations isolées d'héparine ou de promoteurs n'induisent pas d'élévation de l'aPTT.

L'augmentation du pic d'aPTT ne fut pas aussi significative lorsque la dose de l'agent 5 fut diminuée (150 et 75 mg/kg). Ainsi, pour l'absorption d'une dose donnée d'héparine, il est peut-être nécessaire de respecter une quantité minimale de promoteur ou un rapport optimal entre le médicament et le promoteur. Les études menées avec le composé 10 ont donné des résultats similaires. Les valeurs de biodisponibilité orale estimées sont de 6% pour le composé 10 et de 4% pour le composé 5 ; pour des doses respectives d'héparine et de promoteur de 100 mg/kg et 150 mg/kg.

Ces études menées chez le rat, ont également été testées chez le singe cynomolgus afin de démontrer l'absorption gastro-intestinale de l'héparine administrée par voie orale chez une deuxième espèce, qui plus est, non rongeur. Après administration orale de 300 mg/kg du composé 10 et 15 mg/kg d'héparine, la biodisponibilité orale obtenue fut estimée à 39 % chez le singe.

Enfin, des études de chromatographie d'affinité et des études de spectroscopie utilisant du bleu de méthylène ont permis de mettre en évidence l'existence d'interactions entre l'héparine et cette famille de promoteurs. Ces promoteurs étant chargés négativement, il est tout à penser que ces interactions s'effectuent par liaisons hydrophobes ou par liaisons hydrogènes. De plus, ces études *in vitro* sont corrélées aux études *in vivo*, ce qui permet de les utiliser comme techniques de « screening » *in vitro*.

3.3.4 SNAC et SNAD.

Le sodium N-[10-(2 hydroxybenzoyl)amino]decanoate (SNAD) et le sodium N-[8(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate (SNAC) ont été spécifiquement synthétisés pour promouvoir l'absorption respective des HBPM et des HNF. Le SNAC et le SNAD sont des molécules qui se fixent de façon non covalente à l'héparine afin de neutraliser ses charges ioniques négatives pour la rendre plus lipophile et améliorer ainsi son absorption à travers la muqueuse intestinale. Une fois dans la circulation systémique, ces molécules de transport se dissocient de l'héparine, lui permettant ainsi d'exercer son effet anticoagulant [135].

L'HNF combinée au SNAC dans une solution aqueuse de propylène glycol à 25% (v/v) est absorbée à travers le tractus gastro-intestinal de rats comme de singes pour des doses de 100 mg/kg d'héparine pour 300 mg/kg de promoteur chez le rat et de 30 mg/kg d'héparine pour 150 mg/kg de promoteur chez le singe [136].

Dans une étude randomisée en double aveugle réalisée chez l'homme, le SNAC a permis d'augmenter les valeurs de l'aPTT, du facteur anti-Xa, et du TFPI alors que l'héparine et le SNAC administrés séparément par voie orale n'ont aucun effet. Dans une étude visant à masquer le goût de la solution de SNAC/héparine, la préparation réalisée fut bien tolérée bien que des vomissements soient survenus pour les doses les plus importantes. Les valeurs d'activité anti-Xa et de l'aPTT ont

progressivement augmenté avec des doses croissantes de SNAC/héparine [137]. Dans l'étude de phase I menée chez l'homme, différentes doses d'HNF et de SNAC ont été administrées à des volontaires sains soit sous forme de solution buvable soit par tubage gastrique. Une élévation significative des valeurs d'aPTT, du TFPI, des activités anti-IIa et anti-Xa a été notée. Cette étude a permis de démontrer la possibilité d'une administration orale d'HNF chez l'homme conduisant à un effet antithrombotique efficace.

Utilisant le modèle de thrombose de la veine jugulaire induite par la formaline chez le rat, le complexe SNAC/héparine administré par voie orale s'est avéré être aussi efficace qu'une HBPM administrée par voie sous cutanée [138]. Les valeurs d'aPTT et d'activité anti-Xa du groupe SNAC/héparine comparées à celles des groupes SNAC seul et héparine seule, augmentèrent les 15 premières minutes puis restèrent à un niveau élevé pendant près de 4 heures. L'incidence et la taille des thrombi résiduels furent diminuées de façon similaire et significative dans les groupes SNAC/héparine et HBPM.

Dans une étude clinique de phase II randomisée, des patients (n=123) ayant subi une intervention chirurgicale de prothèse totale de la hanche ont reçu soit du SNAC/héparine (1.5g de SNAC/60 000 unités d'HNF ou 2.25 g de SNAC/90 000 unités d'HNF) soit 5000 unités d'HNF par voie sous-cutanée toutes les 8 heures pendant 5 jours [139]. Les patients furent en observation pendant 35 jours suivant l'opération. Un patient du groupe SNAC/héparine présenta une thrombose veineuse profonde proximale, 3 patients du groupe SNAC/héparine à forte dose développèrent aussi une thrombose veineuse profonde proximale, deux patients du groupe HNF par voie sous-cutanée présentèrent une embolie pulmonaire et une thrombose veineuse profonde proximale. Aucun décès et aucune thrombocytopénie ne furent observés. Il y eut deux saignements majeurs dans le groupe SNAC/héparine à forte dose et 6 patients (3 patients du groupe SNAC/HBPM à faible dose et 3 patients du groupe HNF administrée par voie sous-cutanée) présentèrent des saignements mineurs.

Dans une étude clinique internationale multicentrique de phase III (124 centres) randomisée et en double aveugle menée chez 2264 patients, l'efficacité et la sécurité d'un traitement à base d'une solution orale de SNAC/héparine débuté 4 à 6 heures après l'opération chirurgicale (remplacement total de la hanche ou chirurgie de révision) et poursuivi pendant 27 à 30 jours furent comparée à l'énoxaparine administrée par voie sous-cutanée 12 à 24 heures après l'opération pendant 10 jours à

une dose de 30 mg 2 fois par jour. Ainsi, à l'issue de cette étude, 13.9 % des patients sous SNAC/héparine à forte dose et 18.6 % des patients sous SNAC/héparine à faible dose ont développé une thrombose veineuse profonde proximale. Les saignements majeurs furent rares et les saignements mineurs et les hématomes furent peu fréquents [140]. Malgré une faible observance des patients, cette étude fournit la preuve que l'héparine administrée par voie orale possède une activité antithrombotique importante. Cette étude fut la première à montrer, dans une population importante, la diminution de la fréquence du thromboembolisme veineux post-opératoire avec une faible fréquence des complications d'ordre hémorragique chez les patients subissant une opération de remplacement de la hanche.

Les SNAD ont été spécifiquement synthétisés pour favoriser l'absorption intestinale des HBPM administrées par voie orale. Des études similaires à celles menées pour les SNAC ont évalué l'efficacité des préparations SNAD/HBPM dans la prévention et le traitement de la thrombose veineuse profonde.

L'étude de Salartash et de ses collaborateurs [141] a porté sur l'observation de 60 rats ayant reçu oralement soit une solution saline d'HBPM, soit une solution saline de SNAD, soit une préparation SNAD/HBPM ou une solution d'HBPM par voie sous-cutanée. Les veines jugulaires internes et les thrombi ont été récupérés afin d'évaluer la présence ou l'absence de thrombus ainsi que le poids des thrombi. De plus, cette équipe a également évalué l'activité anti-Xa des préparations SNAD/héparine en administrant à 30 rats divisés en 4 groupes une solution d'HBPM par voie sous-cutanée, une solution orale de SNAD, une solution orale d'HBPM ou une préparation SNAD/HBPM. Cette étude a permis de montrer une réduction significative des thrombi entre les groupes contrôles (100 %), le groupe HBPM par voie sous-cutanée (8 %) et le groupe SNAD/HBPM (0 %) ainsi qu'une réduction significative du poids des thrombi dans le groupe SNAD/HBPM et HBPM par voie sous-cutanée comparativement aux autres groupes. Enfin, l'activité anti-Xa était significativement élevée et ce sur une période de près de 4 heures dans les groupes SNAD/HBPM et HBPM par voie sous-cutanée.

Salartash et ses collaborateurs [142] ont poursuivi leurs études avec le SNAD en testant l'efficacité du couple SNAD/HBPM sur un modèle de thromboses veineuses profondes chez le porc. Quarante porcs ont ainsi été répartis en 4 groupes : le premier groupe reçut une solution saline par voie orale, le second groupe, une solution

d'HBPM, le troisième groupe, une solution de SNAD et le dernier groupe reçut la préparation SNAD/HBPM par voie orale. A la fin du traitement, les veines caves inférieures furent récupérées et analysées. Le poids des thrombi résiduels fut significativement plus faible pour le groupe SNAD/HBPM que pour le groupe contrôle (respectivement 0.038 et 0.097 g/kg). L'activité anti-Xa atteignit sa concentration maximale (0.2 UI anti-Xa/mL) 1 heure 30 après administration orale du couple SNAD/HBPM et une concentration comprise entre 0.15 et 0.2 UI anti-Xa/mL fut maintenue durant 5 heures.

3.3.5 Acide désoxycholique.

Lors de la synthèse de complexes entre l'héparine et l'acide désoxycholique (DOCA), les groupements carboxyles du DOCA ont été couplés aux groupements aminés de l'héparine. En effet, si d'autres groupements fonctionnels de l'héparine avaient été utilisés pour augmenter le nombre de molécules de DOCA fixées tels que les groupements sulfonyles, carboxyles ou hydroxyles qui appartiennent au site actif de l'héparine, l'activité des dérivés ainsi formés aurait complètement disparue. Les liaisons amide entre l'héparine et le DOCA ont été mises en évidence par spectroscopie infrarouge et transformée de Fourier (FT-IR) et par résonance magnétique nucléaire au carbone 13 (^{13}C -RMN).

Les études *in vivo* menées chez le rat par l'équipe de Lee [143] ont montré une augmentation du temps de coagulation et une augmentation de l'activité anti-Xa après administration orale de différentes doses (50, 80, 100 et 200 mg/kg) de complexes DOCA/héparine (ratio = 10). A la dose de 200 mg/kg et 1 heure après administration, la valeur du temps de coagulation était 7 fois supérieure à la valeur du temps de référence (1.5 à 2.5 fois le temps de référence) et l'activité anti-Xa était 9 à 10 fois supérieure à la valeur de référence (0.1 à 0.2 UI/mL). De plus, cette équipe a montré que l'activité anti-Xa diminuait légèrement avec l'augmentation du rapport DOCA/héparine alors que les valeurs maximales du temps de coagulation augmentaient. Une étude menée avec des conjugués d'héparine et d'acide laurique (C_{12}), d'acide palmitique (C_{16}), du cholestérol (C_{24}) et du DOCA ont montré que l'hydrophobicité des dérivés d'héparine est un paramètre important pour augmenter l'absorption à travers le tractus gastro-intestinal. Cette étude montre alors que le temps de coagulation augmente avec l'hydrophobicité des molécules couplées à l'héparine.

Cependant, il est important de noter que le temps de coagulation du complexe DOCA/héparine est nettement supérieur à celui du complexe cholestérol/héparine alors que le cholestérol est bien plus hydrophobe que le DOCA. Ceci démontre que le DOCA doit posséder des propriétés autres que son hydrophobicité pour augmenter l'absorption de l'héparine à travers la barrière gastro-intestinale. Une des propriétés possibles pourrait être la capacité d'interaction du DOCA avec les récepteurs pour les acides biliaires. En effet, les conjugués d'acides biliaires et de peptides de faible masse moléculaire sont connus pour emprunter un transporteur sodium-dépendant situé principalement au niveau de la membrane apicale des entérocytes iléaux. Toutefois, il serait difficile aux complexes DOCA/héparine de diffuser à travers la barrière gastro-intestinale par l'intermédiaire d'un transport actif du fait d'une masse moléculaire importante. Néanmoins, on peut penser que les interactions entre les complexes DOCA/héparine et les récepteurs pour le DOCA peuvent augmenter l'adhésion de ces complexes au niveau de la barrière gastro-intestinale et de ce fait, augmenter leur absorption.

Enfin, une étude histologique de la barrière gastro-intestinale menée avec 200 mg/kg de complexe DOCA/héparine à un rapport de 10 administré par voie orale a été conduite. Après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, la tomographie par émission monophotonique (TEM) n'a pas mis en évidence de lésions de la barrière gastro-intestinale, confirmant ainsi que l'augmentation de l'absorption de l'héparine par voie orale induite par le DOCA n'est pas liée à une rupture de son épithélium.

Lee et ses collaborateurs [144], dans une seconde étude toujours menée chez le rat, ont testé des héparines de différents poids moléculaires administrées par voie orale : 2 HBPM (3000 et 6000 Da) et 1 HNF (12 000 Da). Parmi les 3 dérivés d'héparine synthétisés, ce fut le complexe DOCA/HBPM de 6000 Da qui démontra l'effet anticoagulant le plus important après administration orale. De plus, ils ont également montré que les molécules de DOCA ont diminué la demi-vie du complexe DOCA/HBPM et augmenté sa clairance, ceci s'expliquant sans doute par le fait que le complexe doit posséder une affinité légèrement plus importante pour les protéines plasmatiques. De ces résultats, on peut supposer que le complexe DOCA/HBPM existe dans la circulation sanguine sous forme de conjugué sans dissociation du complexe, confirmant ainsi la stabilité des liaisons amides. A une dose de 20 mg/kg, ce complexe DOCA/HBPM de 6000 Da possède des valeurs de temps de coagulation

(52.5 ± 4.7 secondes 1 heure après administration pour une référence d'environ 20 secondes) situées dans la fenêtre thérapeutique (1.5 à 2.5 fois la valeur de référence) et une biodisponibilité orale de 7.8 %.

Une troisième étude de Lee et de ses collaborateurs [145] a pour but de développer un nouveau système de transport des HBPM utilisant des nanoparticules de DOCA/HBPM. Des essais *in vivo* ont été réalisés chez le rat, la souris et le singe. Cependant, cette étude a révélé des différences significatives entre les espèces dans l'absorption intestinale des complexes DOCA/HBPM liées à des différences anatomiques du tractus gastro-intestinal de chaque espèce et en particulier à la présence ou non de vésicule biliaire. En effet, le rat ne possède pas de vésicule biliaire et à jeun, les acides biliaires ne pouvant être stockés, ils sont sécrétés de façon continue dans la lumière intestinale. La quantité d'acides biliaires retrouvée chez les rats à jeun était d'environ 200 mg/kg. D'autre part, dans les mêmes conditions de jeûne, la souris possédant une vésicule biliaire, n'a pas montré la présence d'acides biliaires dans la lumière intestinale. Quant au singe qui possède également une vésicule biliaire, les acides biliaires sont sécrétés dans la lumière intestinale de façon périodique à un volume de 5 à 7 mL/h à jeun. Dans le cas des souris, l'absorption intestinale des complexes DOCA/HBPM augmente de façon significative après administration orale et en présence d'une solution de bile externe (bile humaine ou DOCA libre), ce qui confirme l'hypothèse précédente.

Il a aussi été montré que la présence d'acides biliaires tels que du DOCA libre induit des changements structuraux des nanoparticules de DOCA/HBPM qui pourraient avoir un effet favorable à leur absorption intestinale. Les complexes DOCA/HBPM forment des nanoparticules dans un environnement aqueux tel que la lumière intestinale de souris à jeun. En effet, les conjugués hydrophobes d'héparine s'agrègent par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes et les molécules hydrophiles d'héparine sont orientées vers l'extérieure de la structure (figure 19).

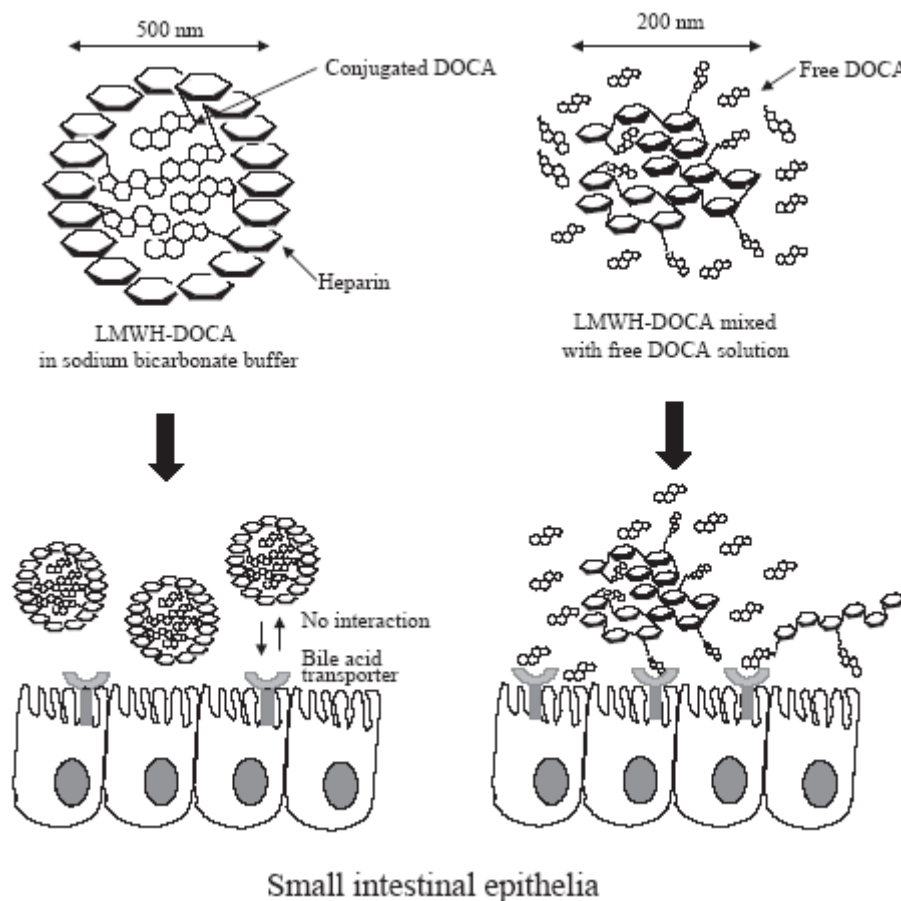


Figure 19 : Mécanismes d'action proposés de coopération du DOCA conjugué et du DOCA libre pour l'amélioration de l'absorption des HBPM au sein de l'intestin grêle (Lee et al., 2006 [145]).

D'autre part, en présence de DOCA libre, comme cela peut-être le cas dans la lumière intestinale de rat, les molécules de DOCA conjuguées à l'héparine sont exposées en surface des nanoparticules, ce qui conduit à une diminution de la taille des nanoparticules. Grâce à ses groupements carboxyliques et hydroxyles, le DOCA libre agit comme un agent de surface. Cet effet coopératif du DOCA libre et du DOCA conjugué a aussi été démontré chez le singe. En présence de 200 mg/kg de DOCA libre, 12 000 UI/kg de DOCA/HBPM ont permis d'obtenir une biodisponibilité de 6.8 %. Une administration orale de 50 mg/kg soit 6000 UI/kg de DOCA/HBPM a permis de maintenir une activité anti-Xa dans les valeurs thérapeutiques (0.1 à 0.2 UI/mL) pour le traitement de la thrombose veineuse profonde ou de l'embolisme pulmonaire durant près de 8 heures.

Enfin, les images de microscopie confocale permettent de montrer une forte absorption jéjunale et iléale des complexes DOCA/HBPM en présence de DOCA libre. Ceci confirme les interactions pouvant exister entre les conjugués de DOCA et les transporteurs iléaux des acides biliaires.

Kim et ses collaborateurs [146] ont, quant à eux, développé un système de microémulsion permettant la dissolution du complexe DOCA/HBPM. La microémulsion est utilisée pour augmenter la solubilité des molécules amphiphiles ou lipophiles. Comparée aux méthodes d'émulsion conventionnelles ou aux transporteurs lipidiques, elle présente différents avantages tels qu'une bonne stabilité thermodynamique et une préparation aisée. Après avoir testé la solubilité du complexe DOCA/HBPM dans huit huiles différentes, cette équipe a finalement choisi d'utiliser la tricapryline comme huile et le Tween[®] 80 et le Span[®] 20 comme agents tensioactifs. Les études *in vivo* menées chez le rat, n'ont pas montré de différences significatives des paramètres pharmacocinétiques entre l'HBPM seule et le complexe DOCA/HBPM dans l'eau après administration orale chez la souris. Une fois dissout dans la microémulsion de tricapryline, le complexe DOCA/HBPM présente une biodisponibilité supérieure à celle de l'héparine seule, respectivement 1.5 % et 0.6 %. L'effet du complexe DOCA/HBPM dissout dans la microémulsion de tricapryline a également été évalué chez le singe. Pour le contrôle (100 mg/kg de DOCA/HBPM seul), la concentration plasmatique du complexe DOCA/HBPM ne présenta pas d'augmentation. Une fois dissout dans la microémulsion de tricapryline, le complexe DOCA/HBPM permet l'obtention d'une concentration plasmatique maximale de 0.43 ± 0.09 UI/mL 3 heures après administration orale qui fut maintenue à des valeurs supérieures à 0.1 UI/mL durant près de 6 heures. De plus, l'amélioration de l'absorption intestinale du complexe DOCA/HBPM par la microémulsion de tricapryline après administration orale fut observée de façon plus significative chez le singe que chez le rat. Finalement, cette équipe pense qu'une dose de 20 mg/kg de DOCA/HBPM dans une microémulsion de tricapryline pourrait être suffisante pour prévenir la thrombose veineuse profonde et l'embolisme pulmonaire.

Dans une autre étude, l'équipe de Kim [147] a étudié la dissolution de nanoparticules de DOCA/HBPM dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Le DMSO possède une faible toxicité pour des concentrations inférieures à 50 % en solution et sa

dose sans effet observé (NOEL) est égale à 1100 mg/kg/jour. La toxicité des conjugués de DOCA/HBPM en présence de DMSO (10 %) a été évaluée par une étude de 6 mois chez la souris. Les analyses effectuées n'ont pas révélé de lésions de la membrane intestinale. De plus, les complexes DOCA/HBPM sont complètement dissous pour des concentrations de DMSO supérieures à 10 % en solution, et administrés par voie orale dans une solution de DMSO à 10%, les complexes DOCA/HBPM présentent une absorption intestinale significativement augmentée.

3.3.6 Carbopol®934P.

Le Carbopol®934P (C934P) est un dérivé poly(acrylate) approuvé par la Food and Drug Administration (FDA). Des études précédentes ont déjà montré que le C934P permettait d'augmenter l'absorption intestinale de la buséréline de façon significative chez le rat après administration intraduodénale. De ces résultats, Thanou et son équipe [148] ont mené des études chez le rat et le porc afin de déterminer la capacité du C934P à promouvoir l'absorption d'une HBPM. Cependant, le C934P et l'HBPM possèdent tous deux des charges négatives, ainsi des interactions électrostatiques entre eux ne peuvent être qu'exclues.

Les résultats *in vivo* trouvés chez le rat (HBPM à 10 800 UI anti-Xa/kg) et le porc (HBPM à 5000 UI anti-Xa/kg) ont montré que le C934P (1%_{m/v}) a permis d'augmenter l'absorption de l'HBPM par voie intraduodénale pour prévenir la formation des thrombi. L'activité anti-Xa fut maintenue à 0.3 unités anti-Xa pendant près de 6 heures chez le rat. Chez le porc, l'activité anti-Xa a atteint son maximum ($C_{\max} = 0.25$ UI/mL) 2 heures après administration puis a diminué progressivement jusqu'à 0.2 UI/mL 7 heures après administration. Le C934P agit probablement grâce à ses propriétés mucoadhésives et à son influence sur les jonctions serrées intercellulaires.

Enfin, comparé aux complexes d'héparine, le C934P présente les avantages suivants : du fait de sa nature polymérique ($PM > 10^6$ Da), le C934P associé à une HBPM n'est presque pas absorbé au niveau intestinal contrairement au SNAD qui lui, est absorbé sous forme de complexes avec l'héparine. Le C934P permet aussi d'augmenter la perméation des molécules médicamenteuses de façon réversible, uniquement par voie paracellulaire le long des entérocytes.

3.3.7 Chitosane et dérivés.

Le chitosane agit par l'intermédiaire d'interactions entre ses charges positives et les charges négatives des jonctions serrées et des composants de la membrane cellulaire, favorisant ainsi un passage paracellulaire des composés hydrophiles. Cependant, le chitosane présente une faible solubilité aux pH supérieurs à 6.5, ce qui limite son utilisation en tant que promoteur d'absorption intestinale. De ce fait, des dérivés du chitosane ont alors été synthétisés et testés comme promoteurs d'absorption. L'ajout de groupements alkyles et carboxyméthyles à la molécule de chitosane permet d'augmenter de façon importante la solubilité du chitosane aux pH neutres et alcalins. Des associations chitosane- β -cyclodextrine et chitosane-PEG ont permis, quant à elles, d'améliorer la solubilité des substances hydrophobes. Enfin, le N-triméthyl chitosane (TMC) s'est révélé être supérieur au chitosane dans l'amélioration du passage paracellulaire de peptides aussi bien dans des études *in vitro* (monocouche de cellules Caco-2) qu'*in vivo* (chez le rat).

Thanou et ses collaborateurs [149] portent leur attention sur une autre modification du chitosane qui aboutit à un nouveau dérivé : le mono-N-carboxyméthyl chitosane (MCC) qui peut être soit de haute viscosité soit de faible viscosité, respectivement HMCC et LMCC.

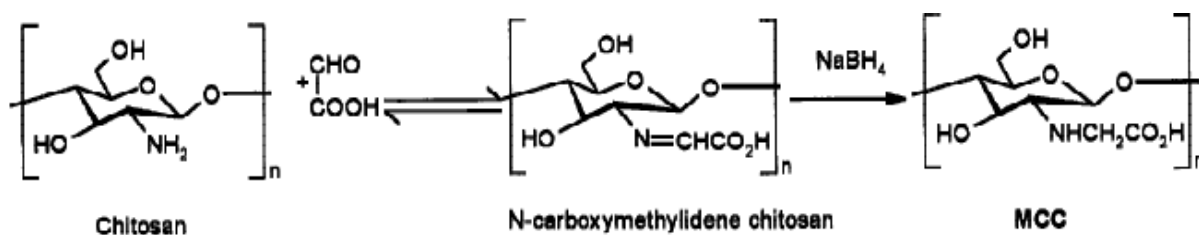


Figure 20 : Représentation schématique de la synthèse du mono-N-carboxyméthyl chitosane (MCC).
(Thanou et al., 2001 [149]).

Comparé au TMC qui forme des précipités, ce nouveau dérivé au caractère polyampholytique forme des gels ou des solutions claires (en fonction de la concentration) en présence de composés polyanioniques tels que les HBPM. Dans cette même étude, les MCC se sont révélés être capables de diminuer significativement la résistance électrique transépithéliale (TEER) des cellules Caco-2 aux concentrations de 3 et 5 %. La viscosité des MCC semble être un facteur

important pour la résistance électrique transépithéliale et le transport des macromolécules à travers la monocouche de cellules Caco-2. En effet, les LMCC ont montré un effet plus important sur la TEER et le transport des HBPM que les HMCC. Ce phénomène peut être expliqué par un meilleur contact des LMCC avec les jonctions serrées de la barrière intestinale. Concernant le transport des HBPM à travers la monocouche de cellules Caco-2, il semblerait que la viscosité élevée des HMCC empêche la diffusion des HBPM à travers le polymère et de ce fait, à travers la monocouche cellulaire.

Enfin la dernière étude menée par l'équipe de Thanou [150] sur les dérivés du chitosane porte sur l'évaluation du N-sulfato-N,O-carboxyméthyl chitosane (SNOCC) en tant que promoteur d'absorption orale de la réviparine. Après administration intraduodénale de la réviparine à la dose de 5 000 U anti-Xa/kg en présence de SNOCC (30mg/ml), L'activité anti-Xa maximale déterminée chez les rats 5 heures après administration fut de 0,40 U anti-Xa/ml. Comparé à l'héparine administrée sans promoteur d'absorption, ce dérivé de chitosane a permis d'améliorer l'absorption de la réviparine de l'ordre de 18 fois.

3.3.8 LabrasolTM, Gelucire 44/14TM et acides gras saturés.

Le LabrasolTM et le Gelucire 44/14TM sont des excipients disponibles dans le commerce. Ils présentent une faible toxicité et sont composés d'un mélange précis de mono-, di- et triglycérides et de diesters de polyéthylène glycol. La longueur des chaînes d'acides gras du LabrasolTM est comprise entre C₆ et C₁₄ avec une prédominance des chaînes en C₈ et en C₁₀. Le Gelucire 44/14TM, quant à lui, contient des chaînes d'acides gras saturés en C₈-C₁₈ avec une prédominance des chaînes en C₁₂. La différence entre le LabrasolTM et le Gelucire 44/14TM porte donc sur la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras prédominant.

Ces deux composés permettent d'améliorer la biodisponibilité de principes actifs lipophiles et hydrophiles en créant de super microémulsions sous conditions physiologiques à 37°C. Cependant, leur action ne semble pas uniquement liée à une augmentation de solubilité des principes actifs mais aussi à une augmentation de leur absorption au niveau des entérocytes. Toutefois, ce mécanisme n'est pas encore clairement établi. Une des hypothèses proposées porte sur des changements de fluidité

et de structure de la membrane entraînant des changements de perméabilité membranaire. Cependant, un tel mécanisme devrait conduire à des atteintes aiguës de l'épithélium intestinal, atteintes qui ne sont pas retrouvées avec l'utilisation du LabrasolTM et du Gelucire 44/14TM dont les toxicités respectives sont très faibles. A titre indicatif, la dose létale 50 (DL50) du LabrasolTM est de 22g/kg chez le rat.

L'administration concomitante de LabrasolTM (30 mg/kg) et d'HBPM (20 mg/kg) chez le rat conduit à une activité anti-Xa maximale de 0.32 ± 0.08 UI/mL 15 minutes après administration intraduodénale. Le Gelucire 44/14TM, quant à lui, ne semble pas permettre l'absorption intestinale d'HBPM. Dans les mêmes conditions, l'activité anti-Xa maximale est de 0.11 ± 0.06 UI/mL 40 minutes après administration. Cette différence d'absorption semble être due à des longueurs différentes des chaînes carbonées des acides gras. Pour vérifier cette hypothèse, Mori et ses collaborateurs [151] ont testé différents acides gras (30 mg/kg) afin de déterminer la longueur optimale de la chaîne carbonée. Les activités anti-Xa maximales obtenues furent les suivantes : C₁₀ (1.45 ± 0.28 UI/mL) ; C₁₂ (1.35 ± 0.22 UI/mL), C₁₄ (0.94 ± 0.17 UI/mL), C₁₆ (0.46 ± 0.04 UI/mL), C₈ (0.11 ± 0.04 UI/mL) et C₆ (0.04 ± 0.02 UI/mL).

Malgré des chaînes d'acides gras en C₁₀-C₁₆, le LabrasolTM et le Gelucire 44/14TM améliorent moins bien l'absorption d'HBPM par rapport aux acides gras saturés en C₁₀-C₁₆. La diminution de cette absorption peut être attribuée à leur formulation mélangeant des mono-, di- et triglycérides avec des mono- et diesters d'acides gras. L'effet plus faible du Gelucire 44/14TM par rapport au LabrasolTM est probablement dû à des différences physicochimiques telles que la formation de la microémulsion.

L'étude de Rama Prasad et de ses collaborateurs [152] indique que chez le rat, le jejunum semble être le meilleur site d'absorption de l'HBPM (200 UI/kg) en présence de LabrasolTM (50 mg/kg). Les activités anti-Xa maximales après administration intraduodénale, intrajéjunale et intrailéale furent respectivement de 0.19 ± 0.03 UI/mL, 0.50 ± 0.03 UI/mL et 0.29 ± 0.06 UI/mL obtenues après 0.33±0.08 heures, 0.5±0.00 heures et 0.67±0.17 heures. De plus, cette étude confirme les changements transitoires et réversibles de perméabilité de l'épithélium intestinal induits par le LabrasolTM. Pour cela, 200 UI/kg d'HBPM sont administrées 0, 0.5 et 1 heure après administration intrajéjunale de 50 mg/kg de LabrasolTM. Seule une administration concomitante de LabrasolTM et d'HBPM permet d'obtenir une

absorption de l'HBPM ($C_{\max} = 0.50$ UI/mL ; $T_{\max} = 0.5$ heure). Enfin, l'administration de doses plus importantes de LabrasolTM (100 et 200 mg/kg) conduit à des valeurs plus faibles de l'activité anti-Xa (respectivement $C_{\max} = 0.35 \pm 0.04$ UI/mL ; $C_{\max} = 0.19 \pm 0.07$ UI/mL et $T_{\max} = 0.67 \pm 0.17$ h ; $T_{\max} = 0.75 \pm 0.25$ h). Ces résultats peuvent être expliqués par une diminution du gradient de concentration à travers la membrane intestinale, qui agit sur la diffusion passive des principes actifs hydrophiles et de haute masse moléculaire.

3.3.9 Labrasol[®] et SMEDDS.

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

L'équipe de Ito [153] a testé l'application de ce système à une HBPM en suspendant 25 mg d'HBPM à 0,5 mL de Labrasol et à 150 mg de SylysiaTM 320 (dioxyde de silicone poreux), 100 mg de FloriteTM RE (silicate de calcium poreux) ou à 250 mg de NeusilinTM US₂ (aluminometasilicates de magnésium).

Les microparticules composées de SylysiaTM 320 possèdent les diamètres les plus petits (3,2 μ m) mais aussi les taux de libération d'HBPM les plus importants. Les taux de dissolution *in vitro* diminuèrent avec l'augmentation de la taille des particules du fait d'un contact moins important avec le milieu de dissolution. Le système composé de FloriteTM RE démontra la plus grande biodisponibilité (18,8 %) après administration intrajéjunale de 200 UI/kg de préparation solide chez le rat. Toutefois, les activités anti-Xa obtenues avec ces trois systèmes furent toutes maintenues au-delà de 0,2 UI/mL durant 1 heure chez le rat et durant 3,7 heures chez le chien, respectivement après administrations intrajéjunale et orale de 200 UI/kg de préparations solides.

3.3.10 Thiomères.

Les thiomères sont des adjuvants polymériques thiolés qui permettent l'augmentation du transport des molécules hydrophiles à travers la barrière intestinale. Leur mécanisme semble être du aux groupements thiols du polymère impliqués dans le processus d'ouverture des jonctions serrées [154]. De plus, ce système de délivrance génère une libération précoce et rapide du principe actif liée à son temps de séjour prolongé au niveau des tissus muqueux de l'estomac. De ce fait, la concentration importante du principe actif au niveau de son site d'action crée un gradient de concentration local favorable à son passage paracellulaire et à son absorption non retardée et/ou altérée par les variations de temps du transit gastrique.

L'équipe de Kast [155] a étudié un système de délivrance d'HBPM constitué de polycarbophile thiolé et de glutathion. L'amélioration de l'absorption orale de l'HBPM se révéla importante par comparaison à un mélange mettant en jeu la même HBPM et du polycarbophile non modifié.

Partant de ces résultats, Schmitz et ses collaborateurs [156] ont évalué le transport gastrique de deux HBPM mélangées avec du glutathion réduit (GSH) et un conjugué de cystéine et de polycarbophile (PCP-Cys). Ce système Thiomère/GSH fut comparé à un système remplaçant le conjugué PCP-Cys par de l'hydroxyéthylcellulose (HEC/GSH). L'HEC, n'étant pas mucoadhésive, fut choisie afin d'évaluer l'impact de la mucoadhésivité apportée par le système PCP-Cys sur la biodisponibilité des HBPM. Contrairement aux études *in vitro* qui n'ont pas montré de différences significatives entre les deux systèmes, les études *in vivo* menées chez le rat ont permis d'obtenir des concentrations plasmatiques plus importantes avec le système PCP-Cys. Les $C_{\max}$ respectives étaient de 0.90 ± 0.1 UI/mL et 0.28 ± 0.3 UI/mL correspondant à des $T_{\max}$ de 2 et 4 heures et les valeurs de biodisponibilités relatives furent respectivement de 19.1 et 8.1 % après administration orale de l'HBPM de 3kDa (279 UI). Quant à l'HBPM de 6kDa (300 UI), les $C_{\max}$ respectives étaient de 0.66 ± 0.1 UI/mL et 0.19 ± 0.1 UI/mL correspondant à des $T_{\max}$ de 6 et 1 heures pour des valeurs de biodisponibilités relatives respectivement de 10.7 et 2.1 %. Cette augmentation de biodisponibilité semble être en partie expliquée par la formation de liaisons disulfides entre les groupements thiols libres du polymère et la muqueuse stomacale. Ces liaisons covalentes permettent alors une rétention prolongée du système thiomère au niveau de l'estomac. Les propriétés mucoadhésives pourraient également apporter une

explication à l'augmentation des biodisponibilités. Cependant, en considérant le T_{max} des différents systèmes, le délai d'action, quant à lui, ne semble pas être influencé par les propriétés de mucoadhésion. Enfin, les différences observées entre les deux HBPM sont liées au fait que l'action anticoagulante et la clairance des HBPM sont influencées par la longueur de leur chaînes, les HBPM possédant les chaînes les plus longues étant plus rapidement éliminées de la circulation sanguine.

3.3.11 Dendrons polycationiques à noyau lipophile.

L'équipe de Hayes [157] a évalué des dendrons à noyau lipophile comme promoteurs d'absorption orale d'HBPM. Les dendrimères et les dendrons (dendrimères partiels) ont été le sujet d'intensives recherches depuis leurs premières préparations par les équipes de Tomalia et Newkome dans les années 80 [158, 159]. Les applications les plus prometteuses de ces molécules se situent dans le domaine du transport des médicaments et des gènes mais également dans celui de vaccins expérimentaux.

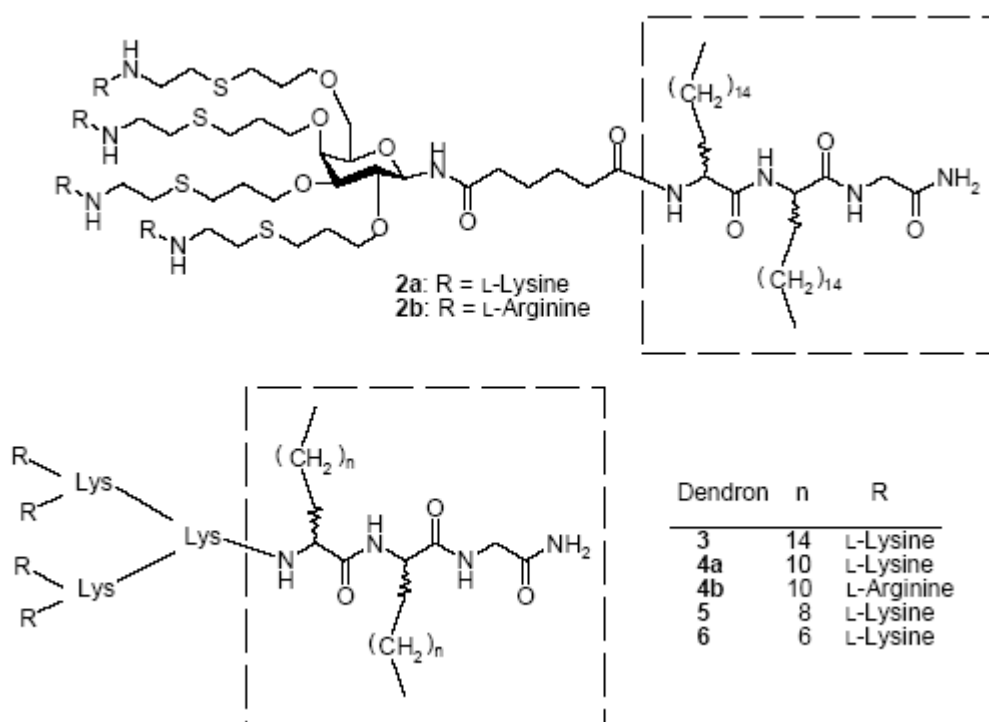


Figure 21 : Dendrons polycationiques à noyau lipophile (2-6).

Le noyau lipophile est encadré par des pointillés ; Lys = L-Lysine (Hayes et al., 2006 [157]).

Les noyaux lipophiles, qui contiennent des acides aminolipoïques (LAAs), ont été incorporés au sein de promoteurs de pénétration membranaire et de principes actifs faiblement absorbés afin d'augmenter leur perméabilité membranaire et de réduire leur dégradation enzymatique.

La capacité des dendrons polycationiques à noyau lipophile à promouvoir l'absorption orale des HBPM a été évaluée *in vivo* chez le rat. Une dose de 7500 UI/kg d'HBPM a été administrée par gavage, seule ou mélangée au promoteur d'absorption (rapport dendron/HBPM = 7), sous forme de suspensions.

Une première étude d'activités anti-Xa portant sur l'influence du branchement ainsi que du groupe cationique terminal par rapport à l'efficacité des promoteurs d'absorption, a permis de montrer une plus grande activité anti-Xa ($C_{\max} = 0.13 \pm 0.02$ UI/mL) de l'HBPM lorsqu'elle est co-administrée avec des dendrons possédant des lysines terminales (promoteur 4a).

De plus, une étude portant sur l'influence de la longueur de la chaîne alkyle des LAAs par rapport à l'efficacité des promoteurs a également été menée. Cette étude a révélé la plus grande efficacité, en terme d'activité anti-Xa de l'HBPM, lorsque celle-ci fut co-administrée avec des promoteurs dont les chaînes LAAs étaient longues de 14 et 8 atomes de carbone (respectivement $C_{\max} = 0.19 \pm 0.02$ UI/mL et $C_{\max} = 0.24 \pm 0.11$ UI/mL pour des $T_{\max}$ respectifs de 15 et 30 minutes). Cependant, bien que les variations portées sur le noyau lipophile aient du avoir une influence sur l'efficacité des promoteurs, il n'y a pas eu de corrélation apparente entre la longueur des chaînes alkyles des LAAs et l'efficacité des promoteurs.

La plus haute valeur de $C_{\max}$ (0.24 ± 0.11 UI/mL) atteinte après administration concomitante du composé 5 et de l'HBPM était significativement plus importante de 3 à 4 fois celle du contrôle ($C_{\max} = 0.07 \pm 0.01$ IU/mL). Cependant, cette concentration fut maintenue au-delà de 0.2 UI/mL seulement durant 20 minutes.

Enfin, le mécanisme précis par lequel les dendrons polycationiques à noyau lipophile parviennent à augmenter l'absorption des HBPM reste encore inconnu. Ces composés ont été conçus pour agir comme promoteurs de pénétration membranaire en formant des paires d'ions avec les HBPM polyanioniques. De plus, les dendrons testés dans cette étude sont des molécules amphiphiles qui possèdent très probablement des propriétés tensio-actives, permettant peut-être leur agrégation sous forme de vésicules supramoléculaires. Ainsi, les dendrons pourraient agir comme surfactant et améliorer l'absorption digestive des principes actifs en perturbant les membranes lipoprotéiques.

Enfin, ces composés, comparés au SNAC ou au SNAD, sont environ 10 fois moins efficaces pour la délivrance des HBPM.

3.3.12 Nano- et microparticules de polymères.

Les systèmes de délivrance des principes actifs utilisant des polymères, très largement développés, fournissent une alternative intéressante pour une libération prolongée d'agents thérapeutiques. Ces systèmes offrent de nombreux avantages tels que la protection des substances médicamenteuses ou encore leur libération prolongée et soutenue permettant ainsi d'éviter leur administration répétée et pouvant être réalisée de façon spécifique au niveau du site d'action.

L'encapsulation permet la protection de macromolécules sensibles telles que peptides et protéines des effets du pH et des enzymes après administration par voie orale. Les nanoparticules, vecteurs polymériques colloïdaux, peuvent être de ce fait des systèmes prometteurs de délivrance des substances actives par voie orale d'autant plus qu'elles possèdent la capacité de traverser la barrière gastro-intestinale par voie intracellulaire, paracellulaire ou via les cellules M et les plaques de Peyer et qu'elles sont stables au sein du tractus digestif.

Jiao et ses collaborateurs [160] ont ainsi appliqué le concept des nanoparticules à l'héparine. Les nanoparticules d'héparine furent préparées selon la technique d'émulsion multiple décrite par Lamprecht [161] et constituées à base de polymères biodégradables (poly(ϵ -caprolactone) (PCL) et poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)) et de polymères polyméthacryliques non biodégradables chargés positivement (Eudragit® RS (RS) et Eudragit® RL (RL)) utilisés seul ou en combinaison. Les formulations composées de RL/PCL, de RS/PLGA et de RS/RL/PLGA, permettant un niveau convenable d'encapsulation (respectivement $53 \pm 2 \%$, $36 \pm 2 \%$ et $38 \pm 2 \%$) associé aux libérations les plus importantes d'héparine lors de l'étude de dissolution *in vitro*, ont été choisies pour l'étude *in vivo*. Après administration orale de 2000 UI d'héparine chez le lapin et mesure des activités anti-Xa, les concentrations maximales relevées étaient respectivement de 0.16 ± 0.01 UI/mL, 0.13 ± 0.06 UI/mL et 0.12 ± 0.05 IU/mL correspondant à des $T_{\max}$ respectifs de 7, 7 et 3 heures. Les activités anti-Xa furent détectables de 7 à 10 heures après administration orale de chaque formulation. La meilleure biodisponibilité absolue fut obtenue avec les nanoparticules de RL/PCL ($22.73 \pm 5.46 \%$).

Cette même équipe a poursuivi ses études en réalisant des microparticules d'héparine [162] à base de polymères biodégradables (PCL et PLGA) et non biodégradables polycationiques (RS et RL) par la technique d'émulsion multiple (eau dans huile dans eau)/évaporation. Dans cette étude, il a été ajouté de la gélatine dans la phase aqueuse interne afin d'augmenter l'incorporation de l'héparine au sein des microparticules. Les taux d'encapsulation ont ainsi varié de 20 à 80 %, les taux les plus importants ayant été obtenus lorsque les Eudragit® et/ou la gélatine furent inclus dans la composition des microparticules.

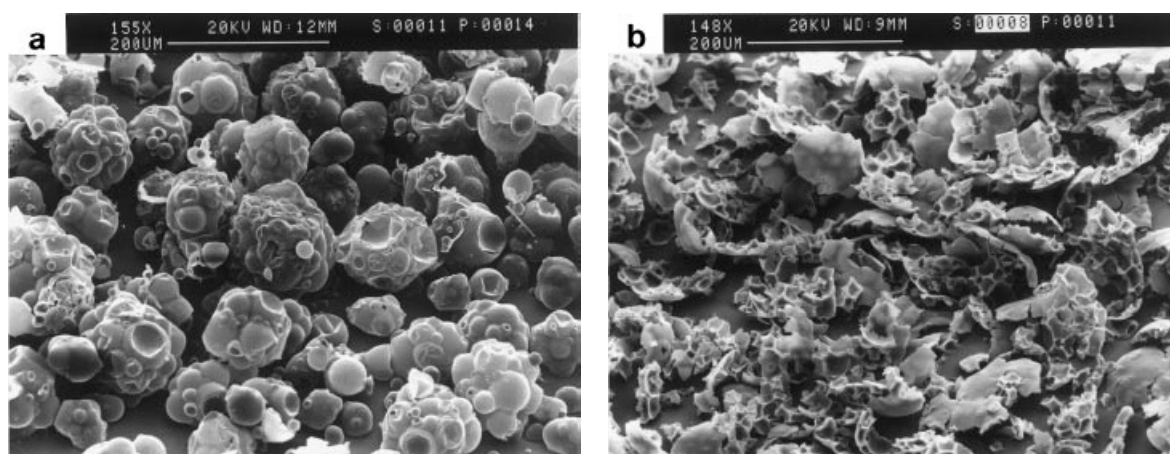


Figure 22 : Photographies de microparticules d'héparine par microscopie.

Microparticules préparées à partir d'un mélange Eudragit® RS/PLGA avant (a) et après (b) libération de l'héparine dans un tampon phosphate à 37°C et à pH 7,4 pendant 24 heures (Jiao et al. (b), 2002 [162]).

Après administration orale d'une dose de 2000 UI d'héparine sous forme de microparticules à des lapins, les temps de coagulation moyens déterminés par l'aPTT ont été évalués. Le temps de coagulation normal chez les lapins est compris entre 13 à 15 secondes. Les formulations contenant de la gélatine ont vu une légère augmentation de leur aPTT (15 à 17 secondes) 3 à 5 heures après leur administration orale. Les microparticules composées RS/PLGA et RS/RL/PLGA ont démontré une activité anticoagulante significative avec des valeurs maximales d'aPTT comprises entre 25 et 32 secondes, 5 à 8 heures après administration orale. Ce délai plus long d'activité par rapport aux microparticules contenant de la gélatine peut être expliqué par une libération plus lente de l'héparine, évitant ainsi sa libération trop rapide au niveau de l'estomac et sa dénaturation. Bien que les valeurs de l'aPTT des microparticules de RS/PLGA et RS/RL/PLGA fussent initialement plus importantes que celles contenant

de la gélatine, l'activité anticoagulante fut maintenue que pendant 4 heures. Enfin, après calcul des aires sous courbe du temps de coagulation en fonction du temps compris entre 0 et 24 heures, les biodisponibilités absolues furent respectivement de $42.5 \pm 1.5 \%$ pour les microparticules de RS/RL/PLGA, de $48.3 \pm 4.4 \%$ pour celles de RS/PLGA et allant de $4.7 \pm 0.2\%$ à $13.1 \pm 0.4 \%$ pour les microparticules contenant de la gélatine.

Ces travaux ont été poursuivis par cette équipe à travers l'étude de Hoffart [163] portant sur des nanoparticules d'une HBPM, la tinzaparine, préparées à partir d'un mélange 50/50 de PCL et de RS. Les valeurs du taux d'encapsulation, de la taille des particules et du potentiel zêta furent respectivement $31.03 \pm 2.3 \%$, $408 \pm 16 \text{ nm}$ et $-26.8 \pm 1.2 \text{ mV}$. Les études *in vivo* ont été à nouveau menées chez le lapin pour des doses de 200 UI/kg et de 600 UI/kg de tinzaparine. L'activité anti-Xa la plus importante ($C_{\max} = 1.68 \pm 0.14 \text{ U anti-Xa/mL}$) fut observée 5 heures après administration orale des nanoparticules à 600 UI/kg. Une activité plus faible fut observée pour les nanoparticules à 200 UI/kg ($C_{\max} = 1.01 \pm 0.57 \text{ U anti-Xa/mL}$; $T_{\max} = 5 \text{ heures}$). En terme de biodisponibilité absolue, aucune différence significative n'a pu être observée démontrant ainsi l'absence d'effet de la dose entre les nanoparticules de tinzaparine à 200 UI/kg et à 600 UI/kg ($51.3 \pm 7.9 \%$ pour une dose de 200 UI/kg de tinzaparine ; $59 \pm 4.5 \%$ pour une dose de 600 UI/kg de tinzaparine).

Tableau 6 : Etudes réalisées sur l'administration orale d'héparines.

Auteurs	Système	Héparine	Etude	Modèle	Dose Héparine	Quantité de système	Résultats	Mécanisme supposé	Toxicité
Cho SY 2002	Quillaja saponin	Disaccharide	Culture cellulaire	Caco-2	-	0,05 %	$P_{app} = 33,5 \cdot 10^{-6}$ cm/sec	Déstabilisation membranaire	Très importante
	Dipotassium glycyrrhizinate					2,00 %	$P_{app} = 2,02 \cdot 10^{-6}$ cm/sec	Activation protéine kinase C	Nulle
	Acide 18 β -glycyrrhétinique					2,00 %	$P_{app} = 5,61 \cdot 10^{-6}$ cm/sec		Faible
	Sodium caprate					0,20 %	$P_{app} = 0,53 \cdot 10^{-6}$ cm/sec		Nulle
	Taurine					2,00 %	$P_{app} = 19,1 \cdot 10^{-6}$ cm/sec	Modulation de transport du Ca^{2+}	Très faible
Motlekar NA 2006	Acide 18 β -glycyrrhétinique	Ardeparine	Culture cellulaire	Caco-2	0,045 Ci	0,02 %	$P_{app} = 20,4 \cdot 10^{-7}$ cm/sec	1) Effet tensio-actif 2) Ouverture des jonctions serrées 3) Elargissement des canaux à eau	Faible
			<i>Ex vivo</i>	Rats	2400 U anti-Xa/kg	50 g	Absorption duodénale augmentée		-
			<i>In vivo</i> Per os	Rats	1 200 U anti-Xa/kg	50 g/kg	$C_{max} = 0,28$ U anti-Xa/ml $T_{max} = 2$ h $F_{abs} = 4,01$ % $F_{rel/SC} = 13,3$ % DAT = 8h		Non observée
Rama Prasad YV 2004	Labrasol®	Parnaparine	<i>In vivo</i> Intrajénunal	Rats	200 U anti-Xa/kg	50 g/kg	$C_{max} = 0,50$ U anti-Xa/ml $T_{max} = 30$ min DAT = 4h	Transport actif	Non Observée

Mori S 2004	Labrasol®	Parnaparine	<i>In vivo</i> Intraduodéal	Rats	20 mg/kg soit 1708 U anti-Xa/kg	30 mg/kg	$C_{\max} = 0,32$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 15$ min $F_{\text{rel/SC}} = 1,51$ % DAT = 2h	1) Ouverture des jonctions serrées 2) Perturbation de la fluidité membranaire	Faible
	Gelucire® 44/14						$C_{\max} = 0,11$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 40$ min $F_{\text{rel/SC}} = 0,35$ % DAT = 2h		Faible
	Acides gras saturés (C6 à C16)						$C_{\max} = 0,04$ - $1,45$ U anti- Xa/ml $T_{\max} = 15$ - 50 min $F_{\text{rel/SC}} = 0.25$ - 8.74 % DAT = 2h		-
Motlekar NA 2005	Caprate de sodium	Ardeparine	Culture cellulaire	Caco-2	$0,045 \mu\text{Ci}$	$2,5$ mg/ml	$P_{\text{app}} = 20,8 \cdot 10^{-7}$ cm/s	Ouverture des jonctions serrées	Non observée
			<i>Ex vivo</i>	Rats	NR	NR	(Duodenum) (Colon) $6 \cdot 10^{-7}$ cm/s < P_{app} < $9 \cdot 10^{-7}$ cm/s		
			<i>In vivo</i> Per os	Rats	$2\ 400$ U anti-Xa/kg	100 mg/kg	$C_{\max} = 0,36$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 30$ min $F_{\text{rel}} = 30,3$ % $F_{\text{abs}} = 9,2$ %		
Gravobac V 2006	Bromelaïne	HBPM	Culture cellulaire	Caco-2	10 U anti- Xa/ml	14 mg	$P_{\text{app}} = 4,5 \cdot 10^{-5}$ cm/sec	1) Mucolytique 2) Ouverture des jonctions serrées	faible
			<i>Ex vivo</i>	Rats	10 U anti- Xa/ml	7 mg	$P_{\text{app}} = 1,7 \cdot 10^{-5}$ cm/sec		

Gravobac V 2007	Papaïne	HBPM	In vivo Per os	Rats	210 U anti-Xa	9,7 mg	$C_{\max} = 0,35$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 2$ h $F_{\text{rel}} = 9,1$ %	Voie paracellulaire	NR
Thanou M 2001	Carbopol® 934P	Opocrine	In vivo Intraduodénal	Rats	10 800 U anti-Xa/kg	10 mg.kg	$C_{\max} = 0,35$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 5$ h ER = 10,5 DAT = 7h	Mucoadhésion et/ou modification des jonctions serrées	NR
				Cochons	5 000 U anti-Xa/kg	10 mg/kg	$C_{\max} = 0,25$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 2$ h ER = 2,8 DAT = 6h		
Hayes PY 2006	Dendrons	HBPM	In vivo Per os	Rats	7 500 U anti-Xa/kg	7 mol equiv	$C_{\max} = 0,24$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 30$ min ER = 3,4 DAT = 20min	Formation de complexes lipophiles et/ou Effet tensio-actif	NR
Motlekar NA 2006	L-Arginine	Ardeparine	Culture cellulaire	Caco-2	0,045 μ Ci	20 mg/ml	$P_{\text{app}} = 8,5 \cdot 10^{-7}$ cm/s	Ouverture des jonctions serrées médiée par le monoxyde d'azote.	Culture cellulaire : Cytotoxicité à des concentrations > 70 mg/ml <i>In vivo</i> : Non observée
			In vitro Chambre de Ussing	Rats	2 400 U anti-Xa/kg	250 mg/kg	(Duodenum) (Colon) $6 \cdot 10^{-7}$ cm/s < $P_{\text{app}} < 11 \cdot 10^{-7}$ cm/s		
			In vivo Per os	Rats	1 200 U anti-Xa/kg	250 mg/kg	$C_{\max} = 0,26$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 1$ h30 $F_{\text{abs}} = 4,1$ % $F_{\text{rel}} = 13,7$ %		
Motlekar NA 2006	Peptide AT1002	Ardeparine	Culture cellulaire	Caco-2	0,045 μ Ci	0,25 mg/ml	$P_{\text{app}} = 5,7 \cdot 10^{-7}$ cm/s	Ouverture réversible des jonctions serrées	Non observée

			<i>In vitro</i> Chambre de Ussing	Rats	1 200 U anti-Xa/kg	100 µg/kg	(Duodenum) (Ileum) $3.10^{-7} \text{ cm/s} < P_{\text{app}} < 7.10^{-7} \text{ cm/s}$		
			<i>In vivo</i> Per os	Rats	1 200 U anti-Xa/kg	100 µg/kg	$C_{\text{max}} = 0,47 \text{ U anti-Xa/ml}$ $T_{\text{max}} = 5\text{h}$ $F_{\text{abs}} = 6,1 \%$ $F_{\text{rel}} = 20,5 \%$		
Kast CE 2003	Thiomère	HBPM	<i>In vitro</i> Chambre de Ussing	Cochon d'Inde	5 mg/ml soit 465 U anti-Xa/ml	5 mg/ml	$P_{\text{app}} = 3,9.10^{-7} \text{ cm/s}$		
			<i>In vivo</i> Per os	Rats	797 U anti- Xa/kg	20 mg/kg	$C_{\text{max}} = 0,40 \text{ U anti-Xa/ml}$ $T_{\text{max}} = 12\text{h}$ $F_{\text{abs}} = 19,9 \%$	Mucoadhésion	NR
Schmitz T 2005	Thiomère	HBPM	<i>In vivo</i> Per os	Rats	279 U anti- Xa	36 mg/kg	$C_{\text{max}} = 0,90 \text{ U anti-Xa/ml}$ $T_{\text{max}} = 2\text{h}$ $F_{\text{rel}} = 19,1 \%$		
Thanou M 2000	LMCC	Opocrine	Culture cellulaire	Caco-2	10 mg/ml	30 mg/ml	$P_{\text{app}} = 200.10^{-11} \text{ cm/s}$		
			<i>In vivo</i> Intraduodéal	Rats	7 200 U anti-Xa/kg	30 mg/ml	$C_{\text{max}} = 0,38 \text{ U anti-Xa/ml}$ $T_{\text{max}} = 5\text{h}$ $ER = 7,0$	Voie paracellulaire Ouverture des jonctions serrées	NR
Thanou M 2007	SNOCC	Réviparine	Culture cellulaire	Caco-2	10 mg/ml	30 mg/ml	$P_{\text{app}} = 630.10^{-11} \text{ cm/s}$		NR

			<i>In vivo</i> Intraduodéal	Rats	5 000 U anti-Xa/kg	30 mg/ml	$C_{\max} = 0,40$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 5$ h ER = 18,5		
Lee YK 2000	Conjugué DOCA- HNF	HNF	<i>In vivo</i> Intragastrique	Rats	200 mg de conjugué/kg soit 20 000 U anti- Xa/kg		$TCA_{\max} = 7$ x/contrôle $C_{\max} = 1,0$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 1$ h	1) Diminution de l'hydrophilie des héparines 2) Interaction des conjugués avec récepteurs des acides biliaires suivie par diffusion simple 3) Interaction des conjugués avec le mucus	Non observée
Lee YK 2001	Conjugué DOCA- HBPM	HBPM (6000 Da)	<i>In vivo</i> Intragastrique	Rat	100 mg de conjugué/kg soit 13 430 U anti- Xa/kg		$C_{\max} = 0,76$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 1$ h $F_{\text{abs}} = 7,8$ %		Non observée
Kim SK 2005	Conjugué DOCA- HBPM + Microémulsion	Nadroparine	<i>In vivo</i> Per os	Souris	4 450 U anti-Xa/kg	50 mg/kg	$C_{\max} = 0,69$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 20$ min $F_{\text{abs}} = 1,5$ % DAT = 50min		Non observée
				Singes	8 900 U anti-Xa/kg	100 mg/kg	$C_{\max} = 0,43$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 3$ h DAT = 6h		NR
LeeYK 2006	Conjugué DOCA- HBPM + Acides biliaires	HBPM	<i>In vivo</i> Per os	Rats	12 680 U anti-Xa/kg	100 mg/kg	$C_{\max} = 0,76$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 1$ h		Non observée
				Souris	12 680 U anti-Xa/kg	100 mg/kg	Sans acides biliaires : $C_{\max} = 0,15$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 15$ min Avec acides biliaires : $C_{\max} = 0,42$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 10$ min		
				Singes	25 360 U anti-Xa/kg	200 mg/kg	En absence de DOCA libre : $C_{\max} = 0,32$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 30$ min $F_{\text{abs}} = 1,7$ %		

							En présence de DOCA libre : $C_{\max} = 0,70$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 2$ h		
Kim SK 2006	Conjugué DOCA- HBPM + DMSO	Nadroparine	<i>In vivo</i> Per os	Souris	860 U anti- Xa/kg	10 mg/kg	$C_{\max} = 0,75$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 20$ min $F_{\text{abs}} = 17,6$ %		Non observée
Kim SK 2007	Conjugué DOCA- HBPM + DMSO	Nadroparine	Culture cellulaire	Caco-2	0,1 mg/ml		$P_{\text{app}} = 45,6 \cdot 10^{-7}$ cm/s		NR
			<i>In vivo</i> Per os	Singes	860 U anti- Xa/kg	10 mg/kg	$C_{\max} = 0,49$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 4$ h $F_{\text{abs}} = 9,2$ %		NR
Lee DY 2007	DCEA + Propylène glycol	Ardeparine	<i>In vivo</i> Per os	Rats	25 mg/kg		$C_{\max} = 0,44$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 43$ min $F_{\text{abs}} = 3,23$ %		Non observée
Jiao Y 2002	Nanoparticules ERL/PCL	HNF	<i>In vivo</i> Per os	Lapins	600 U anti- Xa/kg	50 mg/kg	$C_{\max} = 0,16$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 6-8$ h $F_{\text{abs}} = 22,73$ % DAT = 24h	Voie paracellulaire, voie intracellulaire, capture par les plaques de Peyer et/ou mucoadhésion	NR
Jiao Y 2002	Microparticules ERS/PLGA	HNF	<i>In vivo</i> Per os	Lapins	600 U anti- Xa/kg	50 mg/kg	$TCA_{\max} = 22-32$ s $T_{\max} = 5-8$ h $F_{\text{abs}} = 48,3$ %	NR	NR
Hoffart V 2006	Nanoparticules PCL/RS	Tinzaparine	<i>In vivo</i> Per os	Lapins	600 U anti- Xa/kg	100 mg/kg	$C_{\max} = 1,8$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 5$ h $F_{\text{abs}} = 51,3$ % DAT = 8h	Propriétés mucoadhésives de l'Eudragit® RS	NR

Lamprecht A 2007	Microparticules Gomme arabique/gélatine	Tinzaparine	<i>In vivo</i> Per os	Lapin	600 U anti- Xa/kg	NR	$C_{\max} = 0,17$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 2$ h $F_{\text{rel}} = 4,2$ %	Protection contre pH et enzyme	NR
Rivera TM 1997	SNAC	HNF	<i>In vivo</i> Per os	Rats	16 564 UI/kg	300 mg/kg	$aPTT_{\max} = 102$ s $T_{\max} = 30$ min DAT = 1,5	1) Transport transcellulaire par augmentation de la lipophilie des héparines 2) Transport facilité ?	Aucun effet observable à 28j
				Singes	4 971 UI/kg	150 mg/kg	$aPTT_{\max} = 200$ s $T_{\max} = 2$ h $C_{\max} = 1,2$ IU/ml $T_{\max} = 1$ h30 DAT = 4h		Aucun effet observable à 28j
Gonze MD 1998	SNAC	HNF	<i>In vivo</i> Per os	Rats	300 UI/kg	300 mg/kg	Diminution : -incidence du thrombus de 72 % -masse du thrombus de 86 %		NR
Gonze MD 2000	SNAC	HNF	<i>In vivo</i> Per os	Rats	30 mg/kg 2x/j	300 mg/kg 2x/j	Diminution à 7 jours : -incidence de TVP de 90 % -masse du clou de 95% $C_{\max} = 1,2$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 45$ min		NR
Welt FG 2001	SNAC	HNF	<i>In vivo</i> Per os	Lapins	90-180 mg/kg	150 mg/kg	Diminution de la croissance néointimale		NR

Malkov D 2002	SNAC	HNF	Culture cellulaire	Caco-2	5 mg/ml	33 mM	-Transport transcellulaire -Transport paracellulaire pour des doses de SNAC >100 mM		Toxicité faible pour dose de SNAC >100 mM
Sarlatash K 1999	SNAD	Enoxaparine	<i>In vivo</i> Per os	Rats	1 500 U anti-Xa/kg	300 mg/kg	-Incidence de TVP : 0 % -Diminution de la masse du thrombus de 90 % -C _{max} = 1,0 U anti-Xa/ml -T _{max} = 30min	Interaction non covalente puis dissociation du complexe dans la circulation sanguine.	NR
Sarlatash K 2000	SNAD	Enoxaparine	<i>In vivo</i> Intragastrique	Porcs	2 000 U anti-Xa/kg	50 mg/kg	-Diminution de la masse du thrombus de 60 % -C _{max} = 0,2 U anti-Xa/ml -T _{max} = 1,5 h		NR
Baughman RA 1998	SNAC	HNF	Essai clinique		30 000 UI/kg	10,5 g/kg	-C _{max} = 0,2 U anti-Xa/ml -C _{max} = 0,22 U anti-IIa/ml -T _{max} = 1h -Augmentation du TFPI (3,4 x)	NR	Nausée, vomissement (non observés si système administré dans sirop)
					150 000 UI/kg	2,25 g/kg	-Augmentation de l'aPTT (1,75 x) -C _{max} = 0,21 U anti-Xa/ml -T _{max} = 0,5h		
Berkowitz SD 2003	SNAC	HNF	Essai clinique Phase 1		90 000 UI	2,25 g	Adulte (J1) : - C _{max} = 0,29 U anti-Xa/ml - T _{max} = 30min Adulte (J6) : - C _{max} = 0,14 U anti-Xa/ml - T _{max} = 30 min	NR	NR

						Patient âgé (J1) : - $C_{\max} = 0,37$ U anti-Xa/ml - $T_{\max} = 1$ h Patient âgé (J6) : - $C_{\max} = 0,19$ U anti-Xa/ml - $T_{\max} = 30$ min		
			Essai clinique Phase 2	60 000 UI 90 000 UI	1,5 g 2,25 g	Pas de différence par rapport à HNF par voie sous-cutanée en terme de : - incidence de saignement - incidence de VTE - nombre de transfusion - diminution de l'Hb		
Mousa SA 2007	SNAC	HNF	Essai clinique	75 000 UI	500 mg	$C_{\max} = 0,55$ U anti-Xa/ml $T_{\max} = 40$ min $F = 2,2$ % $C_{\max} = 0,49$ U anti-IIa/ml $T_{\max} = 40$ min $F = 1,3$ %	Passage passif par voie transcellulaire.	Effets indésirables légers (douleur thoracique, dyspepsie)

Légende :

aPTT	ou TCA (Temps de Céphaline Activée)
$C_{\max}$	Concentration maximale
DAT	Durée d'activité thérapeutique ($C > 0,2$ U anti-Xa/ml)
Fabs	Biodisponibilité absolue (par rapport à la voie intraveineuse)
Frel	Biodisponibilité relative (par rapport à la voie sous cutanée)
Hb	Hémoglobine
P_{app}	Perméabilité apparente
$T_{\max}$	Temps correspondant à $C_{\max}$

4. LES ANTIVITAMINES K.

L'histoire des antivitamines K débuta lors de l'hiver 1921 avec l'apparition d'une mystérieuse maladie touchant le bétail de l'Ontario (Canada) [164]. Les autopsies réalisées sur les animaux victimes de cette affection décrivirent de nombreuses hémorragies. Frank W. Schofield, un pathologiste du collège vétérinaire de l'Ontario, découvrit la présence de mélilot - plante herbacée de la famille des légumineuses utilisée comme plante fourragère - dans l'alimentation de tous les animaux décédés. Schofield montra que cette maladie connue aujourd'hui sous le nom de « maladie du mélilot gâté » faisait suite à la consommation de fourrages de mélilot moisés. En 1931, Arthur F. Schalk et Lee M. Roderick publièrent une note décrivant l'étiologie de la maladie et conclurent que cette affection était la conséquence d'un déficit en prothrombine. Au début des années 30, Henrik Dam, qui étudiait le métabolisme du cholestérol chez le poulet, observa que les poulets soumis à un régime de 2 ou 3 semaines développaient des hémorragies sous-cutanées et que leur sang présentait une coagulabilité augmentée. En 1935, Dam annonça que le facteur responsable de ces hémorragies était une nouvelle vitamine liposoluble qu'il nomma Vitamine K (de l'allemand « Koagulation »). En mars 1939, alors que Dam et Kareer isolèrent la vitamine K de la luzerne (*Medicago sativa*), Doisy et ses collègues isolèrent cette même vitamine K de farines de poissons putréfiés. De 1933 à 1939, Karl Paul Link [165] assisté de ses doctorants (Harold Campbell, Ralph Overman, Charles Huebner, et Mark Stahmann) essayèrent, à partir de foin de mélilot moisi, d'isoler la substance responsable de la maladie du mélilot gâté. En juin 1939, Campbell, qui en 1938 avait adapté la méthode de détermination d'Armand Quick aux lapins, fut le premier à observer sous son microscope quelques cristaux de l'anticoagulant. Huebner en détermina la structure - la 3,3'-méthylènebis, conjugaison de deux molécules de 4-hydroxycoumarine liées par un pont méthylène – et en achévera la synthèse avec Stahmann le 1^{er} Avril 1940. Enfin, Overman et Sullivan, à travers des tests réalisés chez différentes espèces de mammifères montreront que les produits naturel et synthétisé présentent la même activité biologique. En 1939, l'équipe de Link était déjà capable de montrer que la vitamine K pouvait neutraliser l'effet du dicoumarol. Cependant, ce n'est qu'en 1942 que Shepard Shapiro et d'autres

cliniciens soutiendront l'affirmation de Link pour finalement établir un antagonisme entre vitamine K et dicoumarol.

4.1. La vitamine K [166].

La famille des vitamines K regroupe des composés liposolubles, qui ont en commun un noyau 2-méthyl-1,4-naphtoquinone et diffèrent par un radical R en position 3 (figure 23) [167]. La plus connue de ces vitamines K est la vitamine K1, également dénommée phylloquinone (du grec *phyllos*, feuille), phytonadione ou encore phytoménadione (du grec *phytos*, plante) du fait de son rôle de transporteur d'électrons dans le processus de la photosynthèse. Cette vitamine est retrouvée à une forte teneur dans les végétaux, particulièrement dans les légumes verts à feuilles tels que le chou frisé, les épinards ou le brocoli.

La vitamine K2 regroupe les ménaquinones qui possèdent une chaîne aliphatique insaturée avec un nombre variable de groupements isoprényl : d'origine animale, elle est présente dans le lait, le fromage ou le soja fermenté. Ce sont également des ménaquinones que produisent les bactéries intestinales. Enfin, contrairement aux vitamines K1 et K2 d'origine naturelle, la vitamine K3 ou ménadione avec un simple radical hydrogène n'est produite que par synthèse et est considérée comme une provitamine, donnée comme alimentation aux animaux, à partir de laquelle sont synthétisées des ménaquinones. Chez l'homme, la vitamine K1 est principalement retrouvée dans le foie tandis que la vitamine K2 est concentrée préférentiellement dans les artères et au niveau de localisations extrahépatiques [168].

4.2. Les Antivitamines K.

4.2.1. Structure.

Les antivitamines K se divisent en deux classes chimiques, d'une part les dérivés de la 4-hydroxycoumarine (warfarine et acénocoumarol) et d'autre part les dérivés de la indane-1,3-dione (fluindione) (figure 24).

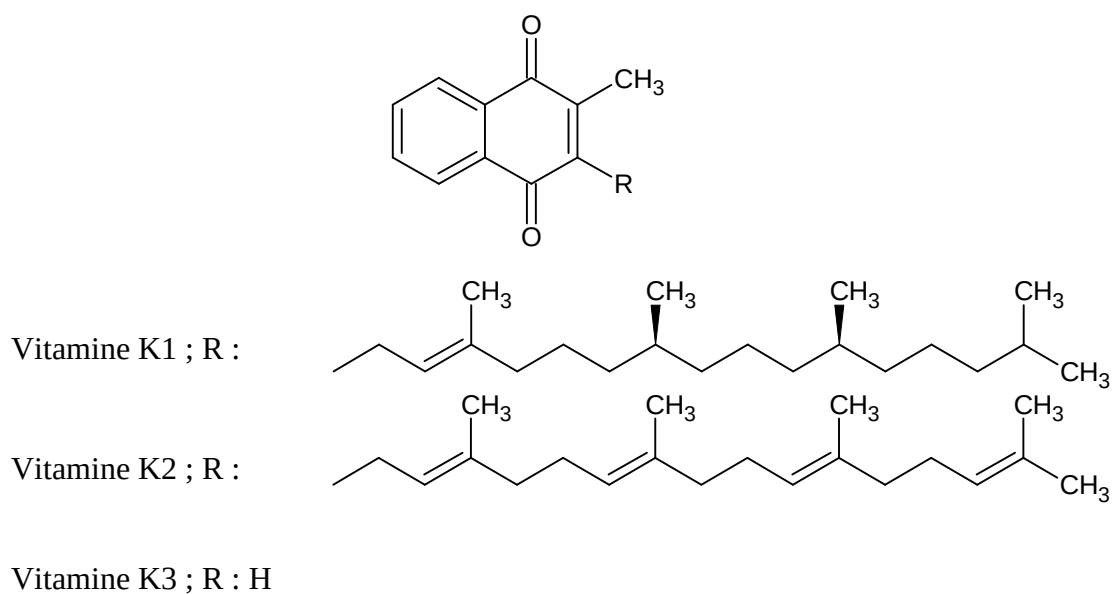
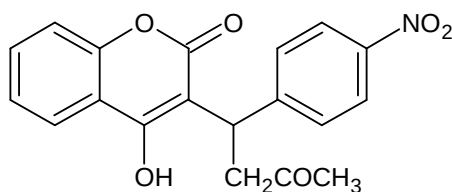
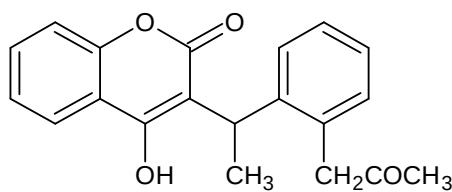


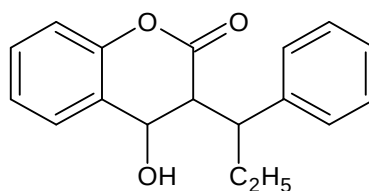
Figure 23 : Différentes formes de la vitamine K.
(d'après Plaza SM et al., 2005 [167]).



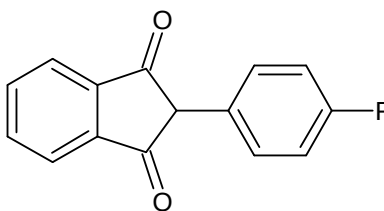
Acénocoumarol ($C_{19}H_{15}O_6$, MW=353.32, mp=196-199°C)



Warfarine ($C_{19}H_{16}O_4$, MW=308.32, mp=98-99°C)



Phenprocoumone ($C_{18}H_{16}O_3$, MW=280.31, mp=179-180°C)



Fluindione ($C_{15}H_9FO_2$, MW=240.24, mp=120°C)

Figure 24 : Antivitamines K disponibles en France.

4.4.2. Pharmacologie et mécanisme d'action [166, 169-171].

Les AVK ont par leur analogie structurale avec la vitamine K un mode d'action identique. En inhibant la vitamine K époxyde réductase, les AVK empêchent la régénération de la forme réduite de la vitamine K (vitamine K hydroquinone) et interfèrent avec la carboxylation des résidus glutamiques des facteurs de la coagulation dépendants de la vitamine K. Il s'en suit un arrêt de la synthèse de facteurs hépatiques de la coagulation dépendants de la vitamine K à savoir la prothrombine ou facteur II, la proconvertine ou facteur VII, le facteur anti-hémophilique B ou facteur IX et le facteur Stuart ou facteur X) mais également un arrêt de la synthèse de protéines anticoagulantes telles que les protéines C, S et Z. Cette inhibition de synthèse des facteurs de la coagulation entraîne l'apparition de facteurs décarboxylés ou partiellement carboxylés appelés précurseurs des facteurs vitamino K dépendants ou PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence) et dont l'activité biologique est diminuée de 10 à 40 %. Ces protéines, privées de résidus carboxyglutamiques chargés négativement, ne peuvent fixer d'ions calcium qui leur confèrent la capacité de s'amarrer aux phospholipides membranaires des plaquettes sanguines et donc d'amorcer le phénomène de coagulation. Il est à noter que cette inhibition ne touche que les facteurs de coagulation récemment synthétisés par le foie et qu'elle ne concerne pas les facteurs de la coagulation déjà présents dans la circulation sanguine. De ce fait, les AVK ont un délai d'action correspondant aux demi-vies de chacun des facteurs de la coagulation circulants : 6 heures pour le facteur VII, 20 heures pour le facteur IX, 40 heures pour le facteur X et 60 à 72 heures pour le facteur II. Ainsi, un délai de 36 à 72 heures sera nécessaire à l'induction d'une hypotherbinémie mais il

faudra attendre près d'une semaine pour obtenir une action complète et stable de ces médicaments. On notera toutefois que la demi-vie de la protéine C est de 8 heures et que l'abaissement rapide de son taux peut, dans un premier temps conduire à une situation à risque thrombotique.

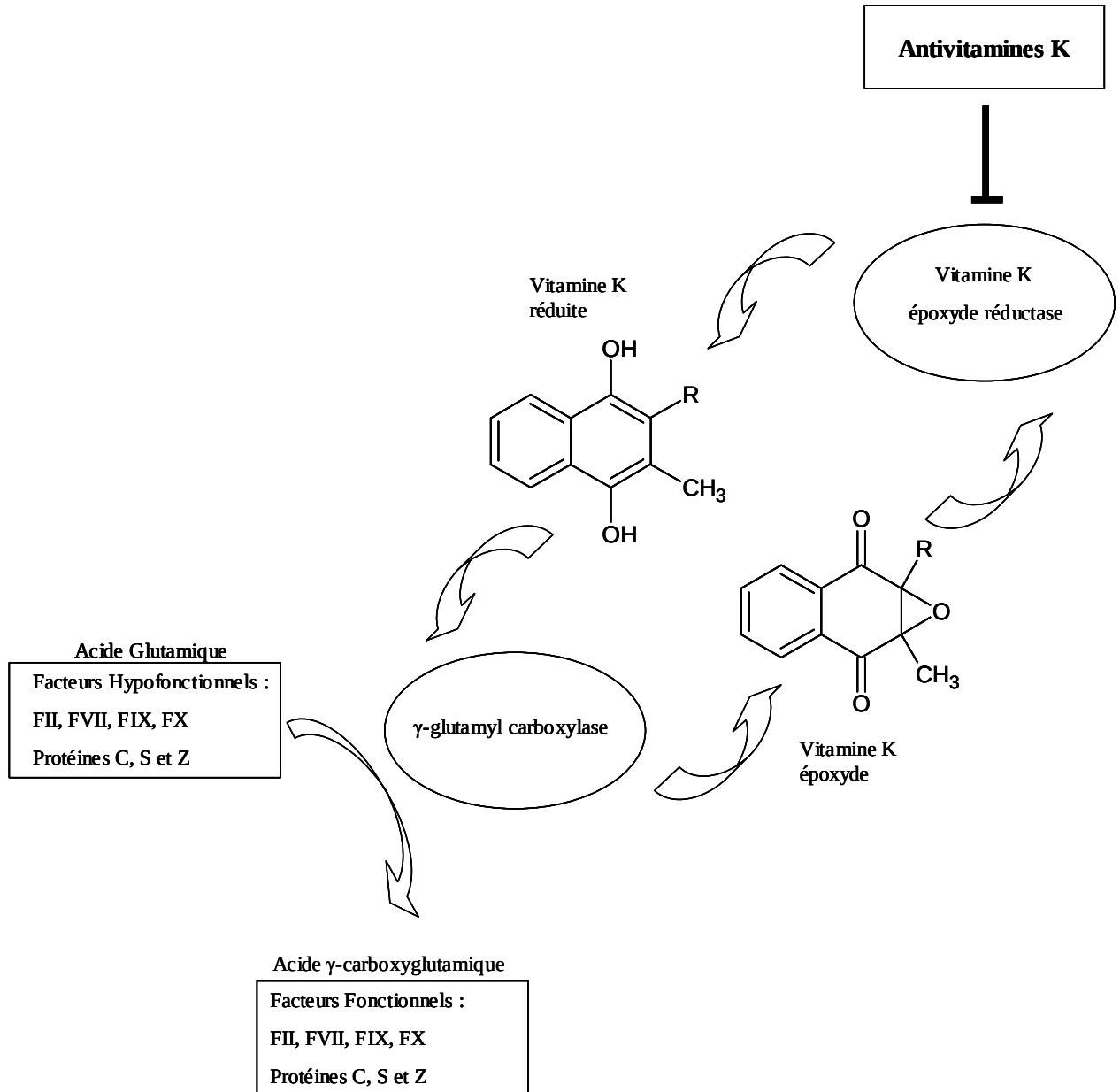


Figure 25 : Mécanisme d'action des antivitamines K.
(d'après D'Andrea et al.) [171].

4.4.3. Pharmacocinétique.

4.4.3.1. Cas général.

Les AVK sont administrés par voie orale. Leur résorption se fait de façon presque intégrale par le tractus intestinal au niveau de l'estomac et du jéjunum en 3 à 6 heures. La concentration maximale dans le plasma est atteinte 2 à 6 heures après l'absorption selon les composés. Les AVK se lient de façon réversible et très importante au niveau du site 1 de l'albumine (70 à 97 %) : la fraction liée représente un réservoir alors que l'activité anticoagulante dépend de la fraction libre. Elle dépend de l'affinité du médicament pour le site récepteur hépatique. Les AVK sont ensuite métabolisés par biotransformation par les mono-oxydases et les conjuguases du réticulum endoplasmique des microsomes hépatiques. Certains de ces dérivés peuvent avoir une activité anticoagulante. L'excrétion se fait soit par la bile sous forme de dérivés inactifs, soit par filtration glomérulaire. Au niveau de l'intestin, ces substances peuvent être réabsorbées par un cycle entéro-hépatique, puis excrétées par les urines. Les AVK traversent la barrière placentaire et peuvent induire des désordres hémorragiques chez le fœtus et des foetopathies. De ce fait, l'utilisation des AVK est contre-indiquée lors de la grossesse. Au cours de l'allaitement, il est possible d'utiliser la warfarine ou l'acénocoumarol qui diffusent de façon négligeable dans le lait maternel. Cependant une supplémentation de l'enfant en vitamine K1 devra être assurée lors d'un allaitement maternel exclusif (2 mg par voie orale par semaine) [172].

4.4.3.2. Cas des dérivés de la 4-hydroxycoumarine [173].

Du fait de la présence d'un centre chiral dans leur structure, les principes actifs de cette famille sont des mélanges racémiques d'énantiomères R et S ; la forme S étant approximativement 2 à 5 fois plus active que la forme R. En clinique, le mélange racémique administré par voie orale se compose de chacune de ces deux formes dans des proportions identiques. Après leur administration orale, ces molécules sont rapidement absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal avec une biodisponibilité proche de 100 % excepté pour la forme S de l'acénocoumarol qui subit un premier passage hépatique important. Ces AVK présentent une forte fixation protéique de l'ordre de 99%, des pics de concentrations plasmatiques atteints en quelques heures et

des volumes de distributions variant de 0,08 L/kg pour la warfarine à 0,22 L/kg pour l'acénocoumarol. Malgré leur ressemblance structurale, ces AVK se différencient au niveau de leur métabolisme et de leur élimination par la mise en jeu de mécanismes de formation des métabolites cytochrome-spécifiques différents. La monohydroxylation cytochrome-dépendante est le principal mécanisme de clairance de ces anticoagulants même si la warfarine et l'acénocoumarol subissent également des phénomènes de réduction. Le cytochrome CYP2C9 est identifié comme l'enzyme majeure dans l'hydroxylation de la warfarine, de la phenprocoumone et de l'acénocoumarol. Sur la base des études *in vitro* et *in vivo*, le cytochrome CYP2C9 se révèle être le principal facteur de la clairance des formes S de la warfarine et de l'acénocoumarol alors qu'il joue un rôle beaucoup moins important dans la clairance des deux énantiomères de la phenprocoumone. La clairance de la phenprocoumone fait suite à son hydroxylation principalement réalisée par le cytochrome CYP3A4 et à une excrétion significative sous forme inchangée ou conjuguée. Contrairement à la phenprocoumone, l'élimination de la warfarine et de l'acénocoumarol se réalise presque complètement par leur métabolisme. Par conséquent, il est important de noter l'effet du polymorphisme du cytochrome CYP2C9 sur les paramètres pharmacocinétiques et la réponse anticoagulante de chacun de ces anticoagulants. D'un point de vue pharmacogénétique, la phenprocoumone semble présenter le profil pharmacologique le plus approprié puisque son métabolisme est moins dépendant du cytochrome CYP2C9. De plus, les interactions médicamenteuses liées à l'induction ou à l'inhibition du cytochrome CYP 2C9 seront également moins prononcées pour la phenprocoumone que pour la warfarine et l'acénocoumarol. Cependant, l'utilisation de la phenprocoumone devra tenir compte des nombreuses interactions médicamenteuses liées au cytochrome CYP3A4.

Tableau 7 : Paramètres pharmacocinétiques des AVK.

(d'après Ufer et al. ; Becquemont et al.) [173, 174].

	Acénocoumarol	Phenprocoumon	Warfarine	Fluindione
Dose journalière moyenne (mg)	4	2-3	6	15
Volume de distribution (L/kg)	0,22-0,52	0,11-0,14	0,08-0,12	NR
Fixation protéique (%)	> 98	> 99	> 99	97
Concentration plasmatique (µmol/L)	0,03-0,3	1,5-15	1,5-8	NR
Demi-vie (h)	S : 1,8 R : 6,6	S : 110-130 R : 110-125	S : 24-33 R : 35-58	31
Clairance plasmatique (L/h)	S : 28,5 R : 1,9	S : 0,045-0,055 R : 0,055-0,08	S : 0,1-1,0 R : 0,07-0,35	NR
Métabolisme de phase I	Hydroxylation Reduction	Hydroxylation	Hydroxylation Reduction	NR
Métabolisme de phase II	NR	Glucuronidation Conjugaison (bile)	Insignifiant	NR
Voie d'élimination	35 % Fèces 65 % Urine	35 % Fèces 65 % Urine + cycle entéro-hépatique	20 % Fèces 80 % Urine	NR
Excrétion sous forme inchangée (%)	< 1 %	40 %	< 5%	< 10%

NR : Non Renseigné.

4.5. Suivi du traitement par AVK [175].

La mesure du temps de prothrombine (PT) ou temps de Quick est la méthode la plus courante pour le suivi du traitement par anticoagulants oraux. Le PT, exprimé en secondes, mesure l'élimination de trois des quatre facteurs de la coagulation vitamine K dépendants à savoir les facteurs II, VII et X. La réalisation du PT consiste à ajouter du calcium et de la thromboplastine à du plasma citraté. La thromboplastine se compose d'une protéine transmembranaire, le facteur tissulaire, et de phospholipides. Elle est généralement extraite des tissus pulmonaire, cérébral ou placentaire, qui contiennent le facteur tissulaire ainsi que les phospholipides nécessaires à l'activation du facteur X par le facteur VII. Les thromboplastines développées les plus récemment font appel à un facteur tissulaire humain recombinant et à des préparations bien définies en phospholipides. L'induction de l'activation du facteur VII par la thromboplastine sera fonction des changements induits par les AVK sur les facteurs de la coagulation. Ainsi, une absence de réaction de la thromboplastine sur le facteur VII sera liée à une diminution des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants et se traduira par un allongement du PT.

La sensibilité des thromboplastines à un déficit en facteurs de la coagulation varie de façon importante avec leur nature tissulaire ou recombinante, du tissu d'origine ou encore de la composition en phospholipides. Cette différence des réponses des thromboplastines fut responsable de variations importantes dans le dosage des AVK utilisés dans de nombreux pays. Ce constat a conduit, en 1977, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à sélectionner une thromboplastine cérébrale humaine pour devenir la première « International Reference Preparation » (IRP) pour les thromboplastines. Cette première IRP fut par la suite remplacée par une « new primary reference thromboplastin » et trois « secondary reference thromboplastins ». Enfin, un système d'étalonnage fut développé, fondé sur l'hypothèse d'une relation linéaire entre le logarithme des PT obtenus avec la thromboplastine de référence et les thromboplastines utilisées pour les tests. Ce modèle, adopté en 1982, standardise le ratio des PT et le convertit en « international normalized ratio » (INR), calculé de la manière suivante :

$$\text{INR} = (\text{Patient PT} / \text{Normal PT})^{\text{ISI}}$$

L'ISI ou International Sensitivity Index mesure la réponse d'une thromboplastine donnée à la réduction des facteurs vitamine K dépendants de la coagulation par rapport à la première IRP de l'OMS. Plus la valeur de l'ISI sera petite, plus la thromboplastine sera réactive.

Au début du traitement par AVK, la dose sera ajustée en fonction de l'INR afin d'atteindre dans la majorité des cas, des valeurs d'INR compris entre 2 et 3 (INR cible à 2,5). Dans les cas de valvulopathies mitrales et dans certains cas où il ya présence de prothèses mécaniques, les valeurs d'INR peuvent être comprises entre 3 et 4,5 (INR cible à 3,7). L'augmentation de l'INR dans la zone thérapeutique devra être confirmée au moins sur 2 jours consécutifs. Ainsi, lors de l'initiation du traitement par AVK, de fréquentes déterminations de l'INR seront nécessaires afin de produire l'anticoagulation thérapeutique souhaitée. Une fois stabilisé, la détermination de l'INR pourra être réalisée toutes les 1 à 3 semaines. Cependant, en présence de facteurs susceptibles de modifier la réponse à l'anticoagulation (i.e. prise concomitante de médicaments), la détermination de l'INR devra être réalisée plus fréquemment afin de minimiser les risques liés à une hypo- ou à une hypercoagulation [176]. Dans tous les cas, un INR supérieur à 5 sera associé à un risque hémorragique.

4.6. Limitations et effets indésirables [176].

4.6.1. Saignement et hémorragies.

Le risque hémorragique représente l'effet indésirable majeur des AVK. Les saignements peuvent survenir au cours d'un traitement par AVK bien contrôlé lors d'actes chirurgicaux ou d'autres formes de traumatisme ou encore au niveau de lésions locales (ulcère peptique ou carcinome). Des saignements spontanés peuvent survenir lorsque la dose d'AVK est trop élevée conduisant à un allongement marqué de l'INR. Il est à noter que ces saignements peuvent être graves et même mettre en jeu le pronostic vital. Cependant, le risque hémorragique peut être considérablement diminué par un ajustement de dose suffisamment fin pour diminuer le risque de saignement tout en maintenant l'action anticoagulante dans des valeurs thérapeutiques. Enfin, ce risque peut être associé à différents facteurs qu'il faudra prendre en compte tels que l'âge (> 65 ans), le sexe (féminin>masculin), des antécédents de saignements gastro-intestinaux, l'alcoolisme, l'insuffisance rénale chronique ou un cancer.

La prise en charge d'un patient présentant un INR élevé dépendra du niveau d'augmentation de l'INR et du contexte clinique. Différentes alternatives peuvent être envisagées telles que l'arrêt momentané du traitement, l'administration de vitamine K, l'administration de plasma frais congelé ou d'un concentré de facteurs de la coagulation (PPSB) pour remplacer les facteurs vitamine K dépendants dont les synthèses ont été inhibées. Dans le cas d'une faible augmentation de l'INR et en l'absence de tout saignement, seul une diminution de la dose sera réalisée conduisant à la diminution de la valeur de l'INR dans les 24 heures. Lors d'une augmentation plus marquée de l'INR et en l'absence de saignement, un traitement par vitamine K1 à faible dose pourra être administré par voie orale ou sous-cutanée. Dans le cas de patients présentant une forte augmentation de leur INR, et en particulier chez les patients à risque hémorragique ou saignant abondamment, le défaut de coagulation devra être corrigé. Lorsque des saignements surviennent chez des patients sous traitement par AVK, il est important de prendre en compte le site du saignement. Les saignements de la partie haute du tube digestif sont généralement rencontrés chez les patients sous AVK avec prise concomitante d'autres médicaments. Une fois contrôlé, il est important d'identifier les lésions à l'origine du saignement et notamment au niveau des tractus gastro-intestinal et génito-urinaire qui restent souvent non détectés.

4.6.2. Autres effets indésirables.

Outre les hémorragies, les effets indésirables les plus importants liés aux AVK sont les complications thrombotiques aiguës telles que la nécrose cutanée ou la gangrène. Ces complications peu fréquentes sont généralement observées entre le troisième et le huitième jour de traitement et résultent de l'extension de la thrombose aux veinules et capillaires du tissu adipeux sous-cutané, dans le cas de la nécrose cutanée, et de l'obstruction massive de la circulation veineuse du membre, dans le cas de la gangrène [177]. La pathogénèse de ces complications ainsi que la localisation des lésions ne sont, à ce jour, pas bien connues. Cependant, une relation entre nécrose cutanée induite par les AVK et déficit en protéine C, voire plus rarement avec un déficit en protéine S, a été suggérée. La physiopathologie des nécroses cutanées induites par les AVK pourrait être liée à l'inhibition de synthèse des protéines C et S, inhibiteurs naturels de la coagulation. Il en résulte ainsi un état d'hypercoagulabilité conduisant à des complications thrombotiques au niveau de la microcirculation

cutanée et à de possibles nécroses tissulaires [178]. Cependant, il est à noter que ces complications peuvent également survenir chez des individus non déficients. Le traitement des patients atteints de nécrose cutanée induite par AVK et nécessitant un traitement à long terme est problématique. En effet, tout traitement par AVK est dans ce cas contre-indiqué et un traitement hépariné à long terme semble peu commode et potentiellement associé à de l'ostéoporose. Une approche raisonnable serait de redémarrer le traitement anticoagulant par AVK à faible dose sous couvert d'héparine à dose thérapeutique, et d'augmenter peu à peu la dose AVK sur une durée de une à plusieurs semaines. Cette approche pourrait potentiellement éviter la chute brutale des taux de protéine C avant même la diminution des taux en facteurs II, IX et X.

Enfin devant la large prescription des AVK, il est important de ne pas méconnaître les effets immunoallergiques rares des AVK. La rareté de ces effets est d'autant plus rares pour les dérivés coumariniques [178] que pour les dérivés de l'indane dione. En effet, des cas de thrombopénie, hépatite cytolitique, néphropathie tubulointerstitielle aigüe d'origine immuno-allergique [179], fièvre avec leucopénie et éosinophilie, syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse (DRESS syndrome) [180] ou encore pustulose exanthématique aigüe généralisée [181, 182] ont pu être imputés à la fluindione. L'alternative thérapeutique dans ces cas de réactions immuno-allergiques à la fluindione est l'utilisation d'un anticoagulant de la famille des coumariniques en raison de l'absence de structure chimique commune. De plus aucune observation n'a été, à ce jour, rapportée faisant état de possibles réactions croisées entre les molécules de ces deux familles d'AVK ni à l'introduction des produits ni à l'exploration allergologique autorisant ainsi l'introduction d'un médicament de l'une classe thérapeutique en cas de réaction générale à un membre d'une autre famille d'AVK.

5. ANTIVITAMINES K et LIBERATION PROLONGEE.

Comme vu précédemment, les AVK demeurent l'un des piliers du traitement anticoagulant au long cours. Cependant, le succès de cette thérapeutique doit faire face à certains obstacles liés aux patients et/ou aux molécules d'AVK elles-mêmes. Rappelons par exemple brièvement que la warfarine généralement sous forme de sels (sodique ou clathrate) peut précipiter dans le tractus digestif et conduire à des variations d'absorption intra- et interindividuelles importantes. Il est également important de garder à l'esprit que le nombre de patients non compliants est relativement important (de l'ordre de 35 % [183, 184]) et que cette perte de compliance survient dès les premiers mois de traitement [185].

Pour pallier ces difficultés, différentes études ont été menées afin d'améliorer l'efficacité et la sécurité du traitement par AVK. L'une des stratégies a consisté à tenter d'améliorer les propriétés physico-chimiques des AVK et notamment leur solubilisation en milieu acide grâce à l'utilisation de la polyvinylpyrrolidone ou de cyclodextrine. La seconde stratégie quant à elle, tend à rechercher des systèmes à libération continue et constante de warfarine tels que des microsphères, des systèmes céramiques ou des conjugués.

5.1. Warfarine et Polyvinylpyrrolidone.

L'étude d'Ammar et de ses collaborateurs [186] a consisté à évaluer le rôle de la polyvinylpyrrolidone (PVP) en tant qu'agent dispersant dans l'amélioration de la dissolution et de la biodisponibilité de la warfarine. La dispersion de la warfarine au sein de la PVP (Kollidon[®]25 ou Kollidon[®]30) sous forme de coévaporat permit d'augmenter sa dissolution *in vitro* de l'ordre de 30 %. Après administration orale des coévaporats chez le lapin à une dose de warfarine égale à 5 mg/kg, la biodisponibilité de la warfarine fut évaluée sur la base du temps de prothrombine et augmenta de l'ordre de 20 % pour les coévaporats utilisant 70 % de Kollidon[®]25 et de l'ordre de 60 % pour les coévaporats utilisant 50 % de Kollidon[®]30.

5.2. Warfarine et β -cyclodextrines.

Les β -cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques contenant sept unités de D-glucopyranose qui forment un anneau avec une cavité centrale hydrophobe dans laquelle les molécules lipophiles peuvent s'inclure. En raison de leur prix, de leur disponibilité et de la dimension de leur cavité, les β -cyclodextrines sont les cyclodextrines les plus largement utilisées. La taille de leur cavité centrale est adaptée pour les principes actifs les plus courants présentant des masses moléculaires comprises entre 200 et 800 g/mol. Le principal inconvénient de ces cyclodextrines est leur faible solubilité qui est de l'ordre de 18,5 g/L à 25°C.

L'application des cyclodextrines aux antivitamines K fut réalisée pour la première fois par Lin et coll. en 1986 [187]. Ce travail consista à améliorer les propriétés physico-chimiques de la warfarine et plus particulièrement, à augmenter la solubilité et la dissolution de la warfarine en milieu aqueux. Les mélanges binaires cyclodextrines/warfarine obtenus par lyophilisation firent appel à des α - et à des β -cyclodextrines. La dissolution de la warfarine fut significativement augmentée après la formation des complexes ; de l'ordre de 550 fois avec la β -cyclodextrine et de l'ordre de 1200 fois avec l' α -cyclodextrine. Il faudra attendre près de 20 ans avant qu'une nouvelle étude sur des complexes d'inclusion β -cyclodextrine/warfarine au sein de cyclodextrines soit menée [188]. A l'issue de cette étude, l'équipe de Zingone mit en évidence l'influence de la méthode de préparation des complexes (mélange physique, trituration, coévaporation, lyophilisation) et l'influence du pH sur l'inclusion du principe actif au sein des cyclodextrines. La lyophilisation conduit aux meilleurs résultats de dissolution et de solubilité probablement liés à la formation des complexes d'inclusion, à l'amorphisation du principe actif et à une diminution de la taille des particules favorisant ainsi la mouillabilité et la solubilité de la warfarine. La solubilité de la warfarine fut ainsi de l'ordre de 250 mg/L à pH 1,2 et de l'ordre de 350 mg/L à pH 5,5 correspondant à des t_{50} respectifs de 5 et < 2 minutes (warfarine seul : solubilité à pH 1,2 de 8,6 mg/L et à pH 5,5 de 17,7 mg/L correspondant à des t_{50} respectifs de > 180 et 100 minutes). Enfin, les études de stabilité menées dans ce travail ont permis de montrer la stabilité physique des complexes d'inclusion après une période de 12 mois à température ambiante.

5.3. Warfarine et matrice céramique à base d'hydroxyapatite.

La première étude sur l'application des matrices céramiques à la warfarine menée par Mileti et coll. [189] consiste à réaliser différents systèmes de délivrance de la warfarine à partir de céramiques d'hydroxyapatite. Ces céramiques furent préparées soit à partir d'hydroxyapatite seule soit à partir de mélanges associant hydroxyapatite et acides aminés tels que cystéine, tyrosine ou lysine. Après étude de dissolution *in vitro* de la warfarine, l'incorporation des acides aminés au sein de la matrice céramique a montré une augmentation des temps de dissolution de l'ordre de 4 à 114 heures pour une libération totale du principe actif. A cette étude *in vitro* fit suite l'étude de Tarr et coll. [190] qui consista à implanter ces céramiques sous la peau de rats Holtzman. Cette étude *in vivo* montra qu'une quantité de 1 mg de warfarine incorporée au sein de la matrice céramique était suffisante pour augmenter le temps de coagulation par un facteur 2 sans décès des animaux. En revanche, des quantités plus importantes de warfarine (5 et 10 mg) conduisirent à des augmentations respectives du temps de coagulation de 3 à 4 fois mais également à la mort des animaux en 5 et 2,5 jours respectivement.

5.4. Dicoumarol et microsphères biodégradables [191].

Dans leur étude, Barbato et coll. ont décrit la synthèse d'une nouvelle famille de polymères multiblocs issus de la polymérisation de la polycaprolactone (PCL) et de poly(éther-ester-amide) (PEEA). Cette nouvelle famille de polymères avait pour objectif de moduler la dégradation de la polycaprolactone en modifiant son hydrophilie et sa cristallinité. Cette étude s'est également intéressée à la fabrication des microparticules par la méthode de simple émulsion avec évaporation de solvant à partir des polymères de PCL-PEEA. Les microparticules de dicoumarol ainsi réalisées présentaient des tailles de l'ordre de 7 μm et des taux d'encapsulation de l'ordre de 93 %. Une étude de libération fut menée dans un tampon TRIS à pH 7,8 en présence ou non d' α -chymotrypsine et aucune différence de libération du principe actif dans ces deux milieux ne fut observée (pourcentage libéré de l'ordre de 10 % à 50 jours). Si certains travaux rapportent que l'insertion d'une séquence minimale de 4 acides aminés dans un polymère hydrophile permet d'en augmenter considérablement

la dégradation par voie enzymatique, l'insertion d'un seul acide aminé (ici, des résidus phénylalanine) au sein des chaînes polymériques de PCL n'aura pas permis d'augmenter la dégradation par l'action de protéases telles que l' α -chymotrypsine.

5.5. Dicoumarol et particules bioadhésives.

La stratégie adoptée par l'équipe de Mathiowitz et coll. fut de rechercher un système polymérique à libération prolongée et administrable par voie orale qui permettrait d'augmenter le confort et la compliance des patients par rapport à leur traitement. Le premier travail de cette équipe fut d'évaluer différents polymères sur la base de leurs propriétés bioadhésives. Le polymère retenu fut un copolymère d'acide fumarique et d'acide sébacique (P(FA:SA)) 20:80 [192]. Le second travail fut en partie consacré à la fabrication de nanoparticules de dicoumarol par la méthode de nanoencapsulation par inversion de phase. Les particules obtenues présentaient des tailles inférieures à 5 μm et 80 % des particules présentaient des tailles inférieures à 1 μm . Les nanoparticules de dicoumarol furent administrées par voie orale à des rats à la dose de 25 mg/kg et comparées à une solution commerciale de dicoumarol et à un lyophilisat de dicoumarol. Les biodisponibilités mesurées pour les nanoparticules, la solution et le lyophilisat de dicoumarol furent respectivement de l'ordre de 19 %, 12 % et 9 % [193, 194]. Des études similaires furent par la suite menées chez le rat et le cochon. Des nanoparticules de P(FA:SA) chargées en dicoumarol furent administrées par voie orale à la dose de 18,2 mg/kg. Les valeurs de C_{max} , T_{max} et de biodisponibilités absolues obtenues furent respectivement chez le rat de 75 $\mu\text{g/mL}$, 21 heures et 132 %, et chez le cochon de 67 $\mu\text{g/mL}$, 10 heures et 113 % [195, 196].

5.6. Warfarine et conjugués de polyéthylène glycol [197].

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère amphiphile qui présente de nombreux avantages tels que la solubilité dans l'eau comme dans certains solvants organiques, sa non-toxicité et son élimination de l'organisme par voie rénale et hépatique.

Dans son étude, Zacchigna et coll., rapporte la synthèse de conjugués warfarine-PEG réalisée par estérification entre le groupement alcool de la warfarine et le groupement acide du polyéthylène glycol.

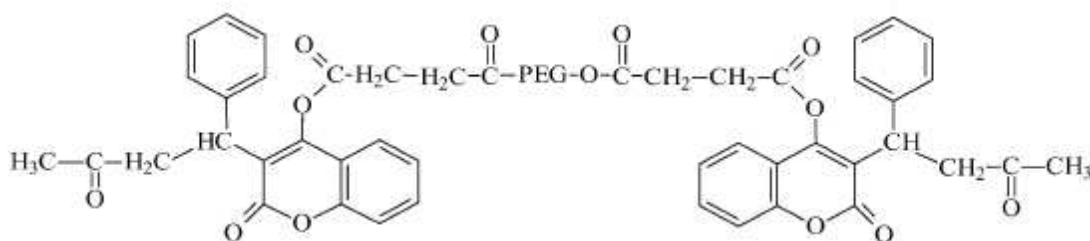


Figure 26 : Structure chimique d'un conjugué Warfarine-PEG [197].

Les études de dissolution *in vitro* ont été menées à différents pH pour évaluer la sensibilité du conjugué à l'hydrolyse. Les quantités de warfarine libérées furent de 2,5 % à pH 7,4 à 24 heures et inférieures à 1,5 % aux pH 1,2 et 5,5, respectivement à 6 et 24 heures. Les conjugués de warfarine-PEG ont été par la suite administrés par voie orale, intramusculaire et intraveineuse chez le lapin à une dose de warfarine de 0,5 mg/kg et comparés à la warfarine sodique qui fut administrée à la dose de 0,54 mg/kg. Après administration de warfarine sodique, les concentrations plasmatiques augmentèrent puis diminuèrent très rapidement dans un premier temps puis plus lentement dans un second temps. Après administration des conjugués, les pics de concentrations plasmatiques obtenus furent beaucoup plus faibles et les concentrations restèrent quasi constantes pendant 40 heures.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

RAPPELS SUR LES DOMAINES GALENIQUES EXPLORÉS.

1. GRANULATION, EXTRUSION ET SPHERONISATION [198].

Les pellets sont des sphères utilisées dans de nombreux domaines tels que ceux des industries pharmaceutiques, agro-alimentaires ou des polymères. Utilisés comme forme pharmaceutique, les pellets offrent non seulement des avantages thérapeutiques tels qu'une moindre irritation du tractus gastro-intestinal ou un risque plus faible d'effets indésirables liés à une libération excessive du principe actif mais également des avantages d'ordre technique se traduisant par une amélioration de l'écoulement, une moindre friabilité, des distributions plus homogènes des tailles, des enrobages facilités, un conditionnement uniforme ainsi qu'une meilleure reproductibilité des taux sanguins. Les pellets issus de l'industrie pharmaceutique présentent des tailles généralement comprises entre 500 et 1500 μm et sont inclus dans des capsules de gélatine ou comprimés. La libération des principes actifs peut être modulée par l'intermédiaire d'un enrobage réalisé autour des pellets. Cette libération sera alors influencée par la composition du film, des polymères choisis ou de l'épaisseur du film. La production des pellets peut être réalisée par différentes méthodes ; cependant, la technique d'extrusion-sphéronisation demeure la méthode la plus couramment utilisée. Les méthodes les plus récentes font appel à des granulateurs rotatifs à lit d'air fluidisé ou à des granulateurs centrifuges qui réalisent l'ensemble du processus dans un seul système clos. Décrite pour la première fois en 1970, la technique d'extrusion-sphéronisation se déroule en quatre étapes dénommées respectivement granulation, extrusion, sphéronisation et séchage. Il est à noter que les méthodes les plus récentes réalisent l'ensemble du processus dans un même système clos. La solution de granulation et le mélange de poudres sont alors ajoutés de manière constante à la surface d'un plateau tournant permettant ainsi l'agglomération des particules et leur sphéronisation de façon simultanée. Le plateau tournant monté dans un lit d'air fluidisé permet ainsi le séchage des pellets.

1.1. Granulation [199].

L'étape préliminaire à la granulation consiste à mettre en présence les différentes poudres sèches et à les mélanger de façon uniforme. Cette étape est généralement réalisée dans le mélangeur dédié à la granulation. La granulation consiste à préparer une masse humide présentant les caractéristiques souhaitées en termes de plasticité ou de déformation. Différents appareils peuvent être utilisés tels que les mélangeurs planétaires, les mélangeurs à haut cisaillement (« high shear mixer ») verticaux ou horizontaux ou bien encore les mélangeurs à lame sigma (« sigma blade mixer »). L'étape de granulation dans le processus d'extrusion-sphéronisation est généralement similaire à la technique de granulation utilisée lors de la production des produits de compression à l'exception de la nécessité d'une plus grande quantité du liquide d'humidification. La composition, la quantité et la répartition homogène du liquide d'humidification ainsi que le temps de mélange entre les matières sèches et ce liquide représentent les paramètres critiques de l'étape de granulation. En effet, de ces paramètres, dépendront les uniformités de taille et de forme des pellets obtenus.

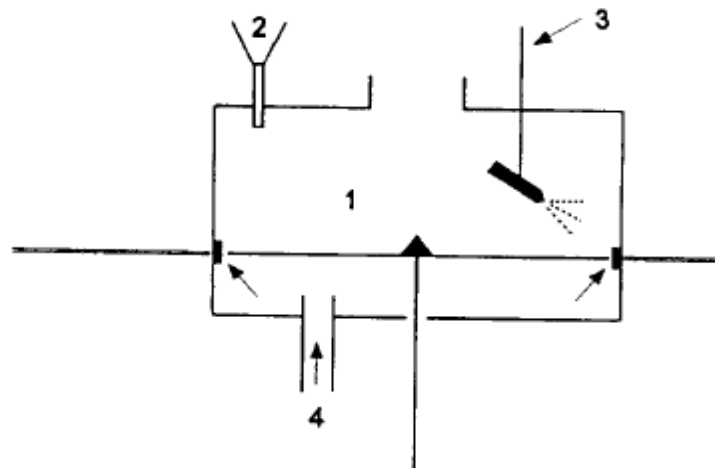


Figure 27 : Granulateur centrifuge.

1. Lit d'air ; 2. Système d'alimentation des poudres ; 3. Système d'alimentation du liquide d'humidification ; 4. Système d'alimentation en air (d'après Vervaet et al., 1995 [198]).

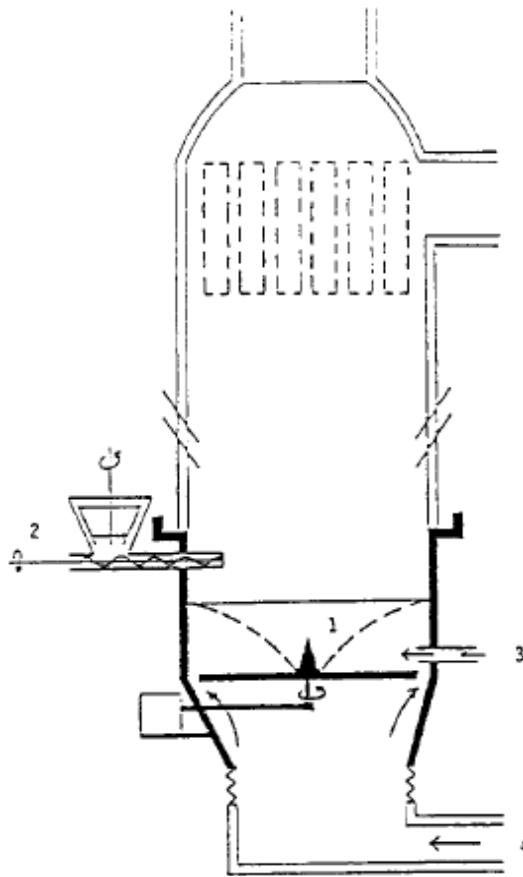


Figure 28 : Granulateur rotatif à lit d'air fluidisé.

1. Lit d'air ; 2. Système d'alimentation des poudres ; 3. Système d'alimentation du liquide d'humidification ; 4. Système d'alimentation en air (d'après Vervaet et al., 1995 [198]).

1.2. Extrusion [199].

L'étape d'extrusion consiste à forcer la masse obtenue après l'étape de granulation à travers une matrice. Les extrudats formés, semblables à des spaghettis, rompent sous leur propre poids à des longueurs similaires. Les extrudats doivent posséder suffisamment de plasticité pour se déformer mais pas trop pour ne pas adhérer entre eux lors de l'étape de sphéronisation ou lors de leur collecte. Il existe différentes variétés d'extrudeurs et ceux-ci sont généralement divisés en trois classes basées sur leur mode d'alimentation : alimentation au moyen d'une vis, par simple gravité ou par un piston.

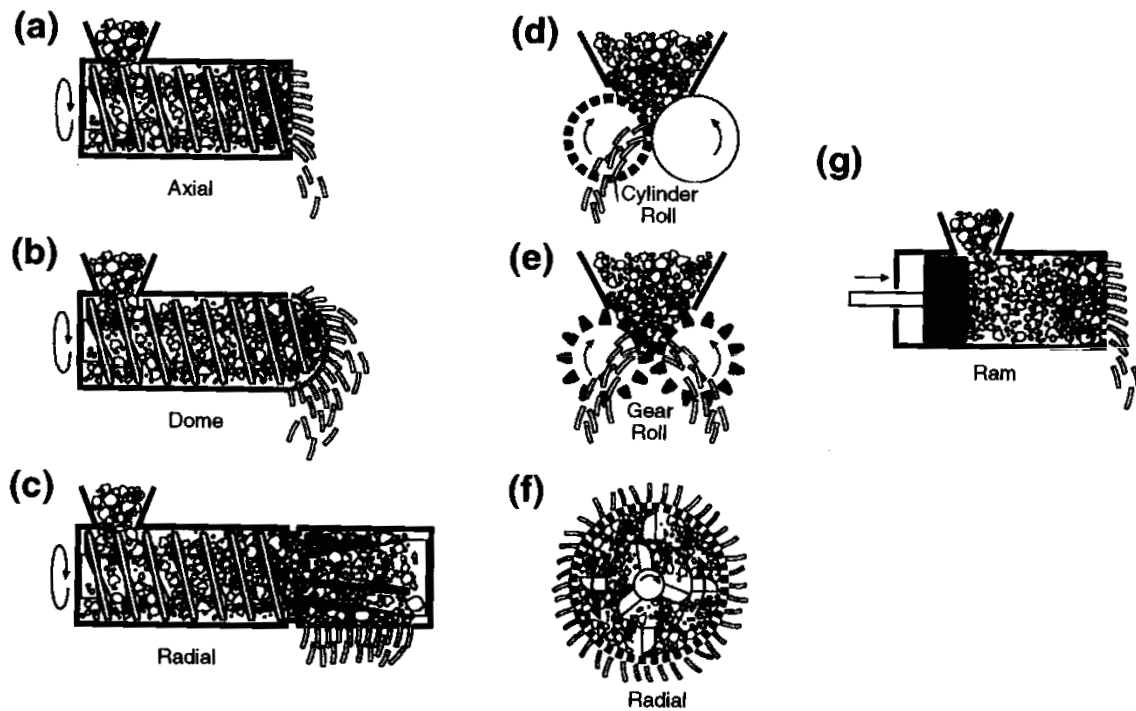


Figure 29 : Schéma d'extrudeurs à vis (a), (b), (c), par gravité (d), (e), (f) et à piston (g).
 (d'après Erkoboni, 2003 [199]).

Les extrudeurs à vis se différencient tout d'abord par leur plan d'extrusion qui peut-être soit parallèle (extrudeurs axial et extrudeur à dôme) soit perpendiculaire (extrudeur radial) au plan de transport de la masse à extruder. Durant le transport, la vis comprime la masse humide et élimine l'air piégé durant le processus. Si les extrudeurs bi-vis présentent des débits de production supérieurs, les extrudeurs mono-vis, quant à eux, permettent l'obtention d'extrudats de densité plus élevée. La périodicité des tours de la vis ainsi que l'espace compris entre la fin de la vis et le début de la matrice peuvent également constituer des paramètres influençant la densité de l'extrudat. En effet, une périodicité plus faible des tours diminuera les phénomènes de compression durant le transport alors qu'une périodicité plus élevée produira des extrudats plus denses liés à des phénomènes de compression plus importants. De même, un espace plus important entre la fin de la vis et le début de la matrice conduira à une compression plus importante de la masse humide avant l'extrusion. De l'accumulation de la masse humide résulte une augmentation de pression hydraulique au sein du système qui permet de forcer le matériel à travers la matrice. Il est à noter que le transport de la masse à extruder s'accompagne généralement d'une conversion

de l'énergie mécanique en température. Ainsi, au cours du transport, un gradient de température s'établit entre la zone d'alimentation (températures les plus faibles) et la zone d'extrusion (températures les plus élevées). Dans le cas des extrudeurs à dôme, cette augmentation de température est plus négligeable en raison des dimensions plus petites de la matrice qui permettent des débits d'extrusion plus importants et de moindres accumulations de chaleur.

Les extrudeurs par gravité peuvent être, quant à eux, à cylindres, à engrenages ou radiaux. La grande différence de ces extrudeurs par rapport à ceux précédemment décrits est qu'il n'existe pas de compression de la masse à extruder avant extrusion. Les extrudeurs à cylindres ou à engrenages possèdent tous deux des rouleaux qui exercent une force sur la masse humidifiée pour former l'extrudat ; les premiers possèdent deux rouleaux, un rouleau plein et un rouleau creux percé de trous et les seconds possèdent deux roues dentées creuses percées de trous à la base de chacune de leurs dents. Ainsi, lors de la compression de la masse à extruder, les extrudats se forment entre les rouleaux et sont ensuite collectés dans l'espace vide des rouleaux creux. Enfin, les extrudeurs par gravité radiaux possèdent un ou plusieurs bras tournants qui vont écraser la masse humidifiée contre la fenêtre d'extrusion.

Les extrudeurs à piston (« ram extruder ») sont utilisés pour étudier les paramètres de déformation et d'écoulement des masses à travers les matrices. La force d'extrusion peut être divisée en trois étapes : étape de compression, écoulement à l'état d'équilibre et écoulement forcé. L'étape de compression correspond à la consolidation de la masse sous faible pression. L'écoulement à l'état d'équilibre représente la pression nécessaire pour maintenir un écoulement constant. Enfin, l'étape d'écoulement forcé correspond à une augmentation de pression nécessaire pour maintenir l'écoulement ; généralement liée à un défaut de plasticité de la masse à extruder.

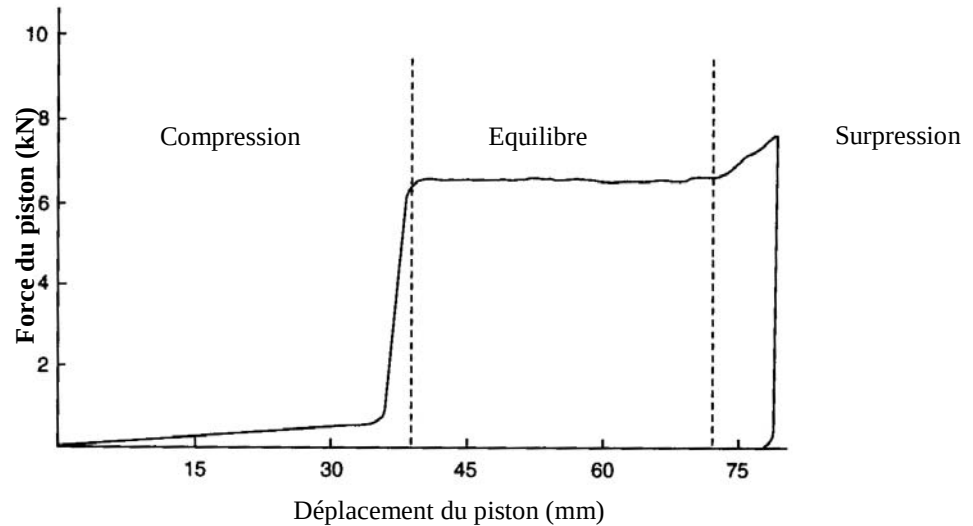


Figure 30 : Etapes d'extrusion d'un extrudeur à piston [199].

Les principaux paramètres du processus d'extrusion sont la vitesse d'alimentation, les dimensions et l'ouverture de la matrice d'extrusion et la composition du liquide de granulation influant sur la plasticité, la cohésion et la lubrification de la masse à extruder.

1.3. Sphéronisation [199].

L'étape de sphéronisation va consister à transformer les filaments extrudés en particules sphériques. Cette transformation résulte des forces de frottement existantes entre les particules et entre les particules et l'appareil. Cette étape est réalisée dans un sphéroniseur, composé d'un récipient à parois lisses et d'un plateau tournant à surface rugueuse qui permet l'augmentation des forces de frottement. Deux types de plateau peuvent être utilisés : un plateau dont les striations sont disposées de façon radiale ou un plateau dont les striations sont disposées en croix.

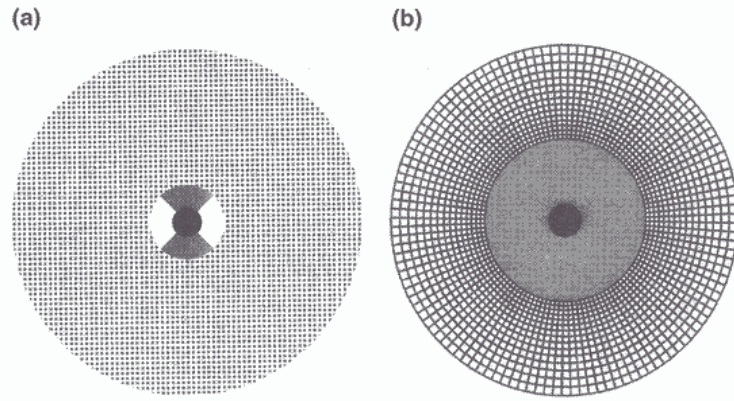


Figure 31 : Disques de sphéronisation.

(a) radial ; (b) en croix [199].

Après rupture des filaments en petits cylindres, la transformation de ces derniers en sphères se déroule en plusieurs étapes. Deux modèles différents ont été proposés pour décrire ce processus. Les différentes étapes de chacun des modèles sont représentées dans la figure 32.

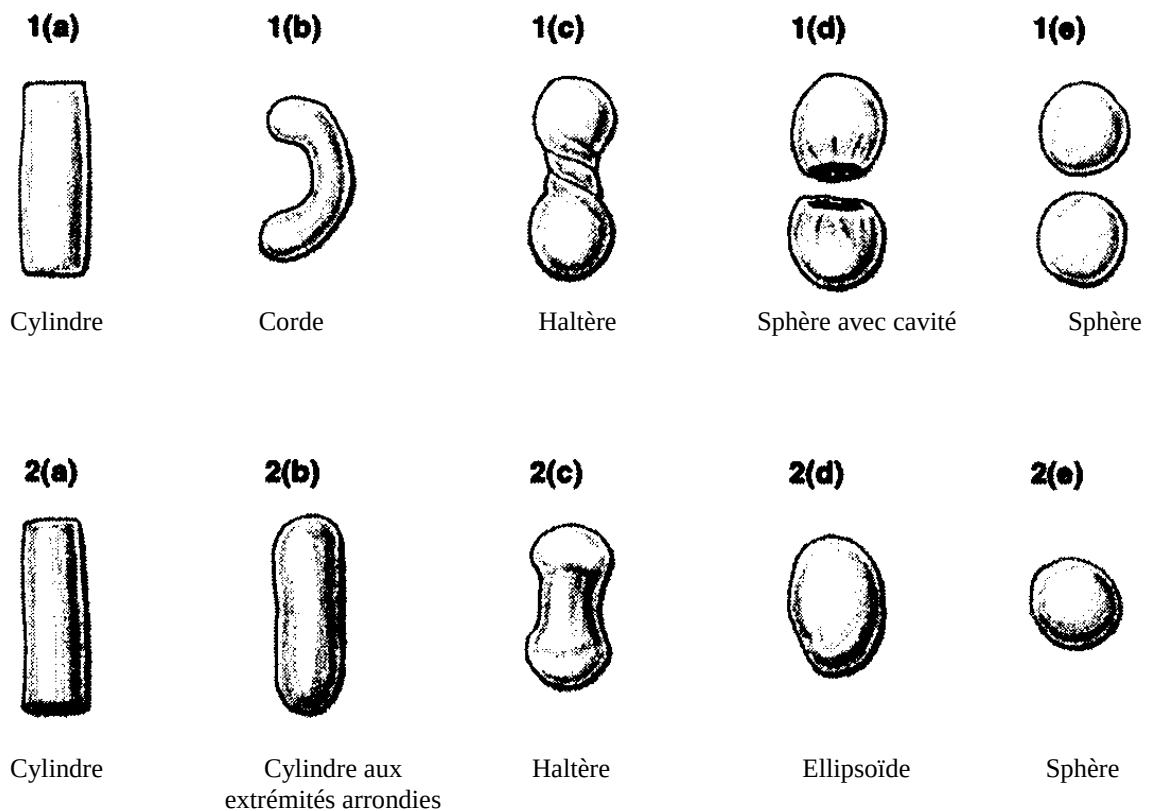


Figure 32 : Représentation du mécanisme de sphéronisation.

(a) modèle proposé par Baert et al. [200]; (b) modèle proposé par Rowe et al. [201].

Les principaux paramètres du processus de sphéronisation sont la taille du sphéroniseur, la quantité d'extrudat à sphéroniser, la vitesse du plateau tournant et la durée de sphéronisation. La variation de ces différents paramètres va avoir une influence directe sur la taille, la forme, la densité, la dureté, la porosité ou la friabilité des pellets obtenus ou une influence indirecte sur la taille en modifiant la teneur en eau de l'extrudat.

1.4. Séchage [199].

En excluant certaines étapes optionnelles telles que l'enrobage, l'encapsulation ou la compression, l'étape de séchage est la dernière étape du processus d'extrusion-sphéronisation. Elle peut être réalisée dans différents séchoirs tels que des étuves ou des séchoirs à lits fluidisés. Le choix du mode de séchage devra être choisi en fonction des propriétés que l'on souhaite pour les particules fabriquées. Prenons l'exemple de la vitesse de séchage, si les séchoirs à lit fluidisé présentent les vitesses de séchage les plus élevées, l'étuve présente la vitesse de séchage la plus faible. Du fait de cette faible vitesse, l'étuve peut permettre la migration et la recristallisation du principe actif à la surface des pellets permettant ainsi une augmentation de la libération du principe actif dans le milieu de dissolution. Cependant, ce même phénomène peut être un inconvénient pour l'étape d'enrobage, par une perte de la surface lisse des pellets obtenue après l'étape de sphéronisation.

2. LA MICROENCAPSULATION PAR EXTRACTION/EVAPORATION DE SOLVANT.

Les microparticules ont été très largement étudiées pour la délivrance de principes actifs tels que les héparines, les antigènes ou l'ADN. Administrables aussi bien par voie parentérale, pulmonaire, orale ou nasale, les microparticules préviennent les principes actifs de la dégradation et augmentent leur temps de résidence dans l'organisme [202]. De plus, la dégradation des particules polymériques permet la libération lente du principe actif encapsulé. Cette libération peut permettre l'amélioration d'un traitement par diminution de la fréquence de prise du médicament et l'amélioration de la compliance du patient. Plusieurs méthodes de fabrication des microparticules par extraction/évaporation de solvant peuvent être utilisées et le choix de la méthode dépend alors de la nature hydrophile ou lipophile du principe actif. Pour les principes actifs faiblement hydrosolubles ou insolubles dans l'eau, la méthode par simple émulsion eau/huile (o/w) est généralement utilisée. Cette méthode est la méthode la plus simple et toutes les autres méthodes en dérivent. Elle s'effectue en quatre étapes. La première étape consiste à réaliser la phase dispersée en dissolvant le principe actif et le polymère dans un solvant organique. La seconde étape procède à l'émulsification de la phase dispersée dans une phase aqueuse également appelée phase continue. Cette étape est suivie par l'extraction du solvant de la phase dispersée par la phase continue. L'extraction du solvant s'accompagne par l'évaporation du solvant et se traduit par la solidification des gouttelettes de phase dispersée. Enfin, la dernière étape consiste à laver les particules afin d'éliminer le solvant résiduel, à les récupérer et à les sécher.

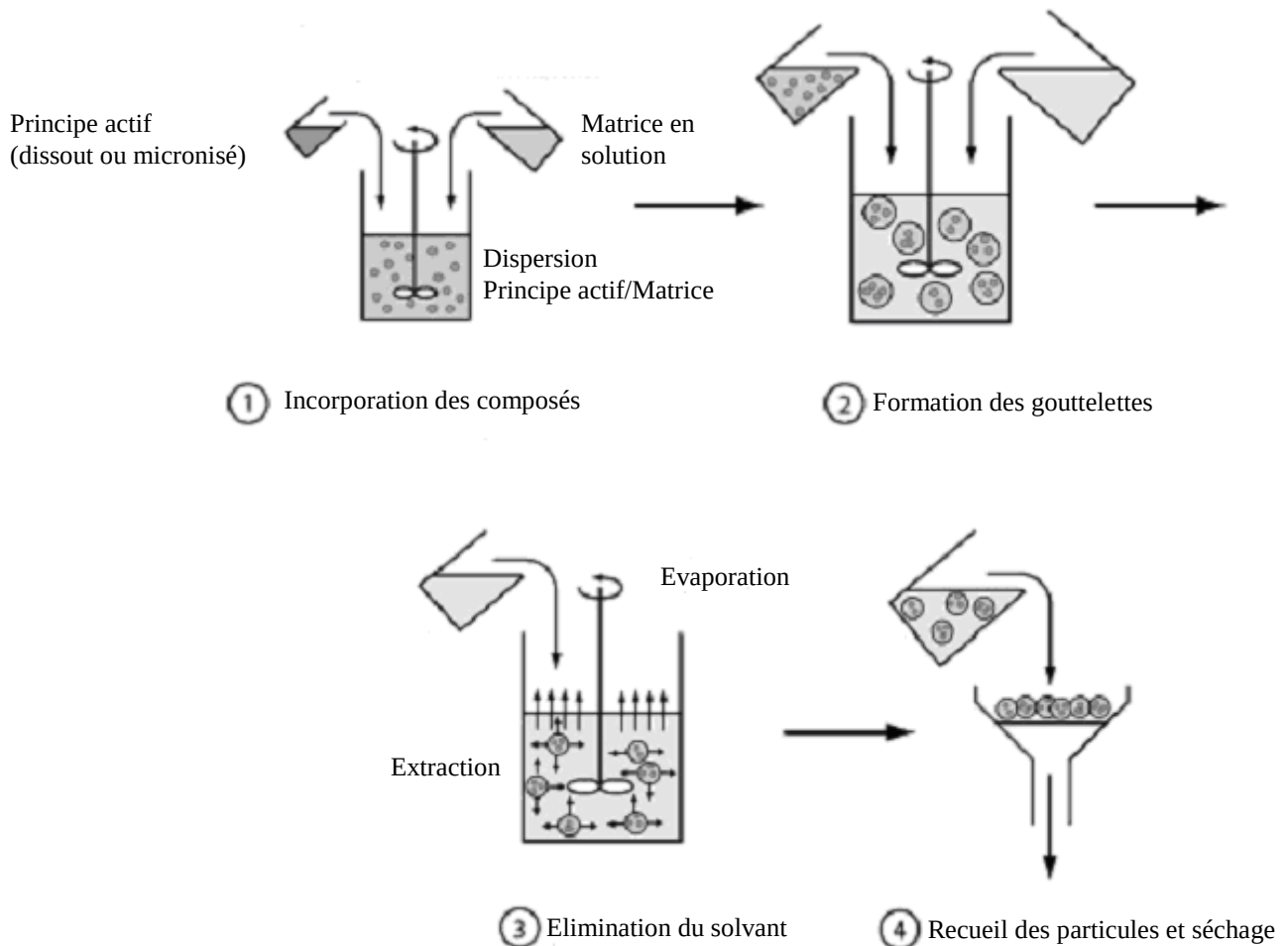


Figure 33 : Etapes de fabrication des microparticules par extraction/évaporation de solvant.

(d'après Freitas et al. [202]).

L'encapsulation des composés hydrophiles ne peut s'effectuer par la méthode eau/huile du fait de leur insolubilité dans les solvants organiques et de leur diffusion vers la phase continue durant l'étape d'émulsification conduisant à de faibles taux d'encapsulation. D'autres méthodes ont été proposées pour l'encapsulation des principes actifs hydrophiles :

- La méthode par double émulsion eau/huile/eau (w/o/w) : la solution aqueuse de principe actif est émulsifiée avec une phase organique. Cette émulsion est ensuite dispersée dans une seconde phase aqueuse formant ainsi une seconde émulsion (émulsion w/o/w).
- La méthode par simple émulsion (o/w) avec utilisation d'un co-solvant : lorsqu'un principe actif est insoluble dans la phase organique, un second solvant appelé co-solvant est utilisé pour dissoudre le principe actif.

- La méthode par dispersion (o/w) : le principe actif est dispersé sous forme de poudre dans la solution composée du polymère et du solvant organique.
- La méthode par évaporation de solvant de solvants non aqueux (o/o) : la phase aqueuse est ici remplacée par une phase huileuse telle que l'huile minérale.

Pour un même principe actif, le taux d'encapsulation peut varier en fonction de la méthode utilisée et les propriétés physiques des particules obtenues sont fortement dépendantes des natures des matériaux, du solvant et des paramètres utilisés au cours de leur fabrication [203].

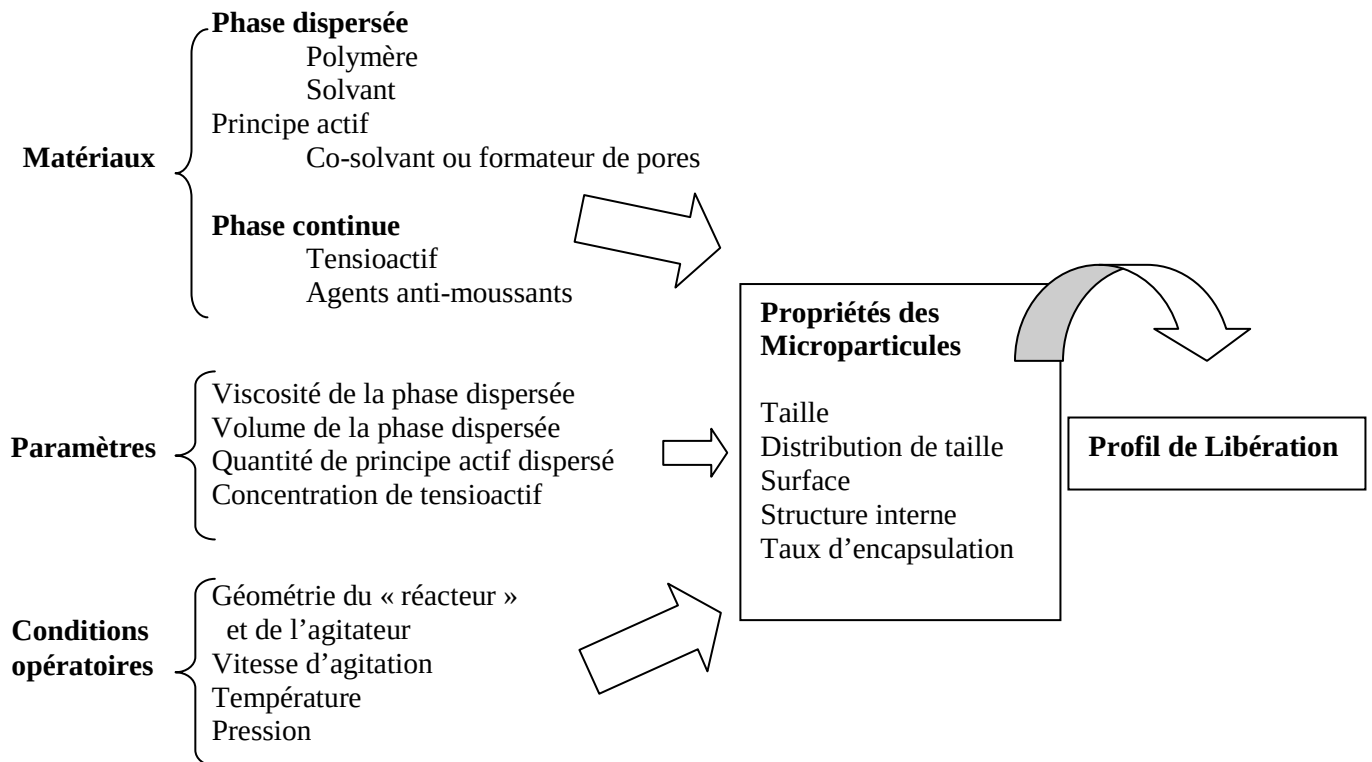


Figure 34 : Facteurs influençant la fabrication des microparticules.
(d'après Li M et al. 2008 [203]).

La nature des polymères utilisés dans le domaine pharmaceutique est essentiellement liée à leur caractère biodégradable et biocompatible. Le terme biodégradable signifie que les matériaux utilisés se dégradent en composés inoffensifs qui sont soit métabolisés soit excrétés par l'organisme. Le terme biocompatible signifie que les matériaux devraient être tolérés par l'organisme et ne pas causer d'effets indésirables locaux ou systémiques après leur administration. Les polymères et les copolymères des acides lactique et glycolique sont les polymères les plus fréquemment utilisés dans les systèmes de délivrance des médicaments du fait de leur excellente biocompatibilité. Cependant, des polymères non biodégradables mais biocompatibles tels que l'éthylcellulose ou les polymères polyméthacryliques peuvent également être utilisés. Le choix du polymère ou des polymères utilisés est essentiellement réalisé sur la base de leurs propriétés physicochimiques et de leur influence sur la libération du principe actif.

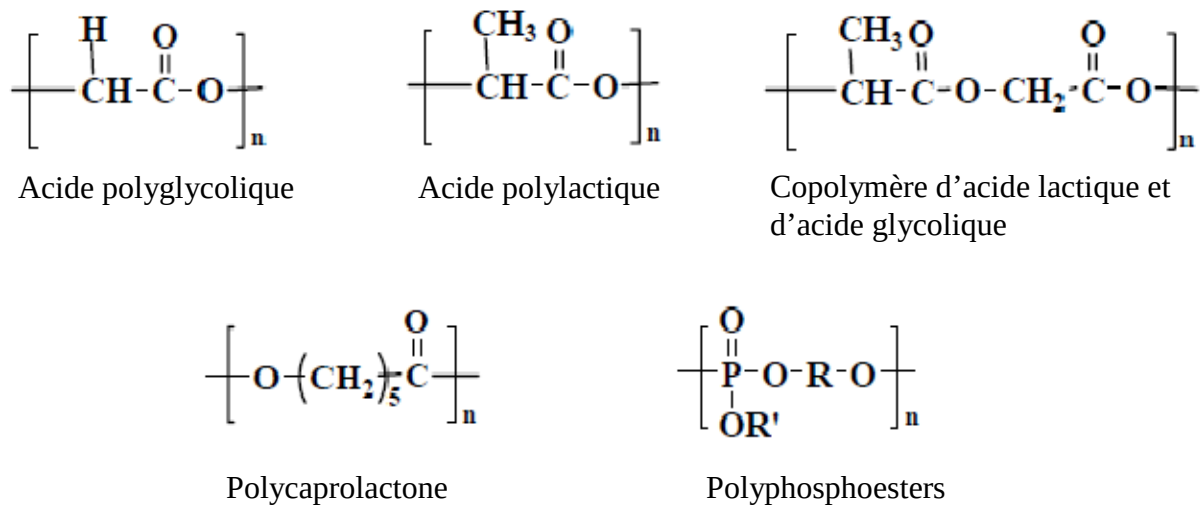


Figure 35 : Structure chimique de la famille des Polyesters.
(d'après Park et al., 2005 [204]).

Le second paramètre à prendre en compte dans la fabrication des microparticules est la nature du solvant. Historiquement, le chloroforme fut fréquemment utilisé dans la technique de microencapsulation par extraction/évaporation de solvant. Cependant, du fait de sa faible pression de vapeur et de sa toxicité, le chloroforme s'est vu peu à peu remplacé par le dichlorométhane devenu le solvant le plus communément utilisé dans cette technique. En effet, le dichlorométhane présente des propriétés physicochimiques avantageuses telles qu'une forte volatilité, une faible température d'ébullition et une très faible miscibilité dans l'eau. De plus, le dichlorométhane possède une pression de vapeur saturante élevée permettant d'obtenir une vitesse d'évaporation élevée et de réduire les temps de fabrication. Cependant, en raison de son caractère carcinogène, le dichlorométhane se voit de plus en plus remplacer par des solvants moins toxiques tels que l'acétate d'éthyle. Si l'acétate d'éthyle présente une toxicité moindre par rapport au dichlorométhane, il est néanmoins 4,5 fois plus miscible dans l'eau que ce dernier ; différence ayant des conséquences sur la fabrication des particules. En effet, la plus grande extraction de l'acétate d'éthyle par la phase continue peut conduire à la précipitation du polymère sous forme de fils. Pour palier ce problème, différentes stratégies ont pu être mises au point telles que saturer la phase continue en acétate d'éthyle, réaliser une pré-émulsion ou réaliser l'émulsion dans des volumes plus faibles de phase aqueuse. Ces stratégies permettent l'obtention de microparticules mais conduisent à des taux d'encapsulation généralement plus faibles et à des particules moins sphériques et moins uniformes, en comparaison aux mêmes méthodes utilisant le dichlorométhane. Enfin, le formate d'éthyle montre lui aussi des résultats intéressants. Malgré une plus faible pression de vapeur et une température d'ébullition plus élevée que le dichlorométhane, le formate d'éthyle présente une vitesse d'évaporation 2,1 fois plus élevée que le dichlorométhane ; phénomène lié au plus grand nombre de molécules de formate d'éthyle à l'interface liquide/air. Ceci démontre la possibilité de fabriquer des microparticules à partir de solvants partiellement miscibles à la phase aqueuse. D'autres études utilisant le formate d'éthyle doivent être menées afin de comparer l'influence du formate d'éthyle à celle du dichlorométhane sur la fabrication des microparticules et d'en confirmer le rôle prometteur.

Enfin, le surfactant, également appelé agent tensioactif, est également un paramètre de formulation à prendre en compte. Il est généralement utilisé pour émulsifier deux phases non miscibles entre elles. L'agent tensioactif permet de réduire la tension de surface de la phase continue, de stabiliser l'émulsion et ainsi d'éviter la coalescence et l'agglomération des gouttelettes lipophiles et de diminuer la taille des particules. Un surfactant idéal permet l'obtention de microparticules de taille homogène et garantit de ce fait une libération plus prévisible et mieux maîtrisée. Le choix du surfactant et de sa concentration dépend de la polarité des deux phases non miscibles, de la taille et de la sphéricité souhaitées pour les particules. Ainsi, quatre types de surfactants peuvent être rencontrés en fonction de la nature de la partie hydrophile : les surfactants anioniques, cationiques, amphotères ou non ioniques. Parmi les surfactants les plus classiquement utilisés, sont retrouvés l'alcool polyvinylique, la méthylcellulose, le Tween[®] (monooléate de sorbitane de polyoxyéthylène), le Span[®] (oleate de sorbitane), le dodécyl sulfate de sodium ou le bromure de cetyltriméthyl ammonium.

A côté de ces trois composants essentiels (polymères, solvants, tensio-actifs), la fabrication des microparticules peut également faire appel à l'utilisation de co-solvants, de formateurs de pores ou d'agents anti-moussants. Les premiers permettent d'augmenter la solubilité des principes actifs partiellement insolubles dans le solvant organique de la phase dispersée, les seconds permettent de former des pores au sein des microparticules et d'en augmenter la dégradation, et les derniers aident à dissiper les bulles d'air entraînées dans la phase continue lors d'une forte agitation. Une fabrication optimale passera ainsi par l'étude de la modulation de tous ces matériaux et de différents paramètres tels que la viscosité de la phase dispersée, le pH de la phase continue, la durée et la vitesse d'agitation, la pression et la température de travail.

ARTICLES

ARTICLE 1

Granules in the improvement of oral heparin bioavailability

Article publié dans

International Journal of Pharmaceutics

Int J Pharm 2009 Jun 5 ; 374 (1-2) : 12-6.

Article 1 : Développement de granulés pour l'administration orale d'héparine.

Les héparines de bas poids moléculaire (HBPM), principalement utilisées pour la prévention des thromboses veineuses profondes, sont administrées par voie parentérale. En effet, en raison de leur taille et de leur charge négative, les héparines ne sont pas absorbées par voie orale. La voie parentérale, agressive, requiert l'assistance de personnel qualifié et le développement d'une forme orale permettrait d'améliorer le confort des patients et de remplacer les antagonistes de la vitamine K. Lors de ce travail, une forme orale a été développée sous forme de granulés enrobés utilisant des polymères déjà largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique : la cellulose microcristalline pour la préparation des granulés primaires et l'éthylcellulose et l'Eudragit® RS pour l'enrobage. Cette préparation n'a requis aucune utilisation de solvant organique et n'a eu lieu qu'en présence de solution ou de suspension aqueuses.

Dans ce travail, des granulés d'héparines de bas poids moléculaire, l'énoxaparine et la bémiparine, ont été développés. Après obtention des granulés primaires de cellulose microcristalline chargés en héparine, une étape d'enrobage fut réalisée à partir d'éthylcellulose (Aquacoat® ECD) ou d'un polymère polycationique, l'Eudragit® RS 30 D, utilisés seuls ou en mélange. Après administration orale des granulés à la dose de 600 IU anti-Xa/kg à des lapins, les activités anti-Xa plasmatiques les plus élevées furent de $0,45 \pm 0,12$ IU/mL et de $0,54 \pm 0,08$ IU/mL, respectivement pour les granulés d'énoxaparine et de bémiparine ce qui correspond à des biodisponibilités respectives de $19,00 \pm 0,30$ % et de $29,02 \pm 4,12$ %. Ce travail a permis d'une part de confirmer l'absorption orale des héparines de bas poids moléculaire à partir de granulés et d'autre part de confirmer le rôle des polymères polycationiques tels que l'Eudragit® RS comme promoteur d'absorption.

Granules in the improvement of oral heparin bioavailability

J.Scala-Bertola^a, M.Rabiskova^b, T.Lecompte^a, F.Bonneaux^a, P.Maincent^{a,*}

^a EA 3452-Inserm U 734, School of Pharmacy-5, rue A. Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

^b Faculty of Pharmacy, Brno University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Czech Republic

Abstract

Low molecular weight heparins (LMWHs), mainly used for the prevention of deep vein thrombosis, are so far only administered by parenteral route. Presumably, due to their large size and negative charge, LMWHs are not absorbed efficiently across the mucus of the gastrointestinal tract. Since parenteral administration requires medical assistance and is not the most convenient route of application, the development of an oral dosage form of heparin would improve patients comfort and replace vitamin K antagonists. Thus, we developed granules of two LMWHs, enoxaparin and bemiparin, based on primary granules of microcrystalline cellulose and loaded with ethylcellulose (Aquacoat[®] ECD) or a polycationic polymer (Eudragit[®] RS 30 D (ERS)) or their mixtures. The highest maximal plasma anti-Xa activities and the highest bioavailabilities for enoxaparin granules (0.45 ± 0.12 IU/mL; 19.00 ± 0.30 %, respectively) and for bemiparin granules (0.54 ± 0.08 IU/mL; 29.02 ± 4.12 %, respectively) were found after oral administration of granules loaded with ERS alone at a dose of 600 IU anti-Xa/kg to rabbits. These results confirm the oral absorption of LMWH from granules loaded with polycationic polymer and open up this technology for peptides and proteins that are very sensitive to organic solvents and have poor drug absorption from the gastrointestinal tract.

Keywords: oral heparin delivery; granules; Eudragit[®]RS30D; Aquacoat[®]ECD; drug release *in vitro*; anti-Xa activity *in vivo*

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 22 96; fax: +33 3 83 68 23 01.

E-mail address: philippe.maincent@pharma.uhp-nancy.fr (Ph. Maincent).

1. Introduction

Discovered more than 90 years ago by McLean (McLean, 1916), unfractionated heparins (UFH) were used in clinic over 50 years and are still nowadays one of the most important anticoagulant drugs in current clinical use especially when a rapid effect is desired like in intensive healthcare or in surgery. Furthermore, thanks to their longer half-lives, less bleeding properties for a given antithrombotic effect and no laboratory monitoring requirement, low molecular weight heparins (LMWHs) replaced UFH step by step in the prevention and treatment of venous thrombo-embolism over the last few decades (Hirsh and Raschke, 2004). Despite its various advantages, LMWHs are molecules with large molecular weight, negatively charged structure and instability under acidic conditions obliging them to be administered by parenteral way and to be replaced by an orally active anticoagulant like warfarin for long-term outpatient therapy. However, warfarin presents a slow onset, a very low therapeutic index and a high possibility of drug/drug interactions limiting its practical utility (Arbit et al., 2006). An oral dosage form of LMWH could be a very attractive alternative to usual oral anticoagulants and would result in shortened hospital stay, improvement of patient compliance and reduction in expenses. From this observation, a lot of studies have been done during the last two decades to find a delivery system for the oral administration of heparin. These studies included strategies, e.g. cell-membrane permeabilization, tight-junction modifications, increase of drug lipophilicity or protection against acidic pH of the stomach (Motlekar and Youan, 2006). Absorption enhancers were one of chosen strategies to improve heparin absorption. Thanou et coll. (Thanou et al., 2001) used the Ca^{2+} -chelating ability of a poly(acrylate) derivative Carbopol 934P to interfere with the intercellular junctions and increase the paracellular permeability. Another strategy to circumvent the barrier function of the gastrointestinal tract is offered by thiol groups of polymeric adjuvants inhibiting protein tyrosine phosphatase involved in the closing process of tight junctions, via a GSH-mediated mechanism (Bernkop-Schnurch et al., 2003; Schmitz et al., 2005). Motlekar et coll. investigated the absorption-enhancing effect of glycyrrhethinic acid (Motlekar et al., 2006), L-arginine (Motlekar et al., 2006), zonula occludens toxin synthetic peptide derivative (AT1002) (Motlekar et al., 2006) or sodium caprate (Motlekar et al., 2005) on the intestinal permeability and

bioavailability of ardeparin using rat model and Caco-2 cell culture model. Various other strategies are also under investigation such as dimethyl sulfoxide and deoxycholic acid conjugates (Kim et al., 2007) in monkeys, chitosan derivatives (Thanou et al., 2007) or Labrasol (Rama Prasad et al., 2004) in rats. Currently, the most effective formulation is the co-administration of heparin with N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate, a carrier molecule that improves the oral absorption of heparin in humans (Berkowitz et al., 2003). Previous results obtained with various oral delivery systems of UFH or LMWH and based on their encapsulation into polymeric nano/microparticles (Hoffart et al., 2006; Jiao et al., 2002; Jiao et al., 2002; Lamprecht et al., 2007) have led to the gastro-intestinal absorption of heparin in rabbits, with doses that were similar to those administered by intravenous infusion or subcutaneous injection in humans.

In this study, granules of LMWH were prepared by wet granulation and subsequently blended with two polymeric aqueous dispersions used alone or in different mixtures (Eudragit[®] RS30D and Aquacoat[®] ECD30). This new oral form of heparin, compared to nano/microparticles, may offer a more convenient, industrialisable and robust way of fabrication leading to an easier scale up process. Furthermore, the utilization of polymeric aqueous dispersions allows the toxicological issues usually related with the use of organic solvents to be avoided and a more safety product for the working staff as well as for patients to be obtained. Enoxaparin and bemiparin were selected as LMWH drugs and the optimized LMWH granules were administered orally to rabbits.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Two low molecular weight heparins were used as active ingredients, sodium enoxaparin (MW 3500-5500 Da), Lovenox[®] (10.000 UI anti-Xa/1 mL) marketed by Sanofi-Aventis (Paris, France) and sodium bemiparin powder (MW 3000-4200 Da) kindly offered by Rovi Pharmaceutical Laboratories with respective anti-Xa/anti-IIa ratio of 3-4 and 8. Microcrystalline cellulose (MCC), Ceolus[®] KG-802 was a gift from Asahi Kasei Chemicals Corporation (Tokyo, Japan) and was used as a filler. An

aqueous dispersion of ethylcellulose polymer, Aquacoat[®]ECD30 (AqC) from FMC BioPolymer (Newark, U.S.A.) or aqueous dispersion of ammonio methacrylate copolymer (MW 150,000 Da), Eudragit[®]RS30D (ERS), from Evonik Industries (Essen, Germany) were used as loading polymers. The reagents used for the measurement of the anti-Xa activity were supplied by Diagnostica Stago (Asnières-sur-Seine, France). Hydranal[®]-Coulomat AG and N,N-Dimethylformamide used for the water content measurement were provided by Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and Fluka (Steinheim, Germany), respectively. All other reagents were of analytical grade and used as supplied.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of LMWH granules.

The preparation of granules of LMWH was carried out by the wet granulation technique divided into three usual steps: moistening, drying and granulation/sieving. Samples (containing different enoxaparin content, i.e. 500, 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 anti-Xa IU, respectively obtained by dilution of the commercial stock solution in a final volume of 2 ml; and 75000 anti-Xa IU of bemiparin diluted in 2 ml of distilled water) of LMWH solution were first added to 1 g of MCC. The resulting wetted mass was pre-dried at 40°C for 3 h. Then it was forced through a sieve with a mesh size of 600 µm. Final drying of granules at 40°C lasted 24 h. The samples were prepared in triplicate and stored in a vacuum desiccator at 4°C in the presence of a drying agent.

2.2.2. Preparation of polymers-loaded LMWH granules.

One gram of LMWH granules was blended with either ERS or AqC or their mixtures (100:0; 75:25; 50:50; 25:75 and 0:100) corresponding to 400 mg of dry polymer powder. The resulting mass was pre-dried for 1.5 hour at 40°C in order to be forced through a sieve and the polymers-loaded LMWH granules were finally dried and stored as described above. Each formulation was made in triplicate.

2.2.3. *Particle size distribution.*

The shape of granules was determined by transmission light microscopy performed by Olympus IX50, (Olympus France S.A.S., France) and the measurement of the size (n=180) was performed by Kappa ImageBase software purchased from Kappa opto-electronics GmbH (Gleichen, Germany).

2.2.4. *Water content measurement.*

The water content measurement of granules was determined by Karl Fisher titration realized by 756 KF Coulometer (Metrohm SA, Switzerland). This assay was performed by adding 10 mg of granules to 50 mL of Hydranal[®]-Coulomat AG and 50 mL of N,N-Dimethylformamide into a titration cell without diaphragm. Each sample was measured in triplicate.

2.2.5. *In vitro drug release.*

Granules (50 mg) were suspended in 20 mL of phosphate buffer saline (Na_2HPO_4 0.64 %, KH_2PO_4 0.06%, NaCl 0.59 %; pH 7.4). The suspension was incubated in a water bath at 37°C under magnetic stirring at 200 rpm. At different times (5, 10, 15, 30, 45 minutes, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 hours) samples of 1.5 mL were withdrawn and replaced by 1.5 mL of fresh phosphate saline buffer. Each sample was filtered through Porafil[®] cellulose mixed ester membrane with a pore size of 0.20 μm (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The amount of heparin released from the granules was determined by turbidimetric method (Hoffart et al., 2003). Aliquots of 0.5 mL of filtered samples were added to 0.5 mL of sodium acetate buffer (acetic acid 1.22 %, sodium acetate 10.75 %; pH 4.4) and mixed with 2 mL of 0.1% cetylpyridinium chloride in 0.94% NaCl aqueous solution. Samples were incubated at 37°C for 1 h and then assayed at 500 nm by UV spectroscopy (Uvikon 922, Kontron, Eching, Germany). All experiments were performed in triplicate.

2.2.6. *In vivo experiments.*

Experiments were carried out according to the French legislation on animal experiments. Granules were filled into hard gelatine capsules and orally administered to male New-Zealand rabbits (3478 ± 395 g) housed in separate cages, fasted overnight with water *ad libidum*. The administration of enoxaparin granules was performed by oral gavage at a dose of 600 anti-Xa IU/kg of body weight, that one of bemiparin granules at doses of 600 and 1200 anti-Xa IU/kg, respectively. Blood samples (1.5 mL) were taken from the marginal ear vein at different times (2, 4, 6, 8, 10 and 24 hours) and then, added to a constant volume of sodium citrate 0.129 M (0.17 ml) and centrifuged at 3000xg for 10 min.

The concentration of heparin was determined automatically (STA Compact Automate, Diagnostica Stago, France) with a factor Xa chromogenic assay (Stachrom Heparin, Diagnostica Stago) (Teien and Lie, 1977). Each of the heparin standards and plasma samples containing LMWH (25 μ L) was mixed with 50 μ L of antithrombin III solution. This solution was mixed with 100 μ L of bovine factor Xa and incubated for 30 s at 37 °C. Factor Xa chromogen substrate (100 μ L) was then added and incubated at 37 °C. The absorbance was determined at 405 nm every 2 s for 10 to 30 s of incubation. A linear relationship between Δ absorbance/min and the concentration of heparin in the range of 0 to 0.8 anti-Xa U/mL was obtained. This assay had a coefficient of variation of <7% at a limit of detection of 0.02 anti-Xa U/mL.

To calculate the relative bioavailability (F) of heparin granules, the solutions of enoxaparin and bemiparin were administered by subcutaneous injection to overnight fasted rabbits at respective dose of 300 and 150 anti-Xa IU/kg of body weight. The anti-Xa activity of heparin was measured as described above. After the determination of the area under the curve (AUC) of the concentration/time profile by the linear trapezoidal method, the relative bioavailabilities were calculated by the ratio of the respective AUC corrected by the administered doses. All experiments were performed in triplicate.

2.3. *Statistical Analysis*

The results were expressed as mean values $\pm$ S.D. For the pairwise comparison the Mann-Whitney test was used to investigate differences statistically. In all cases, $p < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results and discussion

The granules of enoxaparin, prepared with an average yield of $94.0 \pm 2.9 \%$, showed broad size distribution ranging from 5 to 335 μm . Independently on the heparin contents of the particles and polymers used, the water contents ($2.8 \pm 0.2 \%$) measured after the final drying were in usual industrial range. Consequently to these parameters, low production costs and use of safe materials as an aqueous dispersion, the industrial production of enoxaparin granules can be easily considered.

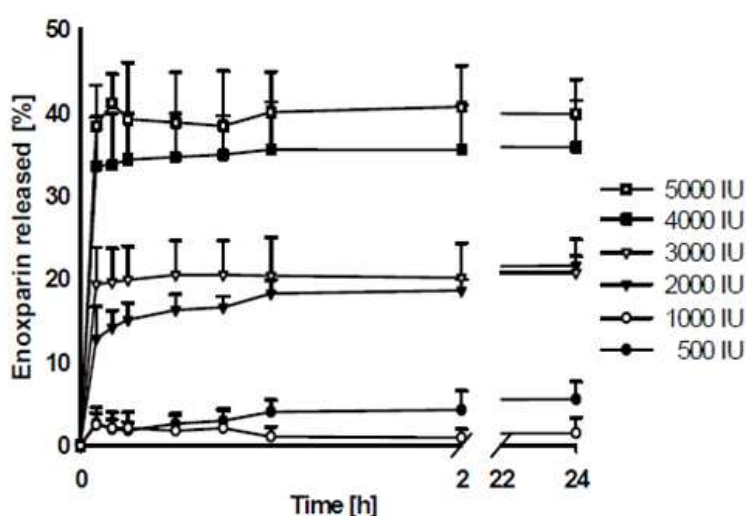


Fig.1 Influence of enoxaparin content: Release profiles of enoxaparin from granules loaded with Eudragit®RS30D. Experiments were performed in phosphate buffer saline at 37°C and pH 7.4 under 200 rpm stirring. Data are shown as mean $\pm$ S.D. (n=3).

Figure 1 shows the effect of enoxaparin content (500, 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 anti-Xa IU) on release: the higher is the enoxaparin content the more drug is released. The amount of drug released from the granules after 24 hours of stirring ranged from $1.4 \pm 1.8 \%$ to $40.1 \pm 4.8 \%$. For the lowest drug contents (500 resp. 1000 anti-Xa IU), only small amount of enoxaparin ($4.0 \pm 1.4 \%$ and $1.0 \pm 1.2 \%$, respectively after 1 h; $5.5 \pm 2.1 \%$, and $1.4 \pm 1.8 \%$, respectively after 24 h) was released from the granules probably due to the strong interaction of all enoxaparin with the positive groups of Eudragit®RS30D by electrostatic forces. The drug content however did not affect the shape of release profile that was composed of fast burst

release followed by a plateau. It was supposed that on one hand, enoxaparin was partly adsorbed on the surface of granules and its easy desorption corresponded to a burst effect as noticed above and on the other hand enoxaparin partly and strongly interacted with Eudragit®RS30D leading to an incomplete release. Influence of enoxaparin content on its *in vitro* release presented for granules loaded with ERS only was also found for all other mixtures of polymers.

The effect of the ratio of polymers ERS/AqC (0:100; 25:75; 50:50; 75:25 and 100:0) on the release of enoxaparin is presented in Fig.2. The decrease of the enoxaparin release has been observed with the increase of ERS content. Indeed, the percentage of enoxaparin released from the granules ranged from 38.3 ± 4.9 % to 100.0 ± 6.1 % when the ratio of ERS/AqC varied from 100:0 to 0:100. Thanks to its positively charged quaternary ammonium groups, ERS can form electrostatic bonds with negatively charged sulphate and carboxyl groups of enoxaparin. Thus, it might be possible to control the rate of release of enoxaparin from granules by modifying the Eudragit®RS30D/Aquacoat®ECD30 ratio. As an example, granules containing 5000 anti-Xa IU of enoxaparin were chosen, but influence of the ratio of polymers on *in vitro* release of active substance was also found for granules with different drug contents (2000, 3000 or 4000 anti-Xa IU).

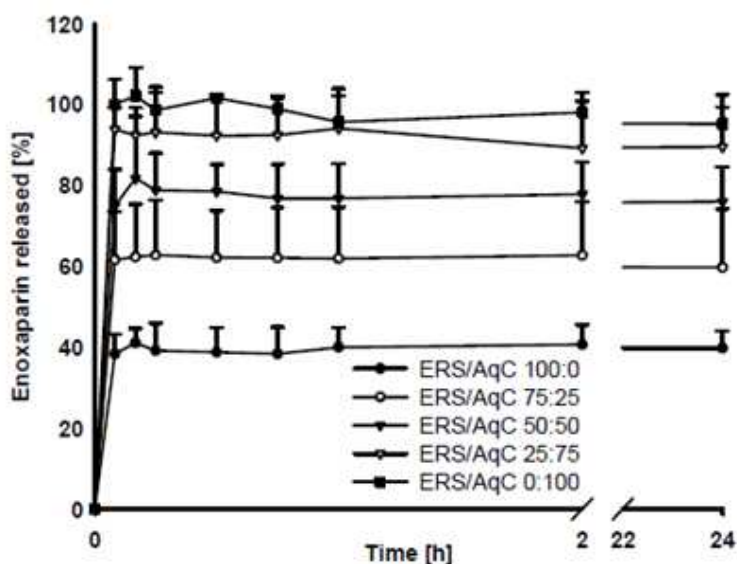


Fig.2 Influence of the ratio of polymers: Release profile of enoxaparin (5000 anti-Xa IU) from granules loaded with polymers. Experiments were performed in phosphate buffer saline at 37°C and pH 7.4 under 200 rpm stirring. Data are shown as mean±S.D. (n=3).

The previous results are confirmed in Table 1, which presents the percentage of enoxaparin released from the granules after 24 hours and summarizes the influence of enoxaparin content and polymers ratio. These values varied from 21.6 ± 1.1 % for granules containing 2000 anti-Xa IU of enoxaparin and loaded with ERS alone to 95.2 ± 7.2 % for granules with 5000 anti-Xa IU of enoxaparin and only loaded with AqC. However, the influence of polymers ratio seemed to be more important than those of drug content. Indeed, the percentage of released drug varied between 1.0 and 2.7 times when the drug content ranged between 2000 and 5000 anti-Xa IU whereas it varied between 2.4 and 4.6 times when the ratio of polymers ERS/AqC ranged between 100:0 and 0:100.

Table 1 Percentage of enoxaparin released from the granules after 24 h of stirring (200 rpm) in phosphate buffer saline pH 7.4 at 37°C (n=3).

		Eudragit®RS30D/Aquacoat®ECD30 Ratios				
		100:0	75:25	50:50	25:75	0:100
I n c o r p o r a t e d Enoxaparin (anti-Xa IU)	2000	21.6±1.1	24.2±0.6	45.2±1.3	80.1±5.8	93.9±2.5
	3000	20.7±4.1	39.6±3.8	67.9±2.8	89.7±5.3	94.8±4.8
	4000	35.8±5.6	51.2±3.2	71.7±3.8	92.4±8.2	93.7±5.2
	5000	39.8±4.2	59.7±14.4	76.0±8.6	89.5±9.9	95.2±7.2

According to *in vitro* studies, studies *in vivo* were performed with granules loaded with 5000 anti-Xa IU of enoxaparin, which released the highest amount of the drug. Furthermore, they allowed a more comfortable oral administration to rabbits and decreased volume of administered dose. The results of *in vivo* studies are presented in Figure 3.

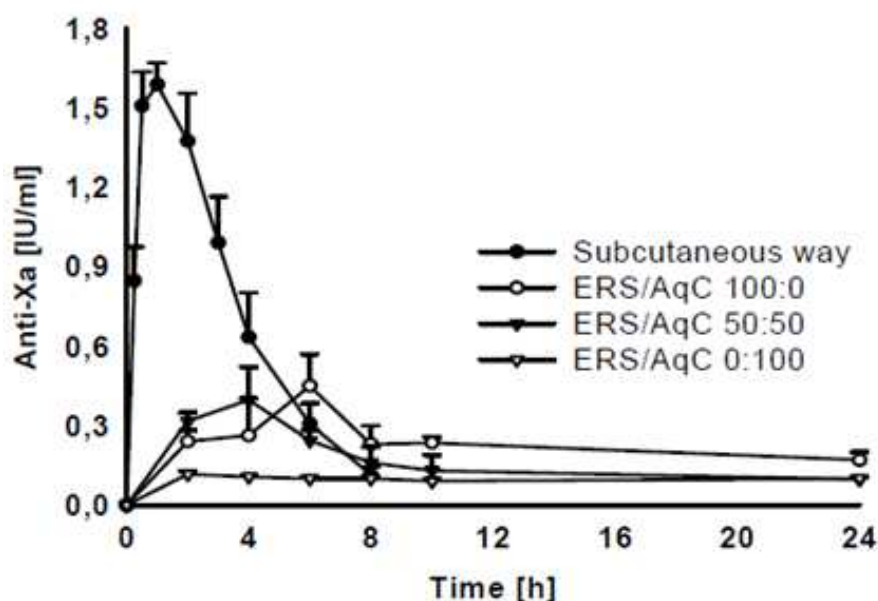


Fig.3 *In vivo* release of enoxaparin: Anti-Xa activity over the time after a single oral administration of granules loaded with polymers to rabbits at a dose of 600 anti-Xa IU/kg. Data are mean $\pm$ S.D. (n=3).

After a single oral administration of fresh granules of enoxaparin (600 IU/kg) to rabbits, the highest anti-Xa response was observed for granules loaded with ERS alone (peak concentration of 0.45 ± 0.12 IU/ml 6 hours after administration). Lower peak concentrations, 0.40 ± 0.12 and 0.12 ± 0.01 IU/ml, respectively, were observed 4 and 2 hours after administration of granules loaded with ERS/AqC 50:50 and AqC alone. After subcutaneous injection of a single dose of 300 IU/kg of body weight to rabbits (peak concentration of 1.59 ± 0.08 IU/ml 1 hour after administration) and determination of AUC, the bioavailability values (F) were calculated. The lowest bioavailability was observed for granules loaded with AqC alone (6.66 ± 0.12 %) and the highest for granules loaded only with ERS (19.00 ± 0.30 %); granules loaded with ERS/AqC 50:50 showed slightly lower bioavailability (15.53 ± 1.80 %) than ERS granules (Table 2). These results demonstrated the improvement of enoxaparin absorption for granules loaded with ERS. This improvement may be due to an intimate contact between enoxaparin granules loaded with ERS and mucus resulting from electrostatic interactions between positive charges of ERS and negative charges of mucus especially related to sialic acid residues (Lamprecht et al., 2006). This

interaction may also lead to a higher local concentration of heparin helping its diffusion and absorption through the mucocellular wall. As presented for polycationic chitosan (Thanou et al., 2007; Thanou et al., 2001; Thanou et al., 2001), ERS may also interacts with the surface of cells and modify the structural organization of the tight junction associated proteins allowing an increased absorption of enoxaparin by paracellular way. Compared to previous studies made with microparticles or nanoparticles (Hoffart et al., 2006; Jiao et al., 2002), granules of enoxaparin present a less intense but more sustained anti-Xa activity released profile over the curative dose of 0.2 IU anti-Xa IU/ml (Bianchini et al., 1995).

Table 2 Pharmacokinetic parameters of granules after a single oral administration to rabbits compared with subcutaneous administration of enoxaparin (n=3).

Formulations	Dose (anti-Xa IU/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (anti-Xa IU/mL)	$AUC_{0 \text{ to } 10h}$ (IU h/mL/kg)	F_{10h} (%)
ENOXAPARIN					
Enoxaparin solution	300	1	1.59±0.08	2.19±0.14	100
Aquacoat® ECD30	600	2	0.12±0.01	0.29±0.01	6.66±0.12
Aquacoat® ECD30 Eudragit® RS30D 50:50	600	4	0.40±0.12	0.68±0.08	15.53±1.80
Eudragit® RS30D	600	6	0.45±0.12	0.83±0.02	19.00±0.30
BEMIPARIN					
Bemiparin solution	150	1	0.51±0.08	0.91±0.16	100
Unloaded granules	1200	2	0.15±0.04	0.32±0.03	7.76±0.85
Loaded granules	1200	4	0.38±0.15	0.77±0.18	19.05±4.47
Unloaded granules	600	2	0.10±0.03	0.24±0.07	6.55±1.84
Loaded granules	600	4	0.54±0.08	1.05±0.15	29.02±4.12

According to the results obtained with enoxaparin granules, we decided to use a second generation LMWH, bemiparin sodium with a lower molecular weight (3600 Da) and higher anti-Xa/anti-IIa ratio (8:1) than enoxaparin sodium.

The effect of ERS on the *in vitro* release of enoxaparin was also found with granules of bemiparin as shown in Table 3. Determined amounts of bemiparin released from unloaded and ERS loaded granules were $80.9 \pm 2.7 \%$ and $70.3 \pm 4.9 \%$ after 1 h, respectively and $80.3 \pm 1.0 \%$ and $68.8 \pm 5.4 \%$ after 24 h, respectively. Even if the

presence of ERS in the granules decreased the drug release in dissolution medium, the difference of heparin release from ERS unloaded and ERS loaded granules of bemiparin was less significant than in the case of enoxaparin. This result can be explained by the use of a greater amount of heparin (75,000 IU) leading to the saturation of the ERS polymer quaternary ammonium groups by bemiparin and the release in dissolution medium of an important amount of heparin adsorbed on the surface of the granules. The increase of heparin contents in granules led to the decrease of the ratio between the amount of heparin strongly interacting with ERS polymer and the amount of heparin weakly adsorbed on the surface of the granules. Furthermore it is interesting to notice that bemiparin was not completely released from unloaded granules. This fact could be explained by the lower molecular weight and the lower chain length of bemiparin compared to enoxaparin which led to a better entrapment of bemiparin inside the matrix of cellulose.

Table 3 Release profile of bemiparin (75,000 anti-Xa IU) from granules loaded with polymers. Experiments were performed in phosphate buffer saline at 37°C and pH 7.4 under 200 rpm stirring. Data are shown as mean±S.D. (n=3).

Time	Bemiparin released (%)						
	5 min	15 min	30 min	1h	2h	4h	24h
Unloaded granules	87.8±6.6	80.4±5.6	85.3±6.6	80.9±2.7	82.3±1.7	83.7±1.5	80.3±1.0
Loaded granules	74.3±3.8	70.5±7.4	71.2±9.3	70.3±4.9	73.3±6.0	71.5±5.3	68.8±5.4

After a single oral administration of fresh granules of bemiparin to rabbits at the dose of 600 or 1200 anti-Xa IU/kg, respectively, the highest responses were observed for ERS loaded granules with peak concentrations of 0.54 ± 0.08 and 0.38 ± 0.15 anti-Xa IU/ml 4 hours after administration as expected (Fig. 4). After a subcutaneous injection of bemiparin solution to rabbits at a dose of 150 anti-Xa IU/kg (peak concentration of 0.51 ± 0.08 IU/ml 1 h after administration), the AUC of ERS loaded granules administered at 600 or 1200 IU/kg of rabbit body weight were determined and their calculated bioavailabilities after 10 h were 29.02 ± 4.12 % and 19.05 ± 4.47 %, respectively (see Table 2). Lower pharmacokinetic parameters were

observed after administration of unloaded granules (peak concentration of 0.10 ± 0.03 and 0.15 ± 0.04 IU/ml and bioavailabilities of 6.55 ± 1.84 and 7.76 ± 0.85 % for a dose of 600 and 1200 IU/kg, respectively) showing the role of ERS polymer on the improvement of heparin absorption after its oral administration. The increase of the dose administered to rabbits did not show an increase of the biological activity of bemiparin. Indeed, no statistical difference was observed between the biological activities of bemiparin granules administered at a dose of 600 IU/kg (peak concentration of 0.54 ± 0.08 anti-Xa IU/ml at 4 h) and at a dose of 1200 IU/kg (peak concentration was only 0.38 ± 0.15 anti-Xa IU/ml at 4 h). Since there is no statistical difference, it can be hypothesized that absorption of bemiparin through the intestinal wall may be limited by a saturable mechanism.

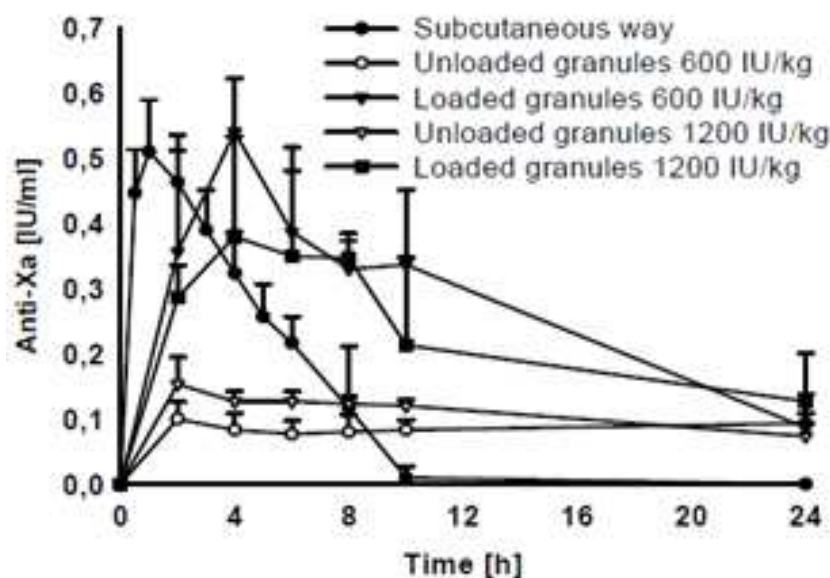


Fig.4 *In vivo* release of bemiparin: Anti-Xa activity over the time after a single oral administration of loaded and unloaded granules to rabbits at a dose of 600 and 1200 anti-Xa IU/kg. Data are mean $\pm$ S.D. (n=3).

4. Conclusion

The absorption of heparin by oral route has been a really exciting biopharmaceutical challenge during the last decades. First, an oral form of heparin could constitute a very interesting opportunity for therapeutics and second, heparin may be a representative model drug of active substances from the third class (high solubility, low permeability) of the biopharmaceutical drug classification proposed by Amidon and al. (Amidon et al., 1995) like insulin or other proteins. This kind of active substance presents highly variable rate and extent of drug absorption. This variation seems to be due to the variable gastrointestinal transit, luminal contents and membrane permeability rather than dosage form factors. In this study, we tried to modify the permeability factor of heparin by using different ratios of polymers. The use of AqC seemed to increase enoxaparin release on the one hand but on the other hand to decrease its permeability. Contrary to AqC, ERS decreased the release of enoxaparin or bemiparin and increased their *in vivo* permeabilities probably thanks to its mucoadhesivity and its ability to open the tight junctions. Furthermore, thanks to granules, we developed a very interesting new solid form of heparin because of its very easy, non toxic, and industrialisable way of manufacture. The aim of our next studies would be to quantify the modification of heparin permeability created by polycationic polymers or by other intestinal absorption enhancers and to determine if this modification of permeability is controlled over the time.

Acknowledgements

The authors wish to thank Rovi Pharmaceutical Laboratories for supplying Bemiparin powder.

References

- Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P. and Crison, J. R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, 12, 413-420.
- Arbit, E., Goldberg, M., Gomez-Orellana, I. and Majuru, S., 2006. Oral heparin: Status review. *Thromb J*, 4, 6.
- Berkowitz, S. D., Marder, V. J., Kosutic, G. and Baughman, R. A., 2003. Oral heparin administration with a novel drug delivery agent (snac) in healthy volunteers and patients undergoing elective total hip arthroplasty. *J Thromb Haemost*, 1, 1914-1919.
- Bernkop-Schnurch, A., Kast, C. E. and Guggi, D., 2003. Permeation enhancing polymers in oral delivery of hydrophilic macromolecules: Thiomers/gsh systems. *J Control Release*, 93, 95-103.
- Bianchini, P., Bergonzini, G. L., Parma, B. and Osima, B., 1995. Relationship between plasma antifactor xa activity and the antithrombotic activity of heparins of different molecular mass. *Haemostasis*, 25, 288-298.
- Hirsh, J. and Raschke, R., 2004. Heparin and low-molecular-weight heparin: The seventh accp conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest*, 126, 188S-203S.
- Hoffart, V., Lamprecht, A., Maincent, P., Lecompte, T., Vigneron, C. and Ubrich, N., 2006. Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *J Control Release*, 113, 38-42.

- Hoffart, V., Ubrich, N., Lamprecht, A., Bachelier, K., Vigneron, C., Lecompte, T., Hoffman, M. and Maincent, P., 2003. Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers. *Drug Deliv*, 10, 1 - 7.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Hoffart, V., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M. and Maincent, P., 2002. Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. *J Pharm Sci*, 91, 760-768.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T. and Maincent, P., 2002. In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. *Circulation*, 105, 230-235.
- Kim, S. K., Lee, D. Y., Lee, E., Lee, Y. K., Kim, C. Y., Moon, H. T. and Byun, Y., 2007. Absorption study of deoxycholic acid-heparin conjugate as a new form of oral anti-coagulant. *J Control Release*, 120, 4-10.
- Lamprecht, A., Koenig, P., Ubrich, N., Maincent, P. and Neumann, D., 2006. Low molecular weight heparin nanoparticles: Mucoadhesion and behaviour in caco-2 cells. *Nanotechnology*, 17, 3673-3680.
- Lamprecht, A., Ubrich, N. and Maincent, P., 2007. Oral low molecular weight heparin delivery by microparticles from complex coacervation. *Eur J Pharm Biopharm*, 67, 632-8.
- McClean, Jay, 1916. The thromboplastic action of cephalin. *Am J Physiol*, 41, 250-257.
- Motlekar, N. A., Fasano, A., Wachtel, M. S. and Youan, B. B., 2006. Zonula occludens toxin synthetic peptide derivative at1002 enhances in vitro and in vivo intestinal absorption of low molecular weight heparin. *J Drug Target*, 14, 321-329.

- Motlekar, N. A., Srivenugopal, K. S., Wachtel, M. S. and Youan, B. B., 2005. Oral delivery of low-molecular-weight heparin using sodium caprate as absorption enhancer reaches therapeutic levels. *J Drug Target*, 13, 573-583.
- Motlekar, N. A., Srivenugopal, K. S., Wachtel, M. S. and Youan, B. B., 2006. Evaluation of the oral bioavailability of low molecular weight heparin formulated with glycyrrhetic acid as permeation enhancer. *Drug Dev Res*, 67, 166-174.
- Motlekar, N. A., Srivenugopal, K. S., Wachtel, M. S. and Youan, B. B., 2006. Modulation of gastrointestinal permeability of low-molecular-weight heparin by l-arginine: In-vivo and in-vitro evaluation. *J Pharm Pharmacol*, 58, 591-598.
- Motlekar, N. A. and Youan, B. B., 2006. The quest for non-invasive delivery of bioactive macromolecules: A focus on heparins. *J Control Release*, 113, 91-101.
- Rama Prasad, Y. V., Minamimoto, T., Yoshikawa, Y., Shibata, N., Mori, S., Matsuura, A. and Takada, K., 2004. In situ intestinal absorption studies on low molecular weight heparin in rats using labrasol as absorption enhancer. *Int J Pharm*, 271, 225-232.
- Schmitz, T., Leitner, V. M. and Bernkop-Schnurch, A., 2005. Oral heparin delivery: Design and in vivo evaluation of a stomach-targeted mucoadhesive delivery system. *J Pharm Sci*, 94, 966-973.
- Teien, Arne N. and Lie, Mette, 1977. Evaluation of an amidolytic heparin assay method: Increased sensitivity by adding purified antithrombin III. *Thromb Res*, 10, 399-410.
- Thanou, M., Henderson, S., Kydonieus, A. and Elson, C., 2007. N-sulfonato-n,o-carboxymethylchitosan: A novel polymeric absorption enhancer for the oral delivery of macromolecules. *J Control Release*, 117, 171-178.

- Thanou, M., Nihot, M. T., Jansen, M., Verhoef, J. C. and Junginger, H. E., 2001. Mono-n-carboxymethyl chitosan (mcc), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo. *J Pharm Sci*, 90, 38-46.
- Thanou, M., Verhoef, J. C. and Junginger, H. E., 2001. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliv Rev*, 52, 117-126.
- Thanou, M., Verhoef, J. C., Nihot, M. T., Verheijden, J. H. and Junginger, H. E., 2001. Enhancement of the intestinal absorption of low molecular weight heparin (lmwh) in rats and pigs using carbopol 934p. *Pharm Res*, 18, 1638-1641.

ARTICLE 2

PELLETS FOR ORAL ADMINISTRATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN

Article accepté dans

Drug Delivery and Pharmaceutical Industry

Drug Dev Ind Pharm 2009 Jun 30 (En ligne).

Article 2 : Développement de pellets pour l'administration orale d'héparine.

L'absorption orale des héparines de bas poids moléculaire est limitée par leur masse moléculaire élevée et leur charge négative. Ce travail se situe dans la continuité des études menées sur l'encapsulation d'héparines non fractionnées comme d'héparines de bas poids moléculaire dans des nano- et des microparticules polymériques. L'administration orale de ces formes particulières à des lapins avait permis l'absorption gastro-intestinale des héparines encapsulées. Ces résultats furent attribués aux propriétés mucoadhésives d'un polymère polycationique, l'Eudragit®RS. Du fait de résultats similaires obtenus avec les nanoparticules et les microparticules, la taille des particules ne fut pas considérée comme un critère déterminant à l'absorption orale des héparines. Cette étude a pour objectif de développer une méthode de fabrication d'une nouvelle forme d'héparine administrable par voie orale qui ne nécessite pas l'utilisation de solvants organiques et qui soit facilement industrialisable. Lors de cette étude, des pellets matriciels d'énoxaparine (MW 4500 Da) et des pellets matriciels ou enrobés d'Eudragit®RS, chargés en bémiparine (MW 3600 Da) ont été ainsi préparés par la méthode d'extrusion-sphéronisation. Après caractérisation des pellets d'héparine (morphologie, taille, friabilité, dureté, dissolution *in vitro*), des études *in vivo* menées chez des lapins ont été réalisées. L'administration orale des pellets d'énoxaparine, à la dose de 600 IU anti-Xa/kg a permis d'obtenir des biodisponibilités relatives comprises entre $9,7 \pm 1,9 \%$ et $12,8 \pm 2,7 \%$. Les pellets de bémiparine, quant à eux, ont conduit à des activités anti-Xa plus faibles, en dessous de la valeur minimale thérapeutique de 0,1 IU/mL.

PELLETS FOR ORAL ADMINISTRATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT
HEPARIN

Julien Scala-Bertola^a, Jan Gajdziok^b, Miloslava Rabišková^{b*}, François Bonneaux^a,
Thomas Lecompte^a, Anne Sapin^a and Philippe Maincent^a

^a *Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy,
University Henri Poincaré, Nancy, France*

^b *Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and
Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic*

ABSTRACT

Oral absorption of low molecular weight heparin (LMWH) is limited by its molecular size and negative charge. It has been shown previously that orally administered polymeric nano- or microparticles containing encapsulated LMWH have led to gastrointestinal absorption of heparin in rabbits. Based on these investigations, pellets containing two LMWHs, enoxaparin (MW 4500 Da) or bemiparin (MW 3600 Da), and Eudragit[®]RS30D (ERS) were prepared and evaluated *in vitro*, and *in vivo* on rabbits. Enoxaparin pellets showed fast *in vitro* release in phosphate buffer pH 7.4 and prolonged *in vivo* drug absorption after a single oral dose of 600 anti-Xa IU/ kg of body weight leading to relative bioavailabilities ranging from 9.7 ± 1.9 % to 12.8 ± 2.7 %. Bemiparin included in matrix pellets of ERS and coated with additional coating of ERS showed *in vitro* prolonged release up to 4 hours and *in vivo* anti-Xa activity below the therapeutic minimum value of 0.1 IU/mL. Potential mucoadhesion of Eudragit pellets may explain such results following electrostatic interactions with the negatively charged mucus.

Key words: oral heparin delivery; low molecular weight heparin; pellets; Eudragit[®]RS30D; drug release *in vitro*; anti-Xa activity *in vivo*

* Address correspondence to Miloslava Rabišková, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Science Brno, Palackého 1-3, 61242, BRNO, Czech Republic; Tel: ++42 5 41562860; Fax: ++42 5 49240589; E-mail: rabiskovam@vfu.cz

INTRODUCTION

Heparin is a well known, highly prescribed, anticoagulant antithrombotic agent that was discovered almost a hundred years ago and used in clinical practice for more than 50 years. Unfractionated heparin (UFH) is a complex polysaccharide that reduces the incidence of both deep vein thrombosis and pulmonary embolism dramatically in surgical patients, but its use is associated with an increase in haemorrhagic complications. As a result of these complications and the need to administer low doses two or three times daily to achieve therapeutic efficacy, studies in the late 1970s were undertaken in order to develop safer and more convenient heparin preparations (Lane, MacGregor, VanRoss, Cella & Kakkar, 1979). These studies resulted in the development of low molecular weight heparins (LMWH) which have molecular weight of 5000 Da or less and still contain the specific pentasaccharide sequence necessary for the inhibition of activated Factor X. Their length is however insufficient to inhibit thrombin. Thus the rationale behind their development was that with this greater and more specific ability to inhibit activated Factor X rather than thrombin, the LMWHs would exhibit greater antithrombotic properties, leading to increased clinical efficacy, but with fewer of the anticoagulant properties and bleeding complications associated with thrombin inhibition (Weitz, 1997). In addition LMWHs can be administered once daily and clinical studies showed its improved safety profile in the prevention and treatment of venous thromboembolism when compared to UFH (Kakkar, 2004).

Unfortunately both UFH and LMWH can only be administered parenterally presumably due to large molecule and negative ionic charge (Money & York, 2001). Thus many studies have been done in order to find a delivery system for the oral heparin administration that could decrease healthcare costs and improve patient compliance. They include several strategies such as cell-membrane permeabilization, tight-junction modifications, increase of drug lipophilicity or protection against acidic pH of the stomach (Motlekar & Youan, 2006). Absorption enhancers were one of them. Thanou et al. (Thanou, Verhoef, Nihot, Verheijden & Junginger, 2001) used the Ca^{2+} -chelating ability of a poly(acrylate) derivative Carbopol 934P to interfere with the intercellular junctions and increase the paracellular permeability for heparin. Another strategy to circumvent the barrier function of the gastrointestinal tract is offered by thiol groups of polymeric adjuvants inhibiting protein tyrosine phosphatase

involved in the closing process of tight junctions via a GSH-mediated mechanism (GSH = thiolated polymers in combination with reduced glutathione) (Bernkop-Schnurch, Kast & Guggi, 2003; Schmitz, Leitner & Bernkop-Schnurch, 2005). Absorption-enhancing effects of glycyrrhethinic acid (Motlekar, Srivenugopal, Wachtel & Youan, 2006), L-arginin (Motlekar, Srivenugopal, Wachtel & Youan, 2006) or sodium caprate (Motlekar, Srivenugopal, Wachtel & Youan, 2005) on the intestinal permeability and bioavailability of ardeparin, another LMWH, using rat model and Caco-2 cell culture model were discovered. Some other investigations include chitosan derivatives (Thanou, Henderson, Kydonieus & Elson, 2007), Labrasol (Rama Prasad et al., 2004) or dimethyl sulfoxide and deoxycholic acid conjugates (Kim et al., 2007). Currently, the most effective formulation is the co-administration of heparin with N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate, a carrier molecule that improves the oral absorption of heparin in humans (Berkowitz, Marder, Kosutic & Baughman, 2003).

An oral heparin formulation would alleviate many of the disadvantages of present pharmacotherapy and would offer several other important indications for heparin, representing large market opportunities, e.g. additional cardiovascular indications, inflammatory diseases and cancer (Kakkar, 2004; Lever & Page, 2002).

Previous results obtained with orally administered polymeric nano- or microparticles containing encapsulated UFH or LMWH (Hoffart et al., 2006; Jiao, Ubrich, Hoffart et al., 2002; Jiao, Ubrich, Marchand-Arvier et al., 2002; Lamprecht, Ubrich & Maincent, 2007) have led to the gastrointestinal absorption of heparin in rabbits with doses that were similar to those administered by intravenous infusion or subcutaneous injection in humans. Such results were attributed to the potential mucoadhesive properties of the polycationic Eudragit[®]RS polymer. Since relatively similar results were observed for nano- and microparticles (size ratio 1 to 100), it was thought that particle size was not directly affecting heparin absorption. Therefore a more industrial manufacturing method was selected to potentially further extend the concept to pellets (size ratio 1 to 20 ; microparticles to pellets).

In this experimental work, pellets containing two LMWHs differing in the average molecular weight, i.e. enoxaparin or bemiparin, and Eudragit[®]RS30D (ERS), were prepared using extrusion/spheronization technique and evaluated *in vitro*, and *in vivo* on rabbits. Enoxaparin, with a mean molecular weight of 4500 Da, is derived from UFH by benzylation followed by alkaline depolymerisation. This LMWH presents anti-Xa and anti-IIa activities of 100-110 and 25-30 IU/mL, respectively,

conferring to an anti-Xa/anti-IIa ratio between 3 and 4. Bemiparin is a new second generation LMWH with a mean molecular weight of 3600 Da obtained from medical grade porcine UFH by depolymerisation in non aqueous medium. Its anti-Xa and anti-IIa activities are 80-100 and 5-10 IU/mL, respectively, leading to an anti-Xa/anti-IIa ratio of 8 (Gerotziafas, Petropoulou, Verdy, Samama & Elalamy, 2007).

Heparin in a pellet dosage form, compared to nano- or microparticles, may offer a more convenient and industrialisable way of manufacture leading to an easier scale up process. Furthermore, the utilization of polymeric aqueous dispersions allows avoiding the establishment of toxicological data usually related with the use of organic solvents and obtaining a more safety product for the working staff as well as for patients.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Sodium enoxaparin solution (MW 3500-5500 Da) [Lovenox[®] 10.000 IU anti-Xa/1 mL] marketed by Sanofi-Aventis (Paris, France) with an anti-Xa/anti-IIa ratio between 3 and 4 was obtained from commercial sources. Bemiparin powder (MW 3000-4200 Da) with anti-Xa/anti-IIa ratio of 8 was kindly offered by Rovi Pharmaceutical Laboratories (Madrid, Spain). Avicel[®]PH 101 and Avicel[®]RC 581 microcrystalline celluloses (MCC) and α -lactose monohydrate were used as fillers and were respectively purchased from Asahi Kasei Chemicals Corporation (Tokyo, Japan) and Cerapharm (Vienna, Austria). An aqueous dispersion of ammonio methacrylate copolymer (MW 150,000 Da), Eudragit[®]RS30D (ERS), from Evonik Industries (Essen, Germany) was used as matrix forming and/or coating polymer together with acetyltriethylcitrate (TEC) delivered from Vertellus Performance Materials Inc. (Greensboro, USA) as a plasticizer, silica oxide Syloid 244 FP (Grace GmbH, Worms, Germany) and talc (Jan Kulich, Hradec Králové, Czech Republic) as coating additives. Hydroxypropylmethylcellulose [Methocel E5] purchased from Dow Chemicals Company (Plaquemine, USA) was used as an additional layer on pellet cores prior to the coating. The reagents used for the measurement of the anti-Xa activity were supplied by Diagnostica Stago (Asnières-sur-Seine, France). All other reagents were of analytical grade and used as supplied.

Pellet preparation

Enoxaparin extrudate mass was prepared from homogenized powders, i.e. lactose and MCC (mixer Tefal Kaleo, France) wetted by a mixture of ERS dispersion, TEC, enoxaparin solution and water. For bemiparin extrudates, since bemiparin was obtained as a powder, it was added to the fillers prior to the homogenization and resulting mixture was subsequently wetted by diluted ERS dispersion with TEC to produce approximately 120 g of mass appropriate for extrusion. The amount of added water was carefully controlled as the wetting step is critical for successful pelletization by extrusion/ spheronization technique (Rabišková & Pérez, 2002). Composition of extrudates is presented in Table 1. One screw extruder (Pharmex 35T, Wyss & Probst, Germany) fitted with one axial located die (extrusion perforations 0.6 mm in diameter; thickness of extrusion die 1.0 mm) was used to form extrudates. Wetted mass was fed through the hopper on a rotating screw at standard extruder speed of 110 rpm. Prepared extrudate was subsequently placed into the spheronizer (Pharmex 35T, Wyss & Probst, Germany) with a 23-cm diameter serrated plate. The spheronization lasted 15 min at rotating speed 640 rpm. Formed pellets were dried in a ventilated oven at 40 °C for 48 hrs.

Coating of pellets

Pellets of 0.5-0.8 mm size were charged into the process chamber of a bottom-spray fluid bed unit of Multiprocessor (MP 1, Aeromatic Fielder, Bubendorf, Switzerland) and heated up. When the product temperature reached 45 °C, the layering solution was sprayed onto the pellets with the aid of the 0.8-mm diameter spray nozzle and peristaltic pump using 170 kPa of atomization pressure. The inlet air temperature was 65 °C, product temperature was 45 °C and spray rate was kept at 20 g/min. Pellets were dried at a temperature of 45 °C. First, Methocel layer (6% solution of Methocel E5 in purified water) was applied up to 5 % of the total pellet weight, and then 10% ERS layer was sprayed on isolated pellets. ERS layer was formed from Eudragit RS 30D aqueous dispersion containing 2.7 % of TEC, 4.0 % of Syloid and 0.7 % of talc. Coated pellets were thermally treated in ventilated oven at 40 °C for 24 hrs to complete the coating step (as recommended by the producer).

Pellet evaluation

Pellet fractions of 0.5-0.8 mm and 0.8-1.2 mm were selected using sieves of corresponding apertures (Retsch, AS 200, Germany), and their characteristics, i.e. pellet sphericity, hardness, friability and drug content, were evaluated.

Pellet shape was observed by an optical microscope (DN 45, Lambda, Czech Republic) and CCD camera (Alphaphot, Nikon, Japan) and confirmed by the pellet sphericity S , calculated from the area and the perimeter determined by image analysis (Leco IA, Leco Instruments, St. Joseph, USA) of 500 pellets according to the following formula (Haring, Vetchy, Janovska, Krejcova & Rabiskova, 2008)

$$S = \frac{4\pi \times area}{perimeter^2}$$

Mechanical properties were characterized as pellet friability and hardness. Ten grams of pellets were placed into a stainless steel drum of the abrasion tester adapted for pellet testing (Erweka TAR 10, Ensenstam, Germany), together with 200 pieces of 4-mm glass beads, and rotated for 10 minutes at 20 rpm. The dust was thereafter removed and pellets were reweighed. The friability, i.e. the weight loss after agitation, was expressed as a percentage. Tablet hardness and compression tester fitted with 5-kg load cell (Hardness C5 tester, Engineering System, Nottingham, England) was used for the determination of pellet hardness. Ten randomly selected pellets of each formulation were tested; the hardness mean value and standard deviation were calculated.

LMWH content was performed by adding 30 mg of pellets to 10 ml of distilled water. The amount of LMWH included in pellets was determined by turbidimetric method (Hoffart et al., 2003) by measuring the amount of free LMWH in the aqueous solution recovered after destruction of the pellets in ultrasonic bath (15 min) and centrifugation of the obtained suspension.

Drug content, pellet hardness and friability measurements were carried out in triplicate and the results were expressed as an arithmetic mean $\pm$ standard deviation.

Dissolution studies

LMWH pellets (50 mg) were suspended in 20 mL of phosphate buffer saline (Na_2HPO_4 0.64 %, KH_2PO_4 0.06%, NaCl 0.59 %; pH 7.4). The suspension was incubated in a water bath at 37 °C under magnetic stirring at 200 rpm. At different times (5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 and 240 minutes) samples of 1.5 mL were withdrawn and replaced by 1.5 mL of fresh phosphate saline buffer. Each sample was filtered through Porafil[®] cellulose mixed ester membrane with a pore size of 0.20 μm (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The amount of heparin released from pellets was determined by turbidimetric method (Hoffart et al., 2003). Aliquots of 0.5 mL of filtered samples were added to 0.5 mL of sodium acetate buffer (acetic acid 1.22 %, sodium acetate 10.75 %; pH 4.4) and mixed with 2 mL of 0.1% cetylpyridinium chloride in 0.94% NaCl aqueous solution. Samples were incubated at 37 °C for 1 h and then assayed at 500 nm by UV spectroscopy (Uvikon 922, Kontron, Eching, Germany). All experiments were performed in triplicate.

***In vivo* experiments**

Experiments were carried out according to the French legislation on animal experiments. Pellets were filled into hard gelatine capsules and orally administered to male New-Zealand rabbits (3478 ± 395 g) housed in separate cages, fasted overnight with water ad libidum. The administration was performed by oral gavage at a dose of 600 anti-Xa IU/kg of body weight. Blood samples (1.5 mL) were taken from the marginal ear vein at different times (2, 4, 6, 8, 10 and 24 hours) and then added to a constant volume of sodium citrate 0.129 M (0.17 mL) and centrifuged at 3000 x g for 10 min.

The concentration of LMWH was determined automatically (STA Compact Automate, Diagnostica Stago, France) with a factor Xa chromogenic assay (Stachrom Heparin, Diagnostica Stago) (Teien & Lie, 1977). Each of the LMWH standards and plasma samples (25 μL) were mixed with 50 μL of antithrombin III solution. This solution was mixed with 100 μL of bovine factor Xa and incubated for 90 s at 37 °C. Factor Xa chromogen substrate (100 μL) was then added and incubated at 37 °C. The absorbance was determined at 405 nm every 2 s for 10 to 30 s of incubation. A linear relationship between $\Delta\text{absorbance}/\text{min}$ and the concentration of LMWH in the range

of 0.0 - 0.8 anti-Xa IU/mL was obtained. This assay had a coefficient of variation of < 7 % at a limit of detection of 0.02 anti-Xa IU/mL.

To calculate the relative bioavailability (*F*) of LMWH pellets, the commercial solution of enoxaparin was administered by subcutaneous injection to overnight fasted rabbits at a dose of 300 anti-Xa IU/kg of body weight. The anti-Xa activity of LMWH was measured as described above. After the determination of the area under the curve (*AUC*) of the concentration/ time profile by the linear trapezoidal method, the relative bioavailabilities were calculated by the ratio of the respective *AUC* corrected by the administered doses. All experiments were performed in triplicate.

Statistical analysis

The results were expressed as mean values $\pm$ S.D. For the pairwise comparison the Mann-Whitney test was used to investigate differences statistically. In all cases, $p < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Pellets evaluation

From extrudates of different ERS concentrations (Table 1), pellets of good mechanical properties (Table 2), i.e. hardness from 6.16 ± 2.99 to 8.66 ± 0.32 N and low friability from 0.04 ± 0.04 to 0.33 ± 0.23 %, were prepared (friability value of 1.7 % is considered as a limit, (Vertommen & Kinget, 1997)). It can be observed that pellet hardness increased with increasing concentration of ERS that could be due to its matrix forming properties. The same tendency is apparent within the range of friability values of pellet samples. Higher values were obtained when lower amount of polymer was included in matrix pellet core. Drug content of 83.3 - 96.6 % of the theoretical amount was measured, which is in the range for content uniformity limits. Pellet sphericity within the interval 0.838 ± 0.012 – 0.901 ± 0.040 indicates regular spherical shape of particles (Rodriguez et al., 2001).

TABLE 1 Composition of LMWH extrudates

Sample ¹⁾	Drug ²⁾ (%)	MCC (%)	Lactose (%)	ERS ²⁾ (%)	TEC (%)	Water (%)
ME20	2.5 ³⁾	55.2	21.1	20.8	0.4	70.0
MBe20	3.0	55.2	20.6	20.8	0.4	74.8
MBe5	3.0	55.5	36.1	5.0	0.4	85.2
MBe15	3.0	55.5	26.1	15.0	0.4	73.0
MBe25	3.0	55.5	16.1	25.0	0.4	76.3

¹⁾ M : matrix pellets ; E : enoxaparin ; Be : bemiparin ; 5 ; 15 ; 20 or 25 : percentage of Eudragit®ERS included in pellets.

²⁾ calculated as dry substance.

³⁾ Lovenox® inj., enoxaparin sodium 10,000 IU in 1 mL.

TABLE 2 Characteristics of pellet samples

Sample ¹⁾	Sphericity ²⁾	Hardness ³⁾ (N)	Friability ³⁾ (%)	Drug content (mg.g ⁻¹)	
				Theoretical	Practical ⁴⁾
ME20	0.882±0.029	8.66±0.32	0.07±0.09	25.1	24.7±1.5
MBe20	0.860±0.026	7.51±0.62	0.08±0.06	30.0	28.5±0.1
CBe20	0.901±0.040	ND ⁵⁾	ND	26.0	25.2±0.1
MBe5	0.838±0.012	6.16±2.99	0.33±0.23	30.0	29.0±3.0
MBe15	0.860±0.028	6.49±1.31	0.10±0.11	30.0	25.0±1.0
MBe25	0.856±0.004	7.63±3.85	0.04±0.04	30.0	26.0±3.0

¹⁾ M : matrix pellets ; C : coated pellets ; E : enoxaparin ; Be : bemiparin ; 5 ; 15 ; 20 or 25 : percentage of Eudragit®ERS included in pellets.

²⁾ n=500.

³⁾ n=3.

⁴⁾ n=6.

⁵⁾ ND=Not Determined.

Drug release *in vitro*

Drug dissolution from either uncoated or coated pellets was carried out in phosphate buffer of pH 7.4 and the amount of released drug in predetermined time intervals 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 and 240 minutes was measured using turbidimetric method. Figure 1 shows the dissolution profile of enoxaparin pellets of two different sizes 0.5 - 0.8 mm and 0.8 - 1.2 mm, respectively. Both profiles did not differ significantly, however faster release was observed from smaller pellets. This result could be explained due to larger surface area of the same dose of smaller pellets which ensures faster release of the drug.

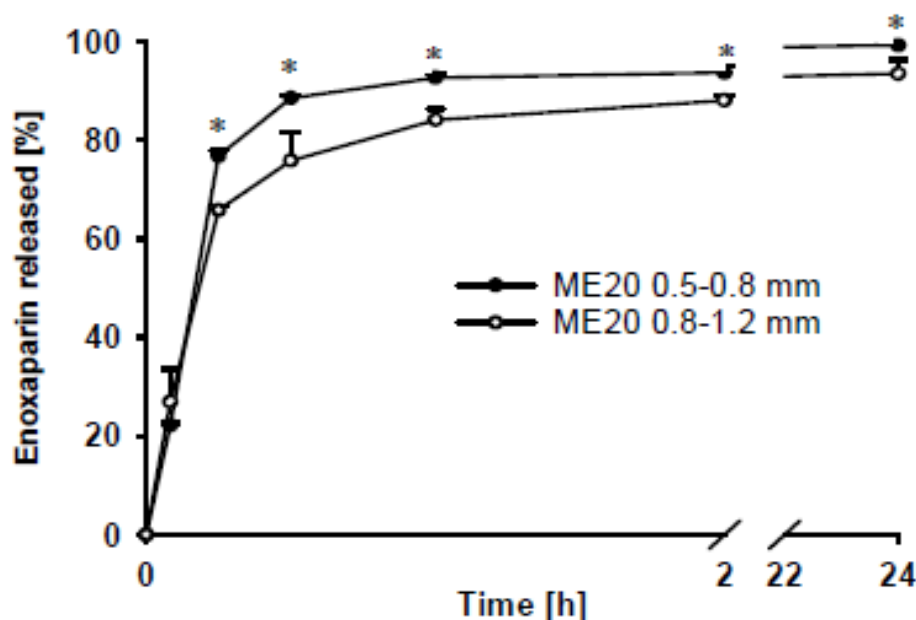


FIGURE 1 Enoxaparin release from matrix pellets of size 0.5 - 0.8 mm and 0.8 - 1.2 mm (phosphate buffer pH 7.4).

Figure 2 compares bemiparin release from matrix pellets without a coating and pellets coated with ERS (10% coating). From this graph it can be seen that bemiparin dissolution from coated pellets was significantly slower with 30 min period of lag time. Coated pellets thus prolonged the drug release *in vitro* up to 4 hours. Bemiparin dissolution from uncoated pellets was fast showing burst effect followed by a plateau.

The majority of bemiparin was released from pellets without a coating within first half an hour.

The amount of bemiparin released from ERS pellets *in vitro* is however dependent on ERS concentration in pellets: the higher is the concentration the lower is the drug release (Figure 3). When 5 % of ERS is included in pellets, bemiparin dissolution is immediate and complete; the entire drug present in pellets is liberated in first five minutes. Pellets containing 15 % of ERS released only 66 ± 3.7 % of the drug included and those with 25 % of ERS only 47.9 ± 3.3 % of bemiparin within 2 hrs. These differences in bemiparin release from pellets could be explained by possible interaction of negatively charged sulphate and carboxyl groups of heparin and positively charged quaternary ammonium groups of ERS that could lead to an incomplete drug release. However, these differences in the release of the active substance may be also concomitantly related with the amount of lactose incorporated in the matrix of the pellets. When the amount of ERS was lower in the composition of the matrix, the amount of lactose was higher. Indeed, a higher amount of lactose in the matrix of the pellets could lead to a faster hydration of the pellets improving its disintegration and the release of the bemiparin. Finally, it has to be noticed that the release of bemiparin from the pellets was lower than the release of enoxaparin. Indeed, for the same percentage of 20 % of ERS included in the pellets formulation, bemiparin pellets exhibited only an *in vitro* release of 70 % of LMWH whereas enoxaparin pellets exhibited a complete release. Due to different molecular weight, the charge density and/or affinity for the Eudragit[®] polymer could explain this lower release of bemiparin.

Based on the obtained results both the ratio of ERS/lactose inside the matrix pellet cores and ERS coating could be used to control heparin release from pellets.

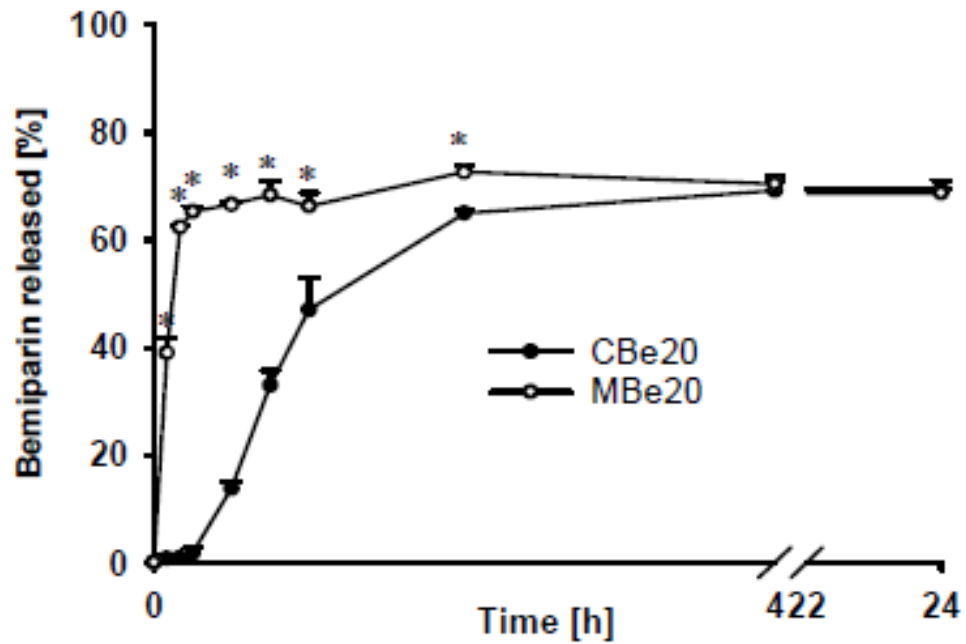


FIGURE 2 Bemiparin release from uncoated MBe20 and coated pellets CBe20 (phosphate buffer pH 7.4; pellet size 0.5 – 0.8 mm).

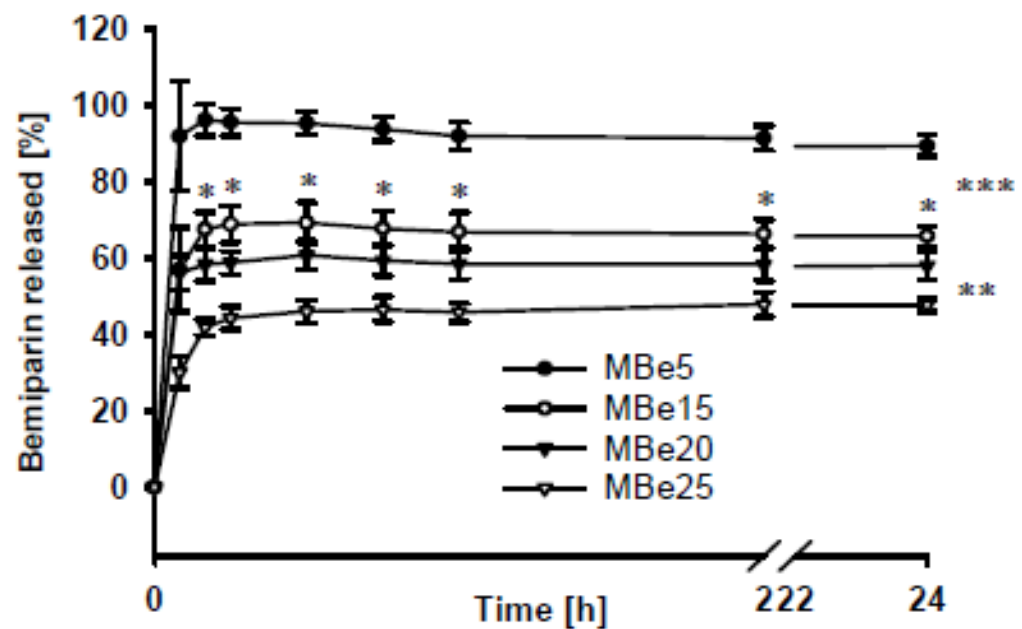


FIGURE 3 Bemiparin release from matrix pellets containing different concentrations of ERS (phosphate buffer pH 7.4; pellet size 0.5 – 0.8 mm).

***In vivo* experiments**

Results obtained *in vivo* are presented in Figure 4 and Table 3. After subcutaneous injection of a single dose of Lovenox[®] solution (300 anti-Xa IU/kg of body weight) to overnight fasted rabbits, peak concentration of 1.59 ± 0.08 IU/ml 1 hour after application was reached. Compared to subcutaneous application lower $C_{\max}$ values and a shift in $T_{\max}$ were observed when pellets (dose of 600 anti-Xa IU/kg of body weight) were administered orally. Anti-Xa activities 0.31 ± 0.06 IU/ml and 0.21 ± 0.04 IU/ml, respectively were determined after 4 hrs from pellet application. Compared to the subcutaneous injection which exhibited a duration of biological activity of 6 hours, anti-Xa activity after pellets administration lasted longer (up to 7 and 8 hours) ; the anti-Xz value was kept above the curative dose of 0.2 anti-Xa IU/ml (Bianchini, Bergonzini, Parma & Osima, 1995) during 6 and 2 hours for ME20 0.5-0.8 mm and ME20 0.8-1.0 mm, respectively. Nevertheless, it has to be kept in mind that the oral dose was 2-fold the subcutaneous injection. This anti-Xa activity may be due to a contact between ERS and mucus resulting from electrostatic interactions between positive charges of ERS and negative charges of mucus especially related to sialic acid residues (Lamprecht, Koenig, Ubrich, Maincent & Neumann, 2006). This interaction may also lead to a local concentration of heparin helping its diffusion and absorption through the mucocellular wall. Heparin is known to be sensitive to acidic stomach conditions (Jandik, Kruep, Cartier & Linhardt, 1996) or enzymatic environment (Ahn et al., 1998), so it is possible that protection inside pellets may still increase the amount of heparin available for absorption through a high local concentration gradient. As presented for polycationic chitosan (Thanou et al., 2007; Thanou, Nihot, Jansen, Verhoef & Junginger, 2001; Thanou, Verhoef & Junginger, 2001), ERS may also interact with the surface of cells and modify the structural organization of the tight junction associated proteins allowing an increased absorption of enoxaparin by paracellular way. Finally, with regards to the disintegration of pellets during the *in vitro* release study, it might be assumed that such phenomenon could happen during the gastrointestinal transport leading to smaller particles with a size much closer to the size of nano- and microparticles favouring their mucoadhesion to the gut wall. Pellets of smaller size, i.e. 0.5 - 0.8 mm in diameter did not show better pharmacokinetic parameters: $AUC_{0 \rightarrow 8}$ (0.56 ± 0.12 IU x h x mL⁻¹ x kg⁻¹) and bioavailability $F = 12.8 \pm 2.7$ % compared to pellets of 0.8 - 1.2 mm having $AUC_{0 \rightarrow 8}$ (0.42 ± 0.08 IU x h x mL⁻¹

$\times \text{kg}^{-1}$) and bioavailability $F = 9.7 \pm 1.9 \%$. This is not very surprising since LMWH release profiles were still fairly similar and *in vivo*, the disintegration of the pellets may lead to similar surface contact area.

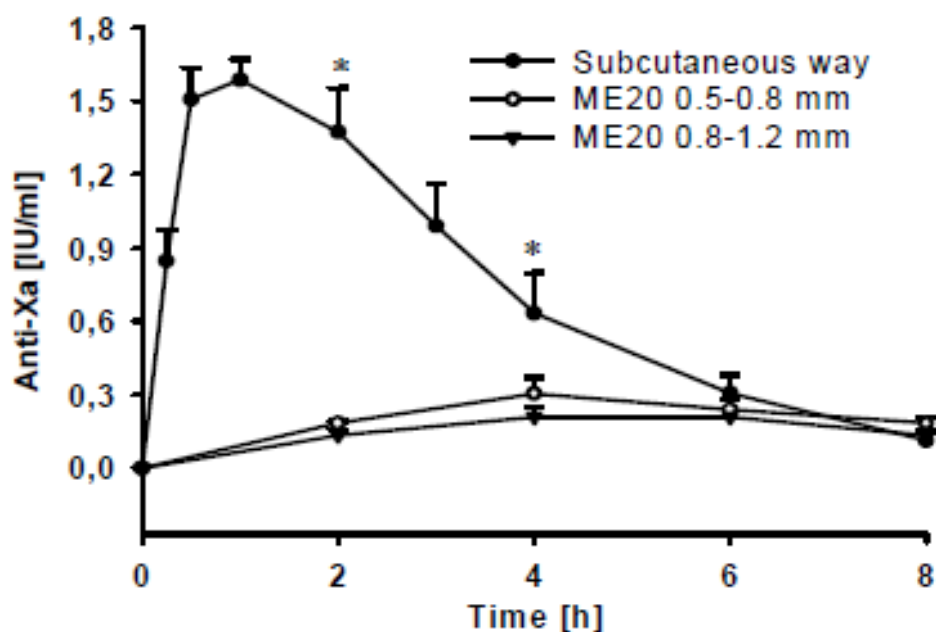


FIGURE 4 Anti-Xa activity of enoxaparin pellets *in vivo*. Comparison of subcutaneous application at a dose of 300 anti-Xa IU/kg and a single oral administration of pellets to rabbits at a dose of 600 anti-Xa IU/kg. Data are mean $\pm$ S.D. (n=3).

TABLE 3 Pharmacokinetic parameters of enoxaparin pellets after a single oral administration to rabbits compared with subcutaneous administration of Lovenox[®] (n=3)

Formulations	$T_{\max}$ (h)	$C_{\max}$ (anti-Xa IU/mL)	$AUC_{0 \rightarrow 8h}$ (IU.h.ml ⁻¹ .kg ⁻¹)	F_{8h} (%)
Enoxaparin solution	1	1.59 $\pm$ 0.08	2.19 $\pm$ 0.14	100
ME20 0.5-0.8 mm	4	0.31 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.12	12.8 $\pm$ 2.7
ME20 0.8-1.2 mm	4	0.21 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.08	9.7 $\pm$ 1.9

The bioavailability figures obtained with the two types of pellets can be compared with our previous results obtained with nano- and microparticles based on Eudragit®RS. The best results were obtained by Hoffart et al. (Hoffart et al., 2006) (absolute bioavailability of 59 %) with the LMWH tinzaparin using Eudragit®RS/poly(ϵ -caprolactone) 50/50 nanoparticles. By using smaller particles of Eudragit®RL/poly(ϵ -caprolactone) 50/50 but with unfractionned heparin, maximum absolute bioavailability of 22 % was reported by Jiao et al. (Jiao, Ubrich, Marchand-Arvier et al., 2002). In another study, Jiao et al. (Jiao, Ubrich, Hoffart et al., 2002) prepared microparticles ranging from 71 to 282 μ m and observed an absolute bioavailability between 4.7 and 48.3 % whereas gelatin microparticles of tinzaparin displayed a relatively low bioavailability (<5%) (Lamprecht et al., 2007). It appears that the increase in bioavailability is more related to the type of heparin than the particles' size. It is difficult to compare our previous results with Eudragit®RS pellets since the size reduction during the gastrointestinal tract transport is not easily measurable. However, it can be assumed that the pellets size reduction, as it is observed in the dissolution tests, leads to much smaller particles which can potentially interact in a closer way with the gastrointestinal membrane, the same way that previous nano- and microparticles do.

Compared to previous studies made with microparticles or nanoparticles (Hoffart et al., 2006; Jiao, Ubrich, Marchand-Arvier et al., 2002), pellets of enoxaparin present a less intense but more sustained anti-Xa activity released profile. This feature can offer together with well established pelletization technique more convenient, industrialisable and robust way of production leading to an easier scale up process.

According to the results obtained for enoxaparin, pellets of smaller size, i.e. 0.5 - 0.8 mm were used for bemiparin administration. During preparation all parameters were kept constant for better comparison of both pellet samples containing different heparins. When compared to enoxaparin pellets, bemiparin particles showed lower activity on the one hand and on the other hand a larger anti-Xa activity, i.e. 24 hrs (Figure 5). Maximum concentration C_{max} was reached faster already 2 hrs after administration and T_{max} was not dependent on the fact if pellets were coated with ERS or not. Anti-Xa activity of both, coated or uncoated pellets was below 0.1 IU/ mL, i.e. below the therapeutic minimum value. Due to its lower molecular weight, bemiparin was expected to exhibit better anti-Xa activity but it was not the case. This lower anti-Xa activity of bemiparin in comparison with enoxaparin could be explained, as shown

in the dissolution studies, by an incomplete release from the pellets which may be related to a difference in charge density and/or in affinity with ERS. Thus, further studies on bemiparin pellets should take into account this phenomenon and the appropriate dose of bemiparin should also be found for optimal biological activity.

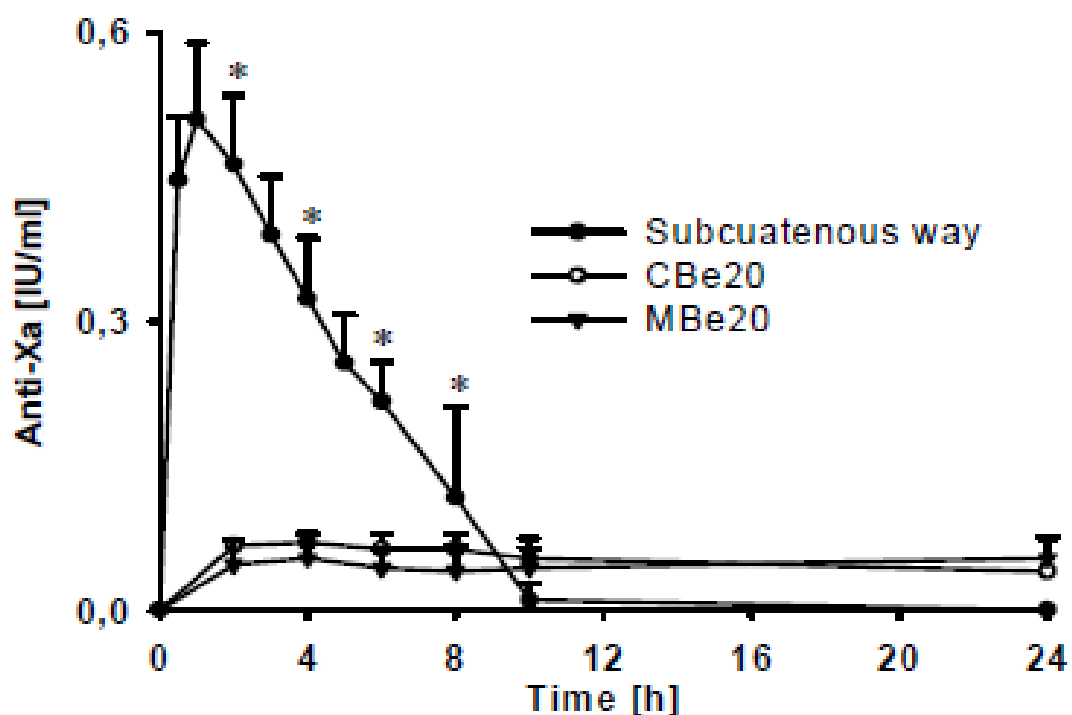


FIGURE 5 Anti-Xa activity of coated and uncoated bemiparin pellets *in vivo*. Comparison of subcutaneous application at a dose of 150 anti-Xa IU/kg and a single oral administration of pellets to rabbits at a dose of 600 anti-Xa IU/kg. Data are mean $\pm$ S.D. (n=3).

CONCLUSION

An oral LMWH formulation would be very useful in the improvement of present heparin therapy: it could reduce inconvenient injections, decrease the health care costs, improve patient compliance and offer several other important indications. Furthermore, as pellets as a dosage form are well established in pharmacotherapy as well as in pharmaceutical industry, they can be easily produced, especially when their manufacture abandons organic solvents. Contrary to most of the studies made on the oral absorption of heparin, our study allowed showing an anti-Xa activity level over the curative dose after oral administration to rabbits probably related with the mucoadhesive properties of Eudragit[®]RS. If the pellets size did not seem to be a critical parameter for the absorption of LMWH through the gut wall, various factors have to be considered as the LMWH used and polycationic nature of the polymer.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Rovi Pharmaceutical Laboratories (Madrid, Spain) for supplying the gift samples of bemiparin.

REFERENCES

- Ahn M. Y., Shin K. H., Kim D. H., Jung E. A., Toida T., Linhardt R. J. & Kim Y. S. (1998). Characterization of a *Bacteroides* species from human intestine that degrades glycosaminoglycans. *Can J Microbiol*, 44, 423-429.
- Berkowitz S. D., Marder V. J., Kosutic G. & Baughman R. A. (2003). Oral heparin administration with a novel drug delivery agent (SNAC) in healthy volunteers and patients undergoing elective total hip arthroplasty. *J Thromb Haemost*, 1, 1914-1919.
- Bernkop-Schnurch A., Kast C. E. & Guggi D. (2003). Permeation enhancing polymers in oral delivery of hydrophilic macromolecules: thiomers/GSH systems. *J Control Release*, 93, 95-103.
- Bianchini P., Bergonzini G. L., Parma B. & Osima B. (1995). Relationship between plasma antifactor Xa activity and the antithrombotic activity of heparins of different molecular mass. *Haemostasis*, 25, 288-298.
- Gerotziafas G. T., Petropoulou A. D., Verdy E., Samama M. M. & Elalamy I. (2007). Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. *J Thromb Haemost*, 5, 955-962.
- Haring A., Vetchy D., Janovska L., Krejcova K. & Rabiskova M. (2008). Differences in characteristics of pellets prepared by different pelletization methods. *Drug Dev Ind Pharm*, 34, 289-296.
- Hoffart V., Lamprecht A., Maincent P., Lecompte T., Vigneron C. & Ubrich N. (2006). Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *J Control Release*, 113, 38-42.

- Hoffart V., Ubrich N., Lamprecht A., Bachelier K., Vigneron C., Lecompte T., Hoffman M. & Maincent P. (2003). Microencapsulation of Low Molecular Weight Heparin into Polymeric Particles Designed with Biodegradable and Nonbiodegradable Polycationic Polymers. *Drug Deliv*, 10, 1 - 7.
- Jandik K. A., Kruep D., Cartier M. & Linhardt R. J. (1996). Accelerated stability studies of heparin. *J Pharm Sci*, 85, 45-51.
- Jiao Y., Ubrich N., Hoffart V., Marchand-Arvier M., Vigneron C., Hoffman M. & Maincent P. (2002). Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. *J Pharm Sci*, 91, 760-768.
- Jiao Y., Ubrich N., Marchand-Arvier M., Vigneron C., Hoffman M., Lecompte T. & Maincent P. (2002). In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. *Circulation*, 105, 230-235.
- Kakkar A. K. (2004). Low- and ultra-low-molecular-weight heparins. *Best Pract Res Clin Haematol*, 17, 77-87.
- Kim S. K., Lee D. Y., Lee E., Lee Y. K., Kim C. Y., Moon H. T. & Byun Y. (2007). Absorption study of deoxycholic acid-heparin conjugate as a new form of oral anti-coagulant. *J Control Release*, 120, 4-10.
- Lamprecht A., Koenig P., Ubrich N., Maincent P. & Neumann D. (2006). Low molecular weight heparin nanoparticles: mucoadhesion and behaviour in Caco-2 cells. *Nanotechnology*, 17, 3673-3680.
- Lamprecht A., Ubrich N. & Maincent P. (2007). Oral low molecular weight heparin delivery by microparticles from complex coacervation. *Eur J Pharm Biopharm*, 67, 632-638.

- Lane D. A., MacGregor I. R., VanRoss M., Cella G. & Kakkar V. V. (1979). Molecular weight dependence of the anticoagulant properties of heparin: intravenous and subcutaneous administration of fractionated heparins to man. *Thromb Res*, 16, 651-662.
- Lever R. & Page C. P. (2002). Novel drug development opportunities for heparin. *Nat Rev Drug Discov*, 1, 140-148.
- Money S. R. & York J. W. (2001). Development of oral heparin therapy for prophylaxis and treatment of deep venous thrombosis. *Cardiovasc Surg*, 9, 211-218.
- Motlekar N. A., Srivenugopal K. S., Wachtel M. S. & Youan B. B. (2005). Oral delivery of low-molecular-weight heparin using sodium caprate as absorption enhancer reaches therapeutic levels. *J Drug Target*, 13, 573-583.
- Motlekar N. A., Srivenugopal K. S., Wachtel M. S. & Youan B. B. (2006). Evaluation of the Oral Bioavailability of Low Molecular Weight Heparin Formulated With Glycyrrhetic Acid as Permeation Enhancer. *Drug Dev Res*, 67, 166-174.
- Motlekar N. A., Srivenugopal K. S., Wachtel M. S. & Youan B. B. (2006). Modulation of gastrointestinal permeability of low-molecular-weight heparin by L-arginine: in-vivo and in-vitro evaluation. *J Pharm Pharmacol*, 58, 591-598.
- Motlekar N. A. & Youan B. B. (2006). The quest for non-invasive delivery of bioactive macromolecules: a focus on heparins. *J Control Release*, 113, 91-101.
- Rama Prasad Y. V., Minamimoto T., Yoshikawa Y., Shibata N., Mori S., Matsuura A. & Takada K. (2004). In situ intestinal absorption studies on low molecular weight heparin in rats using labrasol as absorption enhancer. *Int J Pharm*, 271, 225-232.

- Rodriguez E. C., Torrado J. J., Nikolakakis I., Torrado S., Lastres J. L. & Malamataris S. (2001). Micromeritic and packing properties of diclofenac pellets and effects of some formulation variables. *Drug Dev Ind Pharm*, 27, 847-855.
- Schmitz T., Leitner V. M. & Bernkop-Schnurch A. (2005). Oral heparin delivery: design and in vivo evaluation of a stomach-targeted mucoadhesive delivery system. *J Pharm Sci*, 94, 966-973.
- Teien A. N. & Lie M. (1977). Evaluation of an amidolytic heparin assay method: Increased sensitivity by adding purified antithrombin III. *Thromb Res*, 10, 399-410.
- Thanou M., Henderson S., Kydonieus A. & Elson C. (2007). N-sulfonato-N,O-carboxymethylchitosan: a novel polymeric absorption enhancer for the oral delivery of macromolecules. *J Control Release*, 117, 171-178.
- Thanou M., Nihot M. T., Jansen M., Verhoef J. C. & Junginger H. E. (2001). Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo. *J Pharm Sci*, 90, 38-46.
- Thanou M., Verhoef J. C. & Junginger H. E. (2001). Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliv Rev*, 52, 117-126.
- Thanou M., Verhoef J. C., Nihot M. T., Verheijden J. H. & Junginger H. E. (2001). Enhancement of the intestinal absorption of low molecular weight heparin (LMWH) in rats and pigs using Carbopol 934P. *Pharm Res*, 18, 1638-1641.
- Vertommen J. & Kinget R. (1997). The Influence of Five Selected Processing and Formulation Variables on the Particle Size, Particle Size Distribution, and Friability of Pellets Produced in a Rotary Processor. *Drug Dev Ind Pharm*, 23, 39-46.

Weitz J. I. (1997). Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med*, 337, 688-698.

ARTICLE 3

Enhancement of warfarin bioavailability by microencapsulation

Article en cours de soumission à

International Journal of Pharmaceutics

Article 3 : La microencapsulation pour l'amélioration de la biodisponibilité de la warfarine.

La maladie thromboembolique veineuse est la quatrième cause de mortalité dans les pays occidentaux et la troisième étiologie responsable de mortalité cardiovasculaire après l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux. Malgré le développement de nouveaux anticoagulants oraux, les antagonistes de la vitamine K demeurent les piliers du traitement thromboprophylaxique. Cependant, ces molécules présentent des inconvénients qui limitent leur utilisation telles que de nombreuses interactions (alimentation médicaments), une marge thérapeutique étroite ou un risque iatrogène très important nécessitant une surveillance biologique étroite de l'INR. Si de nombreuses études ont pu être menées afin de surmonter l'obstacle majeur des héparines qui est leur administration uniquement par voie parentérale, très peu de travaux relatifs à l'amélioration des formes de warfarine existantes ont été rapportés. Ainsi, nous avons tenté, dans cette étude, de mettre au point une forme à libération prolongée de warfarine. Pour ce faire, nous avons fabriqué des microparticules de warfarine en faisant appel à un polymère biodégradable, la poly- ϵ -caprolactone. Après caractérisation, ces microparticules furent testées *in vitro* dans un milieu tampon phosphate et la quantité de warfarine libérée fut de l'ordre de 60 %. Après administration par voie sous-cutanée de warfarine poudre sous forme de solution, de suspension et sous forme de microparticules, les concentrations plasmatiques maximales respectives furent de 1,44 ; 0,20 et 1,17 $\mu\text{g/ml}$ obtenues respectivement à 0,75 ; 3 et 1,5 heures. Les valeurs maximales d'activité biologique mesurées en rapport international normalisé et obtenues à 24, 24 et 34 heures pour la warfarine poudre en solution, en suspension et sous forme de microparticules furent respectivement de 2,50 ; 1,77 et 2,31.

Enhancement of warfarin bioavailability by microencapsulation

J. Scala-Bertola^a, L. Javot^a, J. Camargo^a, F.Bonneaux^a, A.Sapin^a, T.Lecompte^b,
P.Maincent^{a,*}

^a Nancy-Université, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Pharmaceutical Technology, 5 rue A.Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France.

^b CHU de Nancy, Nancy-Université, INSERM U 961, Fédération de Recherche "Bioingénierie moléculaire, cellulaire et thérapeutique", Nancy, France.

Abstract

Venous thromboembolic disease is the fourth leading cause of death in the western countries and the third leading cause of cardiovascular mortality after myocardial infarction and stroke. Despite the development of new oral anticoagulants, low molecular weight heparins and vitamin K antagonists remain the mainstays of venous thromboprophylaxis. However, both of these molecules present several limits for their optimal utilization. To overcome these drawbacks, many studies were conducted to develop oral dosage forms of heparin. On the contrary, only few studies were carried out to improving warfarin dosage forms. In this study, we attempted to prepare microparticles of warfarin using poly-ε-caprolactone as a biodegradable polymer. After their characterization, microparticles were tested *in vitro* and then, subcutaneously administered to rabbits. The warfarin response was monitored according to plasmatic concentration and INR dosing and the enhancement of bioavailability determined.

Keywords: warfarin delivery ; microparticles ; polycaprolactone ; drug release ; INR monitoring ; bioavailability.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 22 96; fax: +33 3 83 68 23 01.

E-mail address: philippe.maincent@pharma.uhp-nancy.fr

Introduction

Since the discovery of dicoumarol in 1939 [1], vitamine K antagonists are the mainstay of the anticoagulation therapy. Warfarin is the most commonly used vitamin K antagonist and produces its anticoagulant effect by interfering with vitamin K which is a cofactor for gamma-carboxylation of glutamic acid residues in clotting factor proteins II, VII, IX, X, and the endogenous anticoagulant proteins C, S, and Z [2]. However, the use of warfarin is limited by several drawbacks such as delayed onset and offset of action, narrow therapeutic index, interindividual variability in dose response requiring frequent international normalized ratio (INR) monitoring or multiple food and drug interactions [3]. These limitations have resulted in efforts to develop new anticoagulant strategies targeting factor Xa or factor IIa [4]. Despite the advantages exhibited by novel oral anticoagulants (direct inhibitors of factors IIa or Xa) such as rapid onset of action, wide therapeutic index and more predictable pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles, these molecules present no specific antidote for immediate reversal of the anticoagulant effect, no improvement of the patients compliance (daily dose), no appropriate coagulation monitoring if needed (patients with hepatic or renal impairment), and high cost [5, 6]. Thus an optimized use of warfarin including self monitoring of INR values, pharmacogenetic algorithms to estimate warfarin dosing or patients genotyping for single nucleotide polymorphisms [2, 7-9] would improve warfarin therapy and provide a convenient and affordable approach in the long-term outpatient management of thrombotic disorders [10]. In addition, the improvement of patient adherence to their anticoagulation therapy is another point of importance for a safer use of warfarin. Indeed, the IN-RANGE study has shown that 35 % of patients had clinically significant levels of poor adherence (> 20% of missed doses of warfarin) related to a 2-fold increase in the odds of underanticoagulation [11] and also that the adherence to the therapy declines significantly in the first several months of the therapy [12]. Currently, this improvement of adherence could be realized by a better education and training of the patient but also by a greater implication of clinicians who could continue to emphasize strict adherence throughout the course of therapy. To improve the compliance of the anticoagulation therapy, the development of a prolonged release system could be an interesting option but also an interesting pharmaceutical technology challenge. To the best of our knowledge, only two controlled release systems of warfarin were studied :

warfarin implant compressed in a hydroxyapatite ceramic shell [13] and warfarin conjugate with poly(ethylene glycol) administered by oral route [14].

In this study, we prepared microparticles of warfarin by the simple emulsion technique. Microparticles were manufactured with poly- ϵ -caprolactone, a suitable biodegradable polymer used for long term drug delivery. After the characterization of microparticles in terms of size, entrapment efficiency, water content and thermal behaviour, the *in vitro* release of warfarin was performed. Finally, warfarin microparticles were subcutaneously injected to rabbits and pharmacokinetic parameters were determined from plasma concentrations as well as from international normalized ratio over time.

Materials

Warfarin base (MW 308.34 Da), Naproxen sodium salt (MW 252.20 Da), Polycaprolactone (PCL, MW 40,000 Da) and Polyvinyl alcohol (PVA, MW 30-70,000 Da, 88 % hydrolyzed) were purchased from Sigma (Steinheim, Germany). All other reagents were of analytical grade and used as supplied.

Methods

Microparticles Preparation

The preparation of PCL microparticles was carried out by the simple emulsion technique [15] : 50 mg of warfarin base and 250 mg of PCL 40 000 were first dissolved in 10 ml of methylene chloride by vigorous magnetic stirring for 5 min. The mixture was thereafter poured into 1000 ml of a 0.1 % PVA aqueous solution acidified at pH 1.0 with a solution of HCl 5N. A oil-in-water (o/w) emulsion was formed by extensive stirring (1600 rpm) with a three-bladed propeller for 2 h at room temperature until the organic solvent was totally removed. Upon solvent extraction/evaporation, the polymer precipitated and the microparticle cores solidified. Microparticles were then collected by filtration, washed extensively with deionized water, and dried at room temperature. Drug-free microparticles were prepared in the same way.

The preparation of PCL/PVP microparticles was carried out by the same method as previously described. However, 50 mg of PVP were added in the drug organic phase. Drug-free PCL/PVP microparticles were prepared in the same way.

Warfarin encapsulation efficiency

The encapsulated warfarin amount within polymeric microparticles was determined after extraction. Briefly, 10 mg of microparticles were accurately weighed and vortex-mixed for 1 min with 0.1 ml of methylene chloride. Then, 10 ml of methanol were added and vortexed for 5 min. After 15 min of centrifugation at 4,000 rpm aimed at separating the organic and the hydrophilic phase, 50 μ l of the supernatant (i.e. methanol) was injected in the HPLC system (Model Shimadzu HPLC 10A VP, Shimadzu, Japan) with UV detection (SPD-10 A VP, Shimadzu, Japan). Separation was performed on a reverse phase C18 column (Uptisphere ODB, 5 μ m particle size, 250 x 4.6 mm, Interchim, France) and peaks were detected by UV detection (SD-10AVP, Shimadzu, Japan) at 308 nm. The column temperature was maintained at 35°C. The mobile phase composed of methanol and ammonium acetate (50 mmol/l ; pH 3.74) (67:33 v/v %) was applied at a flow rate of 1.2 ml/min. The warfarin calibration curve was linear from 50 to 150 μ g/ml ($r^2 = 0.999$). The drug entrapment efficiency was expressed as the percentage of warfarin entrapped with respect to the theoretical value, whereas the drug loading was presented as the amount of warfarin entrapped per g of polymer.

Size Distribution and Morphology Analysis

The particle size analysis of all microparticles batches was carried out by laser light diffraction (Mastersizer S, Malvern Instruments, France). The microparticles were dispersed in 2ml of an aqueous solution of Tween 80 (1%).

The external morphology of microparticles were analysed by scanning electron microscopy (Quanta 600 Feg, FEI Company, Lyon, France) using an Everhart-Thornley detector at 5 kV under vacuum conditions.

Water content measurement

The water content measurement of the microparticles was determined by Karl Fisher titration (756 KF Coulometer, Metrohm SA, Switzerland). The test was performed by adding 10 mg of microparticles to 50 ml of Hydranal[®]-Coulomat AG and 50 ml of N,N-Dimethylformamide into a titration cell without diaphragm. Each sample was made in triplicate.

Differential scanning calorimetry analysis

The thermal properties of microparticles were determined by differential scanning calorimetry (DSC) measurements (Q10 DSC, TA Instruments, France). The instrument was calibrated using indium as the standard. Samples of 5 mg were heated in sealed aluminum pans from -60 to 200°C at a scanning rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ under nitrogen purge, with an empty aluminum pan as reference.

In vitro drug release

The in vitro release study was performed in sink conditions. These conditions were established after the determination of the solubility of an excess amount of warfarin in phosphate buffer at room temperature after 3 days of stirring.

Fifty milligrams of warfarin-loaded or unloaded microparticles were suspended in 40 ml of saline phosphate buffer (Na_2HPO_4 0.64 %, KH_2PO_4 0.06%, NaCl 0,59 % ; pH 7.4). The suspension of microparticles was gently stirred (200 rpm) at 37°C into a water bath. At different times (5, 10, 15, 30, 45 minutes, 1, 2, 4, 6, 24 and 72 hours), 1.5 ml of suspension was withdrawn and filtered with a $0,22\text{ }\mu\text{m}$ Millipore[®] filter. The filtrate was assayed for warfarin and replaced by 1.5 ml of fresh buffer. The amount of warfarin in the release medium was determined by spectrophotometric method as described previously. All experiments were performed in triplicate.

In vivo experiments

Experiments were carried out in compliance with the French legislation on the animal experiments.

The in vivo study was performed on three groups of six rabbits fasted during a period of 12 hours. All the rabbits were subcutaneously administered at a dose 0.6 mg/kg of body weight. The first group of rabbits (3.29 ± 0.35 kg) was dosed with a solution of warfarin prepared by dissolving warfarin powder (2.5 mg/ml) in PBS pH 7.4 and 10 % v/v ethanol. The second group of rabbits (3.83 ± 0.49 kg) was dosed with a suspension of warfarin prepared by suspending warfarin powder in a solution of NaCl 0.9 % w/v (5.0 mg/ml) just before administration. Finally, after their suspension in a solution of NaCl 0.9 % w/v (50.0 mg/ml), microparticles of warfarin were administered in the last group of rabbits (3.81 ± 0.47 kg). Blank microparticles as well as vehicles used in warfarin solution and suspension were also administered *in vivo* to check their potential interference with the analytical assay.

Blood samples of 1.5 ml were collected from the marginal ear vein at different times and then added to a constant volume of sodium citrate 0.129 M (0.17 ml). The plasma was separated by centrifugation at 4,000 rpm for 10 min and stored at -20°C before being analysed.

Warfarin concentrations were determined by HPLC method. Briefly, to 200 µl of plasma in a capped test tube containing 100 µl of distilled water and 40 µl of naproxen sodium as internal standard (0.5 mg/ml) were added 100 µl of HCl 1M and 2 ml of diethyl oxyde. After vortexing for 60 s, the samples were centrifuged for 10 min at 4,000 rpm. The organic layer (1.5 ml) was transferred into a glass tube, and evaporated in a water bath at 40°C. The residue was reconstituted with 100 µl of the mobile phase composed of methanol and ammonium acetate buffer (50 mmol/l ; pH 3.74) (67:33 v/v %). 50 µl of the solution were injected in the HPLC system (Model Shimadzu HPLC 10A VP, Shimadzu, Japan). Separation was performed as described above. The warfarin calibration curve was linear from 0.05 to 2.50 µg/ml ($r^2 = 0.996$).

The biological activity of warfarin was determined automatically (STA Compact Automate, Diagnostica Stago, France) by monitoring the prothrombin time (PT). Each control and samples (50 µl) were mixed with 100 µl of thromboplastin (Neoplastine[®] CI 5, Diagnostica Stago, France) with an ISI value of 1.71. From the values of prothrombin times, international normalized ratios (INR) - defined as the ratio of patient's PT to that of the standard PT raised to the international sensitivity index (ISI) power of the thromboplastin used - were determined. Blank plasmas of six rabbits were measured to determine the standard PT.

Results and Discussion

Microparticles characterization

Unloaded microparticles of warfarin prepared by the o/w method exhibited particle size ranging from 54±1 to 80±8 µm (Table 1). The smallest unloaded particles were obtained with addition of 50 mg of PVP in microparticles formulation (54±1 µm). The presence of PVP in unloaded microparticles allowed decreasing their size probably due to the additive emulsion stabiliser role of PVP and to a slight increase of the viscosity. All particles loaded with warfarin presented similar sizes ranging from 70±6 to 72±1 µm. All particles presented size below 100 µm which is a maximum size not to cause discomfort in administration and use.

Table 1: Characteristics of warfarin microparticles. Data are expressed as mean±SD. (n=3)

Warfarin Microparticles					
Formulations		Mean diameter (μm)	Encapsulation efficiency (%)	Water content (%)	Warfarin released at 72 hours ($\mu\text{g/mL}$)
Unloaded	PCL	80 ± 8	-	-	-
	PCL/PVP 50	54 ± 1	-	-	-
	PCL/PVP 100	65 ± 5	-	-	-
Loaded	PCL	70 ± 6	47.4 ± 2.2	0.59 ± 0.26	61.7 ± 4.2
	PCL/PVP 50	72 ± 1	37.4 ± 0.9	1.74 ± 0.01	80.0 ± 3.4
	PCL/PVP 100	64 ± 1	43.5 ± 4.6	-	71.8 ± 2.9

The scanning electron microscopy analysis showed a very heterogeneous population of microparticles in term of size. Even if some microparticles exhibited smooth surface, most of the microparticles presented rough surface (figure 1).

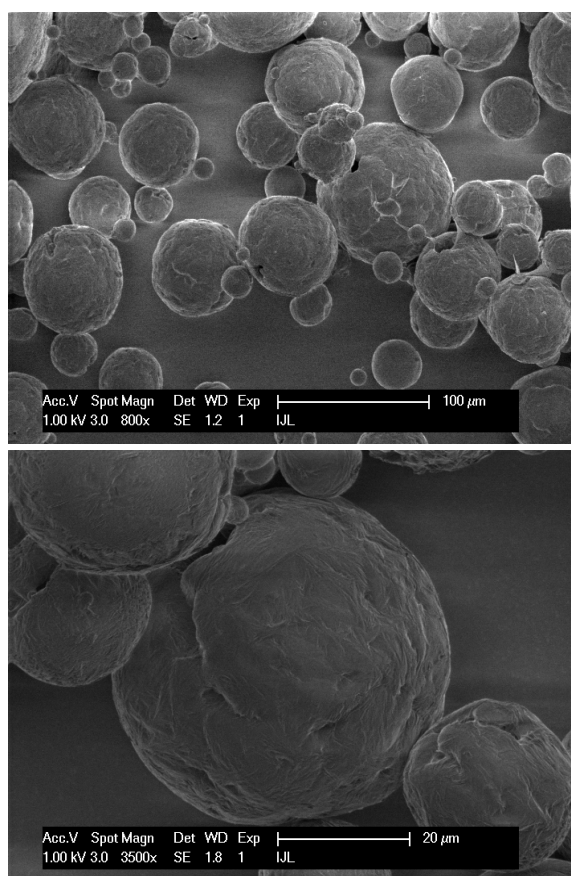


Figure 1: Photographs of warfarin microparticles analysed by scanning electron microscopy.

Encapsulation efficiencies of warfarin were low and ranged from 37.4 ± 0.9 to 47.4 ± 2.2 % (Table 1). Microparticles including PVP in their formulations showed even lower encapsulation efficiency. This result could be explained by a slightly improvement of warfarin solubility by PVP leading to a larger warfarin loss from the organic to the aqueous phase during the preparation. These low values of encapsulation efficiencies were unexpected since warfarin is practically insoluble in the aqueous phase (PVA 0.1%) and a very low pH value was used to limit the diffusional loss of the drug in the continuous phase. However, Wang et al. [16] used p-nitroaniline as a poorly water soluble drug model and showed encapsulation efficiencies in PCL microparticles ranging from 44.0 to 99.0 % for various compositions. Thus, further optimizations could still improve the encapsulation efficiency of warfarin into microparticles by increasing the surfactant concentration or the viscosity of the dispersed phase or by modifying warfarin/PCL ratios.

Water content of PCL microparticles was 0.59 ± 0.26 %_{w/w} whereas it was 1.74 ± 0.01 %_{w/w} for PCL/PVP microparticles. A similar result was reported by Raguime et al. [17] in cellulose acetate and PVP blend membranes. It was seen that the water content of the membranes increased with the increase in the PVP concentration. As the water content actually represents the fraction of water molecules occupied in the pores of the membrane, the use of a pore former such as PVP allowed to increase the porosity of the membranes leading to an increase of water content. Thus, such phenomenon could also be expected in the case of microparticles.

After differential scanning calorimetry analysis, PCL polymer exhibited the usual glass transition temperature of -64.7°C and a melting temperature of 60.3°C whereas warfarin powder exhibited a melting temperature of 165.9°C (Table 2). The DSC results concerning unloaded microparticles confirmed that there were no major changes either in melting or glass transition temperatures. On the thermogram of drug-loaded microparticles prepared by the o/w-method, the glass transition and the melting temperatures of PCL were observed whereas no peak of warfarin was detected. This result can be explained by the presence of warfarin in the matrix of microparticles under an amorphous form after reprecipitation from the organic solvent.

Table 2: Thermal properties of warfarin, PCL and microparticles measured by differential scanning calorimetry.

	Compound	Tg (°C)	Tm (°C)
Powder	Warfarin	-	165.9
	PCL	-64.7	60.3
Unloaded Microparticles	PCL	-61.4	60.7
Loaded Microparticles	Warfarin	-	-
	PCL	-52.6	58.6

In vitro drug release

The release profiles of warfarin from microparticles in pH 7.4 phosphate buffer are shown in figure 2. All microparticles exhibited the same release profile characterized by an initial burst stage during which warfarin was rapidly released over half an hour followed by a plateau characterized by a very slow and incomplete release. At the initial stage, the burst effect was probably related to the drug entrapped near the surface of the microparticles whereas at the later stage, the drug was released more slowly, whose rate is determined by the diffusion of the drug through the amorphous region of polymer matrix [18]. The amount of released warfarin presented in Table 1, was significantly different between the various formulations. Indeed, the amount of released active substance at 72 hours was 61.7 ± 4.2 and 80.0 ± 3.4 % for PCL microparticles and PCL/PVP microparticles, respectively. The release rate observed with PCL microparticles was in agreement with previous findings [16, 19-21].

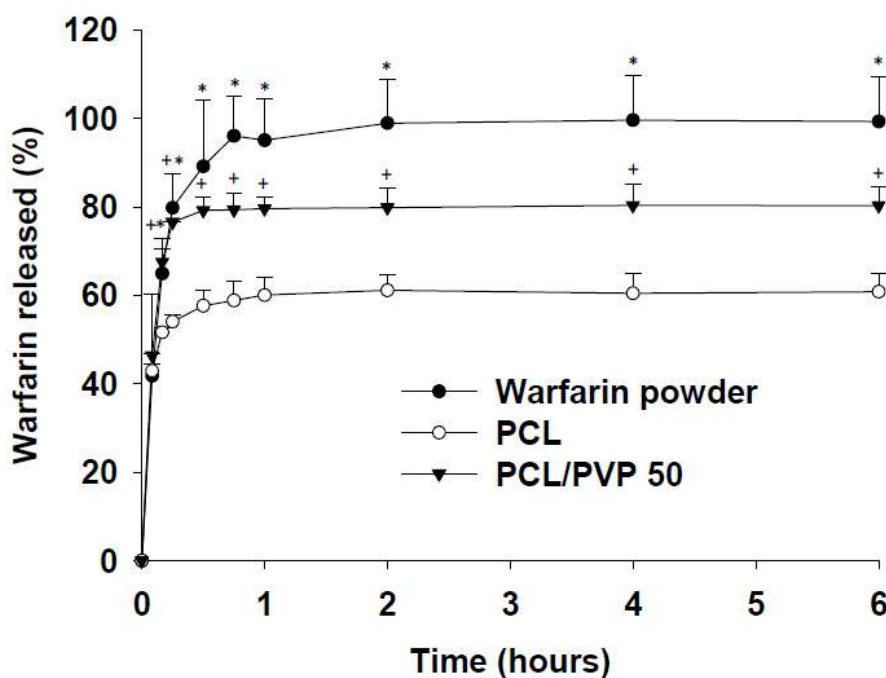


Figure 2: Release profile of warfarin from microparticles. Experiments were performed in phosphate buffer saline at 37°C and pH 7.4 under 200 rpm stirring. Data are shown as mean±S.D. (n=3).

*, + : statistically different compared to PCL microparticles ($p < 0.05$).

This difference in release did not seem to be related to a difference of specific surface area since the PCL or PCL/PVP microparticles size was the same. Thus, it could be inferred that this result may be due to different structures between these two kinds of particles, thus highlighting the role played by PVP in the increase of warfarin release. Indeed, several authors reported the role of PVP as pore former in polymeric membranes or in solid drug delivery systems. Raguime et al. reported the role of pore former of PVP in cellulose acetate membranes [17] and showed that the increase of the pore size as well as the porosity were related to the increase of PVP content. Similar results were also found in Eudragit® NE30 D and Eudragit® L30 D-55 film [22]. Chakrabarty et al. showed that the pore number and pore area of polysulfone membranes increased with molecular weight of PVP [23]. This increase of porosity was also reported by other authors [24, 25] in hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate microcapsules or in poly(methylmethacrylate) microspheres. On the other hand, Raguime et al. [17] reported the increase of water content of cellulose

acetate/PVP membranes with the increase of PVP content. The same trend was observed in this work and the difference in water contents between PCL and PCL/PVP microparticles was close to 3-fold leading to the increase of the volume of diffusion and drug mobility. Finally, the possible role of PVP in the improvement of warfarin solubility in the dissolution medium has to be noticed. Some authors reported the dissolution improvement of fairly and poorly soluble drugs as atenolol [26] acetaminophen [27] or celecoxib [28] due to different interactions with PVP such as hydrogen bonds, hydrophobic interaction or van der Waals interaction leading to an enhanced stability of the drug amorphous form. The influence of PVP content and molecular weight on warfarin release from the microparticles could be an interesting way of research for further investigations.

In vivo experiments

After the administration to rabbits of blank microparticles or vehicles used in solution or suspension, no interference was observed with the assay methods. The standard PT value determined in blank plasmas was 7.0 ± 0.4 seconds.

According to *in vitro* dissolution profiles, only PCL microparticles, which exhibited the lowest amount of released warfarin in *in vitro* assays, were chosen to be tested in animals. The plasmatic concentrations as well as biological activities of warfarin solution, suspension or microparticles are presented in Figure 3. Warfarin suspension showed a constant plasmatic concentration close to $0.20 \mu\text{g/ml}$ till 34 hours. Warfarin microparticles almost exhibited the same release profile than warfarin solution after a single subcutaneous injection for the first 24 hours which is an initial and important increase from 0 to 1 hour followed by a rapid decrease until 24 hours. From 24 to 72 hours, warfarin microparticles showed a constant release of warfarin leading to a plasmatic concentration of around $0.16 \mu\text{g/ml}$ whereas warfarin slightly decreased and was not detected at 72 hours after the administration of the solution. The maximal plasmatic concentrations were 1.44 ± 0.20 , 0.20 ± 0.03 and $1.17 \pm 0.50 \mu\text{g/ml}$ for solution, suspension and microparticles, respectively (Table 3) and were reached at 0.75 h for warfarin solution and at 3 h and 1.5 h for warfarin suspension and microparticles, respectively.

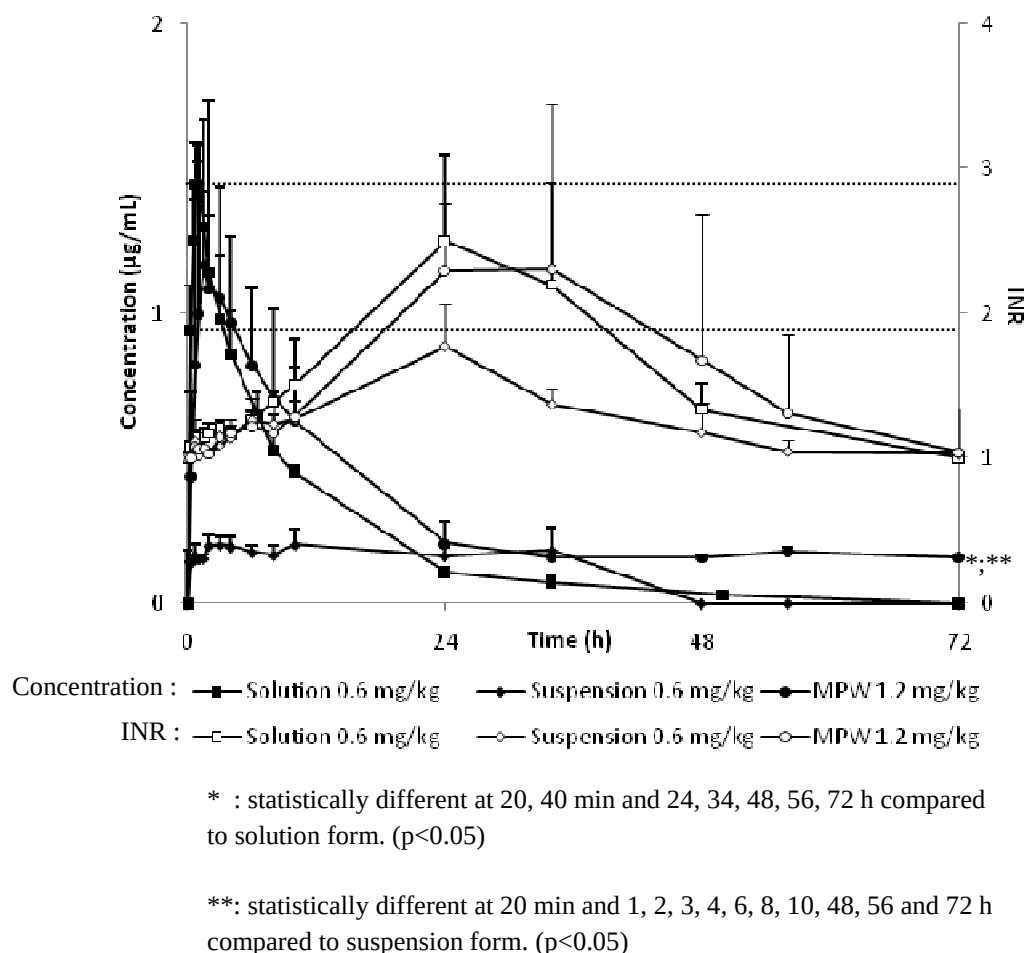


Figure 3: Plasmatic concentrations and INR after subcutaneous administration of warfarin in solution, suspension and microparticles to rabbits. Data are shown as mean±S.D. (n=3).

As it is classical for this molecule, biological activity was detected later. Indeed, the maximal biological activities were reached at 24 hours and were 2.50 ± 0.60 , 2.19 ± 0.33 and 2.42 ± 0.61 for solution, suspension and microparticles, respectively (Table 3). As evidenced by the biological activity profile, no change in the initial INR values was observed between 0 and 8 hours. This result was expected since the anticoagulant effect of warfarin requires at least 6 to 24 h to eliminate most of the vitamin K-dependent factors at the exception of prothrombin (factor II) which presents a longer half-life (60-72 hours) [29]. The INR values were in usual therapeutic range ($2 < \text{INR} < 3$) for 0, 21 and 22 hours for suspension, solution and microparticles, respectively.

Table 3 : Pharmacokinetic parameters of warfarin formulations after subcutaneous injection to fasted rabbits at 0.6 mg/kg. Data are expressed as mean $\pm$ SD. (n=6)

Calculation based on	Parameters	Warfarin Solution	Warfarin Suspension	Warfarin Microparticles
Plasmatic concentration	T_{max} (h)	0.75	3	1.50
	C_{max} (μ g/mL)	1.44 $\pm$ 0.20	0.20 $\pm$ 0.03	1.17 $\pm$ 0.50
	$AUC_{0 \text{ to } 72h}$ (μ g/mL/kg)	3.29 $\pm$ 0.35	1.88 $\pm$ 0.65	6.39 $\pm$ 1.29
	F_{72h} (%)	100	54.2 $\pm$ 18.8	92.1 $\pm$ 18.6
Biological activity (INR)	T_{max} (h)	24	24	34
	INR_{max}	2.50 $\pm$ 0.60	1.77 $\pm$ 0.30	2.31 $\pm$ 1.14
	$AUC_{0 \text{ to } 72h}$	44.5 $\pm$ 13.8	19.9 $\pm$ 6.5	47.0 $\pm$ 40.2
	F_{72h} (%)	100	44.8 $\pm$ 14.7	52.8 $\pm$ 38.2

This work allowed a lot of information to be gained for further investigations. First, it is important to observe the high variability in warfarin concentrations and in INR values after microparticles administration. This result could be explained by the heterogeneous population of administered microparticles and more probably by the small number of animals. Secondly, the studies led by Sun et al. [30], Lombardi et al. [31], or Kulkarni et al. [32] concluded that INR values were poorly correlated with warfarin plasmatic concentration which raises the question of the choice of the warfarin monitoring method : plasmatic concentration or INR ? In clinical practice, the therapeutic use of warfarin is based on INR monitoring. In the case of delivery system development, the simultaneous determinations of plasmatic concentration and INR can be helpful and it was the reason why in our study, contrary to the studies led by Tarr et al. [13] or Zacchigna et al. [14], warfarin response was followed by plasmatic concentration measurement and by INR monitoring. As suggested in the study of Sun et al. [30], the warfarin response could be monitored not only by INR or plasmatic concentration but also by the INR/7-hydroxycoumarin concentration ratio as an example. Finally, the concentration profiles obtained after microparticles and warfarin solution administration were statistically different from 24 to 72 hours. However, even if the warfarin concentration from 24 to 72 hours was higher after microparticles (0.16 μ g/ml) than solution administration, no difference in biological activity was observed. The INR was in the therapeutical values for 27 hours and the maintenance of the INR

in these values may probably necessitate a single administration per day. Compared to warfarin suspension, no statistically differences in INR values were observed probably due to the limited number of tested animals. These preliminary results suggest that on one hand, an early important peak of concentration is not necessary for the biological activity and on the other hand, a concentration larger than 0.20 µg/ml is needed for a sustained biological activity. Finally, it is quite difficult to compare our results with those of previous studies: first due to the limited number of studies in the development of a sustained release system of warfarin and second cause to the incomplete nature of these limited studies. As an example, the results obtained by Zacchignia et al. after the conjugation of warfarin with poly(ethylene glycol) were quite promising and especially after intramuscular administration even if this route of administration can be questionable in the case of warfarin administration. Unfortunately, only plasmatic concentrations were determined and it would have been useful to measure the biological activity by the INR monitoring.

Conclusion

In this preliminary work, we showed the possibility to prepare microparticles of warfarin using PCL or a blend of PCL/PVP polymer. The addition of PVP in the formulation allowed modulating the release of warfarin. Finally, the subcutaneous administration of microparticles to rabbits was a source of information for further investigations. Microparticles of warfarin have to be optimized in order to increase the amount of released warfarin after 24 hours and to allow an extended biological activity. However, this preliminary work is a solid basis for further investigations and it is clear that such warfarin particles could have a real place in the therapeutic of thromboembolic disease by offering an improvement of patient compliance and a more effective warfarin treatment.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Dominique Daloz for his participation in the research by performing SEM pictures and to Pr. Pierre Leroy for his participation in the development of the HPLC method.

References

1. Griminger P.
Vitamin K antagonists: the first 50 years.
J Nutr 1987; **117**: 1325-9.
2. Gage BF, Lesko LJ.
Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues.
J Thromb Thrombolysis 2008; **25**: 45-51.
3. Ansell J.
Factor Xa or thrombin: is factor Xa a better target?
J Thromb Haemost 2007; **5 Suppl 1**: 60-4.
4. Haas S.
New oral Xa and IIa inhibitors: updates on clinical trial results.
J Thromb Thrombolysis 2008; **25**: 52-60.
5. Ufer M.
Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol.
Clin Pharmacokinet 2005; **44**: 1227-46.
6. Khoo CW, Tay KH, Shantsila E, Lip GY.
Novel oral anticoagulants.
Int J Clin Pract 2009; **63**: 630-41.
7. Glurich I, Burmester JK, Caldwell MD.
Understanding the pharmacogenetic approach to warfarin dosing.
Heart Fail Rev 2008; **In Press**.
8. Li C, Schwarz UI, Ritchie MD, et al.
Relative contribution of CYP2C9 and VKORC1 genotypes and early INR response to the prediction of warfarin sensitivity during initiation of therapy.
Blood 2008; **113**: 3925-30.

9. Becquemont L.
Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice.
Eur J Clin Pharmacol 2008; **64**: 953-60.
10. Fareed J, Hoppensteadt DA, Fareed D, et al.
Survival of heparins, oral anticoagulants, and aspirin after the year 2010.
Semin Thromb Hemost 2008; **34**: 58-73.
11. Kimmel SE, Chen Z, Price M, et al.
The influence of patient adherence on anticoagulation control with warfarin: results from the International Normalized Ratio Adherence and Genetics (IN-RANGE) Study.
Arch Intern Med 2007; **167**: 229-35.
12. Parker CS, Chen Z, Price M, et al.
Adherence to warfarin assessed by electronic pill caps, clinician assessment, and patient reports: results from the IN-RANGE study.
J Gen Intern Med 2007; **22**: 1254-9.
13. Tarr ER, Lasserre A, Szmulowicz U, Bajpai PK.
A hydroxyapatite system for the continuous release of coumadin an anticoagulant.
Biomed Sci Instrum 1997; **33**: 143-8.
14. Zacchigna M, Di Luca G, Cateni F, Maurich V.
Improvement of warfarin biopharmaceutics by conjugation with poly(ethylene glycol).
Eur J Pharm Sci 2004; **23**: 379-84.
15. Hombreiro Pérez M, Zinutti C, Lamprecht A, et al.
The preparation and evaluation of poly([epsilon]-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug.
J Control Release 2000; **65**: 429-38.

-
16. Wang X, Wang Y, Wei K, et al.
Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release.
J Mater Process Technol 2009; **209**: 348-54.

 17. Raguime JA, Arthanareeswaran G, Thanikaivelan P, Mohan D, Raajenthiren M.
Performance characterization of cellulose acetate and poly(vinylpyrrolidone) blend membranes.
J Appl Polym Sci 2007; **104**: 3042-9.

 18. Jeong JC, Lee J, Cho K.
Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres.
J Control Release 2003; **92**: 249-58.

 19. Gibaud S, Jabir Al Awwadi N, Ducki C, Astier A.
Poly(ϵ -caprolactone) and Eudragit microparticles containing fludrocortisone acetate.
Int J Pharm 2004; **269**: 491-508.

 20. Homar M, Ubrich N, El Ghazouani F, et al.
Influence of polymers on the bioavailability of microencapsulated celecoxib.
J Microencapsul 2007; **24**: 621-33.

 21. Sastre RL, Blanco MD, Teijón C, Olmo R, Teijón JM.
Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres for drug administration.
Drug Dev Res 2004; **63**: 41-53.

 22. Zhang X, Wang Y, Wang J, Li S.
Effect of pore former on the properties of casted film prepared from blends of Eudragit® NE 30 D and Eudragit® L 30 D-55.
Chem Pharm Bull 2007; **55**: 1261-3.

-
23. Chakrabarty B, Ghoshal AK, Purkait MK.
Preparation, characterization and performance studies of polysulfone membranes using PVP as an additive.
J Memb Sci 2008; **315**: 36-47.
24. Hwang JR, Sefton MV.
The effects of polymer concentration and a pore-forming agent (PVP) on HEMA-MMA microcapsule structure and permeability.
J Memb Sci 1995; **108**: 257-68.
25. Sairam M, Ramesh Babu V, Krishna Rao KSV, Aminabhavi TM.
Poly(methylmethacrylate)-poly(vinylpyrrolidone) microspheres as drug delivery systems: Indomethacin/cefadroxil loading and in vitro release study.
J Appl Polym Sci 2007; **104**: 1860-5.
26. Moneghini M, Carcano A, Zingone G, Perissutti B.
Studies in dissolution enhancement of atenolol. Part I.
Int J Pharm 1998; **175**: 177-83.
27. Wen H, Morris KR, Park K.
Study on the interactions between polyvinylpyrrolidone (PVP) and acetaminophen crystals: Partial dissolution pattern change.
J Pharm Sci 2005; **94**: 2166-74.
28. Gupta P, Thilagavathi R, Chakraborti AK, Bansal AK.
Role of molecular interaction in stability of celecoxib-PVP amorphous systems.
Mol Pharm 2005; **2**: 384-91.
29. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, et al.
Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition).
Chest 2008; **133**: 160S-98S.

30. Sun S, Wang M, Su L, et al.
Study on warfarin plasma concentration and its correlation with international normalized ratio.
J Pharm Biomed Anal 2006; **42**: 218-22.
31. Lombardi R, Chantarangkul V, Cattaneo M, Tripodi A.
Measurement of warfarin in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) and its correlation with the international normalized ratio.
Thromb Res 2003; **111**: 281-4.
32. Kulkarni UP, Swar BD, Karnad DR, et al.
A pilot study of the association of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of warfarin with the dose in patients on long-term anticoagulation.
Br J Clin Pharmacol 2008; **65**: 787-90.

DISCUSSION GENERALE

Les héparines et les AVK ont été « les anticoagulants » des cinq dernières décennies. Les héparines sont administrées par voie sous-cutanée 1 à 2 fois par jour, se fixent à l'antithrombine et inhibent les facteurs activés de la coagulation et notamment les facteurs IIa et Xa. Si le traitement anticoagulant doit être conduit au-delà de quelques semaines, un traitement par AVK sera alors instauré en relais au traitement hépariné. Les AVK bloquent l'une des dernières étapes de synthèse des facteurs II, VII, IX et X de la coagulation. Cependant, l'effet anticoagulant des AVK ne se manifeste qu'au bout de quelques jours et devient stable qu'à partir de 4 à 7 jours en raison des demi-vies d'élimination relativement longues des facteurs circulants. Le traitement par AVK nécessite une surveillance de l'INR en raison d'une marge thérapeutique étroite, de variabilités génétiques directement liées à leur métabolisme ou bien encore d'interactions avec d'autres spécialités ou avec les aliments riches en vitamine K. Contrairement aux HBPM où le suivi de l'activité anti-Xa n'est réalisée que dans certains cas particuliers (sujets obèses, sujets insuffisants rénaux, grossesses), les HNF doivent également bénéficier d'un suivi de leur activité biologique au vu des grandes variabilités interindividuelles constatées quant à la réponse aux doses administrées. Cette surveillance peut être réalisée par le suivi du temps de thromboplastine partielle activée (aPTT) et du temps de coagulation activée (ACT) [170]. Enfin, afin de prévenir toute survenue de thrombopénie induite par les héparines, une surveillance régulière de la numération plaquettaire est nécessaire chez tous les patients traités par héparine et ce, quel que soit le type d'héparine utilisée (HNF ou HBPM).

Devant les limites du traitement anticoagulant par héparines ou AVK, ces dernières années ont assisté au développement de nombreux composés présentant une inhibition spécifique des facteurs Xa ou IIa (Figure 36) administrables soit par voie sous-cutanée soit par voie orale [205]. Si ces molécules présentent des caractéristiques intéressantes (Tableau 8), elles présentent également des inconvénients pouvant limiter leur utilisation : absence d'antidote, absence d'une surveillance adéquate et un prix élevé [206]. En effet, la complication majeure de tous les anticoagulants est le risque de saignement. Aussi l'existence d'un antidote pouvant rapidement annuler l'effet anticoagulant du traitement s'avère très utile lors d'un épisode majeur de saignement, d'un traumatisme majeur ou bien encore si un acte chirurgical est à réaliser en urgence. Excepté l'idrabioparin, aucun de ces nouveaux agents ne possède d'antidote. De plus, bien que les nouveaux anticoagulants aient été conçus pour être

utilisés sans suivi de leur activité biologique, ce suivi peut néanmoins se révéler utile dans les situations où une adaptation de posologie semble nécessaire : insuffisance hépatique, insuffisance rénale ou dans les cas de polymédication. Cependant, ces nouveaux agents présentent des effets variables sur les tests habituellement utilisés et aucun de ces tests ne semblent constituer un bon indicateur de l'activité de ces molécules. Si la mesure de l'inhibition du facteur Xa ou la mesure du temps de coagulation par l'écarine pourraient s'avérer utiles dans les suivis respectifs des inhibiteurs des facteurs Xa et IIa, ces tests nécessitent d'être standardisés. Ainsi en l'absence de ces tests, il est difficile de définir les zones thérapeutiques de ces molécules et d'effectuer les adaptations posologiques nécessaires. Enfin, le coût élevé de ces nouvelles molécules peut constituer un réel frein à leur utilisation et notamment en l'absence d'une nette supériorité en termes d'efficacité ou de sécurité d'utilisation par rapport aux traitements déjà existants.

Parallèlement à ces efforts dédiés à la recherche de nouvelles molécules anticoagulantes, une seconde option consiste à optimiser les molécules existantes et à tenter d'en améliorer les propriétés. Cette seconde option fut particulièrement retenue pour les héparines où un nombre conséquent de travaux a été réalisé afin de permettre le passage de ces molécules à travers la barrière gastro-intestinale après leur administration orale. Les études réalisées dans ce travail tant sur les granulés que sur les pellets sont dans la continuité de ces recherches et les résultats qui en découlent, et plus particulièrement les résultats non soumis à publication, seront discutés dans une première partie. Les travaux réalisés sur les AVK sont, quant à eux, nettement moins nombreux et nous verrons dans la seconde partie de notre discussion les difficultés d'une telle étude.

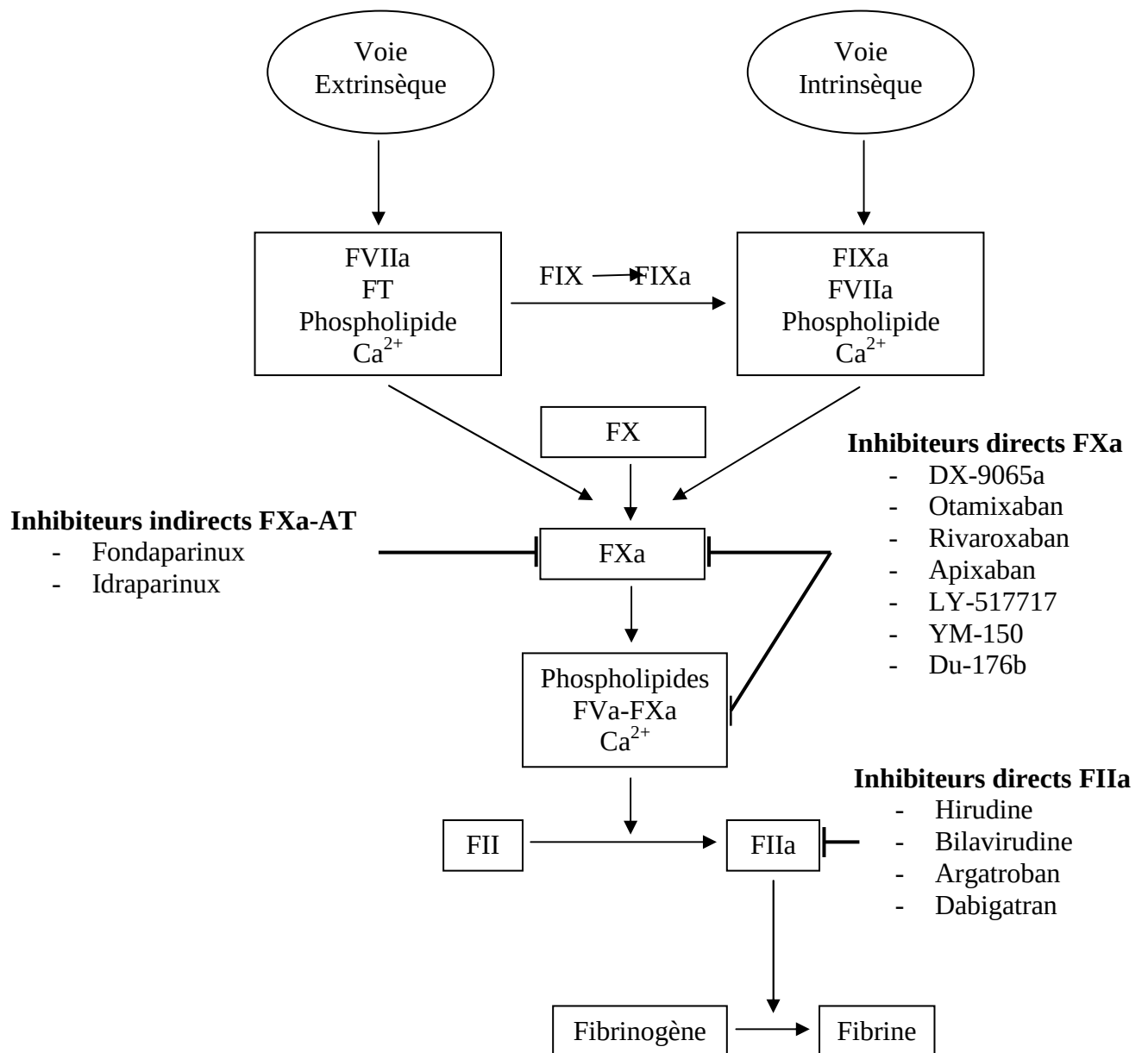


Figure 36 : Mode d'action des nouveaux anticoagulants.
(d'après Haas S, 2008 [205])

Tableau 8 : Caractéristiques de nouveaux anticoagulants .

	Inhibiteurs du Facteur Xa					Inhibiteurs du Facteur IIa
	Fondaparinux	Idraparinux	SSR126517 ou Idrabiotaparinux	Apixaban	Rivaroxaban	Dabigatran
Type	indirect	indirect	indirect	direct	direct	direct
Prodrogue	non	non	non	non	non	oui (Etexilate)
Voie d'administration	Sous-cutanée	Sous-cutanée	Sous-cutanée	Orale	Orale	Orale
Posologie	1x/j	1x/sem.	1x/sem.	2x/j	1x/j	2x/j
Biodisponibilité (%)	100	100	100	>50	60-80	6,5
Tmax (h)	NR	NR	NR	3	3	2
Demi-vie (h)	17	80	80	9-14	9	14-17
Clairance rénale (%)	oui	oui	oui	25	67	80
Interactions	NR	NR	NR	Inhibiteurs CYP3A4	Inhibiteurs CYP3A4	Inhibiteurs de la pompe à protons
Antidote	non	non	oui (avidine)	non	non	non

NR : Non Renseigné.

1. DEVELOPPEMENT DE FORMES ORALES D'HEPARINE.

Du fait de leur masse moléculaire élevée et de leur charge négative importante, les héparines se voient administrées par voies intraveineuse ou sous-cutanée. L'administration parentérale de ces molécules ainsi que la répétition de leurs injections constituent l'un de leurs principaux inconvénients. La voie orale, quant à elle, est certainement la voie d'administration la plus physiologique et la plus confortable pour les patients. Ainsi, de nombreux travaux ont été menés durant ces quarante dernières années pour développer des systèmes capables d'améliorer la biodisponibilité orale de ces molécules. Parmi ces travaux, les nano- et les microparticules d'héparine développées au sein du laboratoire de biopharmacie et de pharmacie galénique de Nancy constituent sans aucun doute une référence en terme d'amélioration de la biodisponibilité orale des héparines. Ainsi, les travaux réalisés sur les granulés comme sur les pellets d'héparine se situent dans la continuité de ces études mais s'attachent à dépasser le seul concept de la forme orale d'héparine. Si l'objectif principal de ces études fut la réalisation d'une forme orale d'héparine, leur cahier des charges fut cependant affecté de nouveaux objectifs à atteindre : la fabrication d'une forme facilement industrialisable, stable au cours du temps et n'utilisant pas de solvants organiques.

Si les formes particulières que sont les nano- et les microparticules peuvent être fabriquées au niveau du laboratoire de recherche, il est cependant difficile de transposer ces techniques au niveau industriel tant par les contraintes technologiques propres à l'industrie que par un coût de fabrication qui doit rester acceptable. En revanche, la granulation et la pelletisation, procédés de production largement répandus et utilisés dans l'industrie pharmaceutique répondent parfaitement à ces différentes contraintes puisqu'ils ne nécessitent ni un surcoût d'équipement ni une formation complémentaire du personnel de production.

Les travaux réalisés sur les granulés (Article 1) et les pellets (Article 2) d'HBPM (énoxaparine et bémiparine) ont permis de montrer la libération de ces molécules à partir de ces formes, leur passage à travers la barrière intestinale et enfin, de mettre en évidence le rôle de l'Eudragit®RS dans l'augmentation de leur biodisponibilité. Aussi, fort de l'expérience acquise avec les nano- et les microparticules où une perte rapide de l'activité des héparines a pu être constatée

après leur encapsulation, des études complémentaires ont été réalisées afin de tester la stabilité au cours du temps des héparines incorporées. Pour cela, des granulés et des pellets ont été administrés aux lapins par voie orale à des intervalles de temps préalablement définis. Les activités anti-Xa mesurées sont présentées dans les figures 37, 38 et 39 et les paramètres pharmacocinétiques correspondants sont présentés dans le tableau 9.

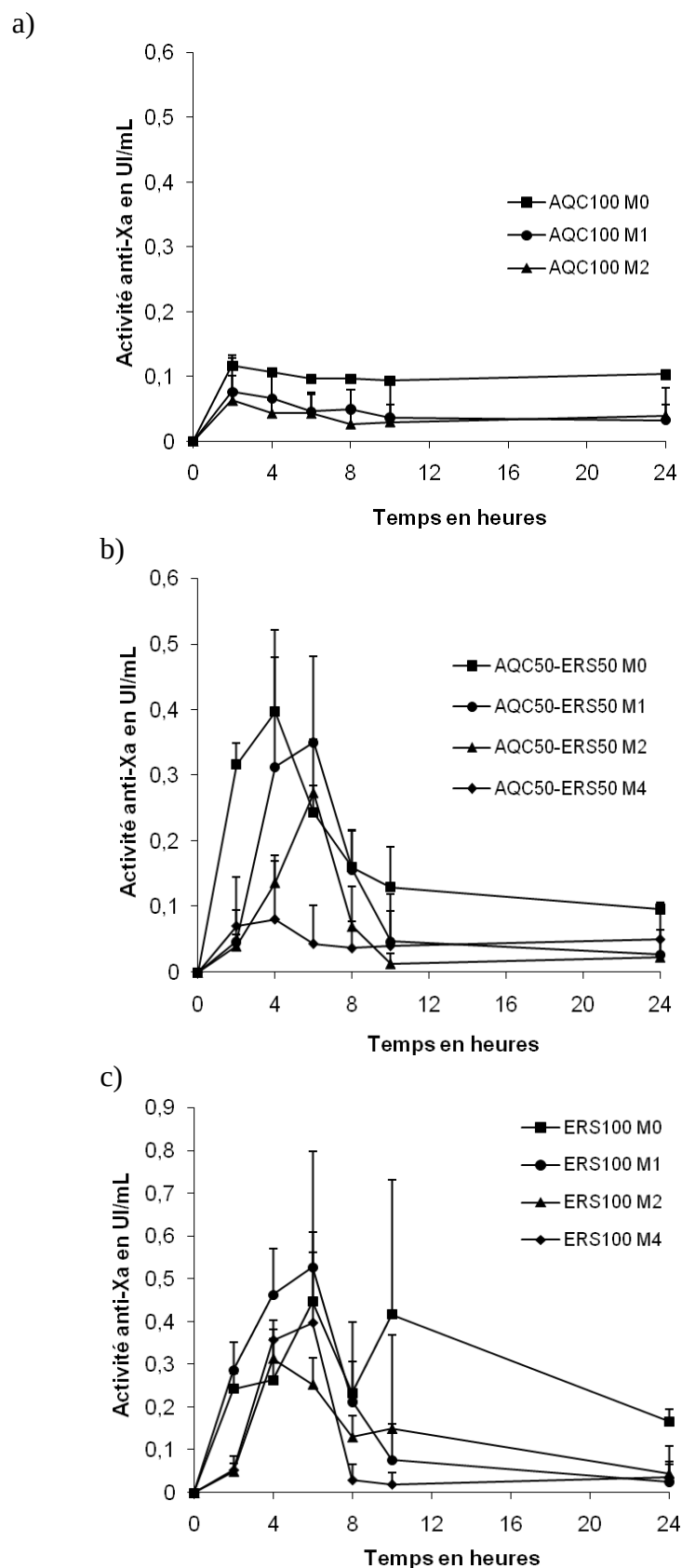
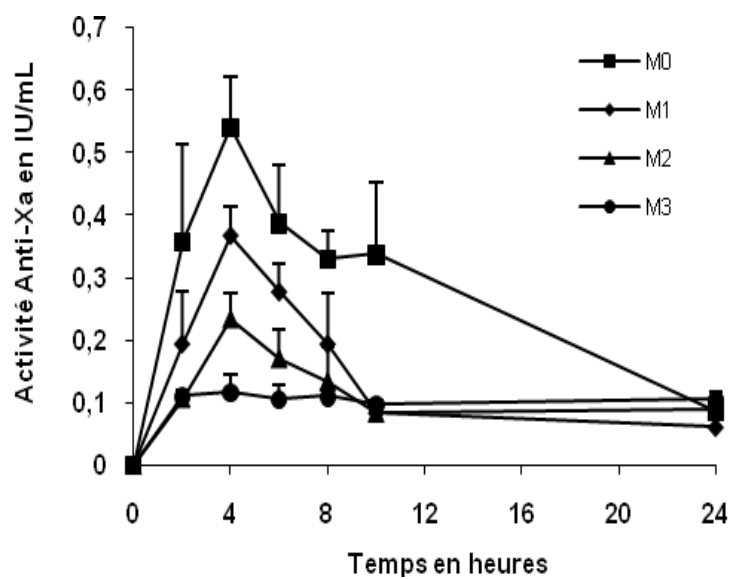


Figure 37 : Activités anti-Xa mesurées après administration orale de granulés d'énoxaparine à la dose de 600 IU/kg 1, 2 et 4 mois après leur fabrication (n=3).
 a) Aquacoat® 100 % ; b) Aquacoat®/Eudragit®RS 50:50 ; c) Eudragit®RS 100%.

a)



b)

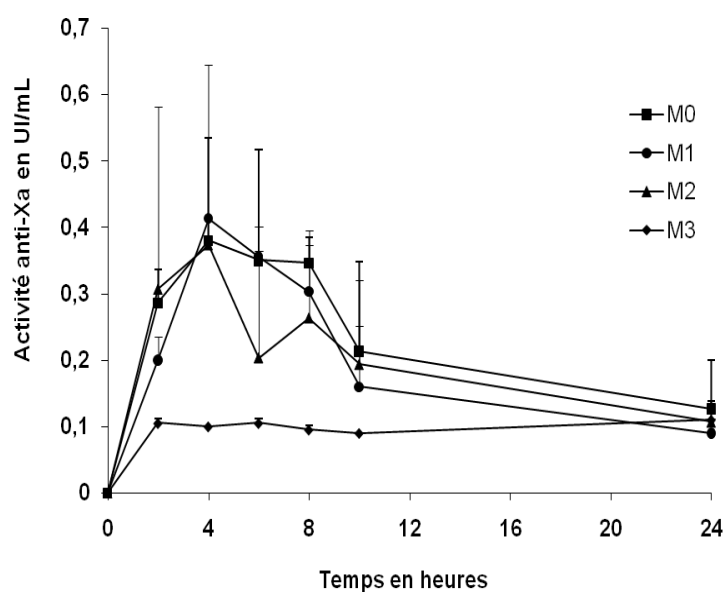


Figure 38 : Activités anti-Xa mesurées après administration orale de granulés de bémiparine 1, 2 et 3 mois après leur fabrication (n=3).

a) Granulés administrés à la dose de 600 IU/kg

b) Granulés administrés à la dose de 1200 IU/kg

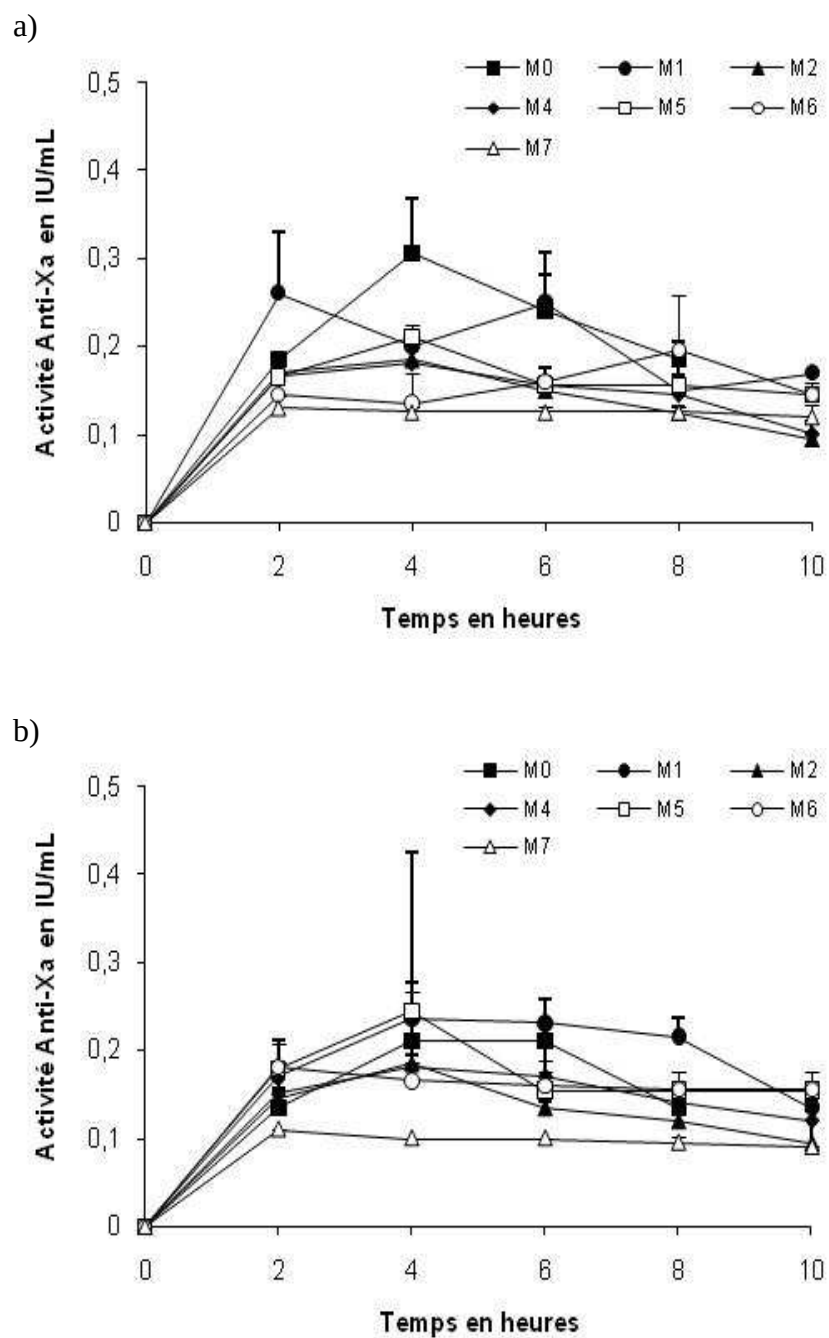


Figure 39 : Activités anti-Xa mesurées après administration orale de pellets d'énoxaparine chargés d'Eudragit® RS à la dose de 600 IU/kg 1, 2, 4, 5, 6 et 7 mois après leur fabrication (n=3).

a) Pellets de 0,5-0,8 mm

b) Pellets de 0,8-1,2 mm

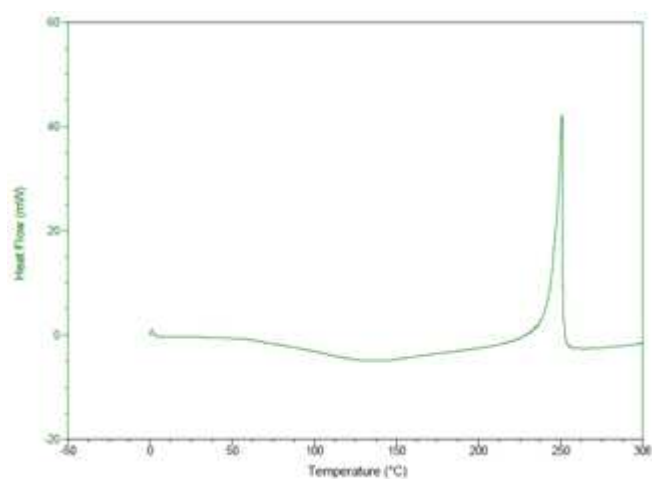
Tableau 9 : Paramètres pharmacocinétiques après administration orale de granulés ou de pellets d'HBPM.

Formulations	Administration (mois)	Dose (U aXa/kg)	T _{max} (h)	C _{max} (U aXa/mL)	AUC _{0->10h} (U aXa.h.ml ⁻¹ .kg ⁻¹)	F _{10h} (%)
ENOXAPARINE						
Solution d'énoxaparine	0	300	1	1,59±0,08	2,19±0,14	100
Granulés	Aquacoat® ECD30	0	2	0,12±0,01	0,29±0,01	6,67±0,27
		1	2	0,08±0,06	0,15±0,10	3,43±2,40
		2	2	0,06±0,04	0,12±0,07	2,66±1,71
		4	4	0,40±0,12	0,68±0,08	15,53±1,80
	Aquacoat® ECD30 Eudragit® RS30D 50:50	1	6	0,35±0,13	0,50±0,26	11,34±5,88
		2	6	0,27±0,08	0,30±0,11	6,76±2,42
		4	4	0,08±0,09	0,17±0,16	4,00±3,77
		0	6	0,45±0,12	0,83±0,02	19,00±0,34
	Eudragit® RS30D	1	6	0,53±0,27	0,80±0,36	18,21±8,20
		2	4	0,31±0,05	0,44±0,08	10,14±1,75
		4	6	0,40±0,21	0,46±0,14	10,42±3,29
		Pellets	0	4	0,31±0,06	0,62±0,13
1	2		0,26±0,07	0,64±0,07	14,55±1,51	
2	4		0,19±0,02	0,46±0,07	10,54±1,63	
4	4		0,18±0,03	0,47±0,03	10,72±0,71	
5	4		0,21±0,01	0,24±0,01	10,90±0,56	
6	8		0,20±0,06	0,22±0,00	10,24±0,19	
7	2-8		0,13±0,01	0,18±0,01	8,21±0,65	
0	4		0,21±0,04	0,47±0,09	10,75±2,13	
1	4		0,24±0,19	0,62±0,08	14,11±1,82	
2	4		0,19±0,09	0,43±0,14	9,90±3,11	
4	4		0,18±0,01	0,47±0,04	10,79±0,81	
5	4		0,25±0,01	0,26±0,02	11,68±0,74	
6	2		0,18±0,03	0,23±0,03	10,70±1,58	
7	2		0,11±0,00	0,14±0,00	6,50±0,09	
BEMIPARINE						
Solution de Bémiparine	0	150	1	0,51±0,08	0,51±0,55	100
Granulés	Sans Eudragit® RS30D	0	2	0,15±0,04	0,32±0,03	7,76±0,85
		0	4	0,38±0,15	0,77±0,18	19,05±4,47
		1	4	0,41±0,00	0,76±0,15	18,83±3,76
	Avec Eudragit® RS30D	2	4	0,37±0,27	0,78±0,53	19,23±13,02
		3	2	0,11±0,01	0,24±0,01	5,91±0,22
		Sans Eudragit® RS30D	0	2	0,10±0,03	0,22±0,31
	Avec Eudragit® RS30D	0	4	0,54±0,08	1,05±0,15	29,02±4,12
		1	4	0,37±0,05	0,58±0,13	15,71±4,07
		2	4	0,23±0,04	0,43±0,04	11,89±1,12
		3	4	0,12±0,03	0,24±0,04	6,59±1,22

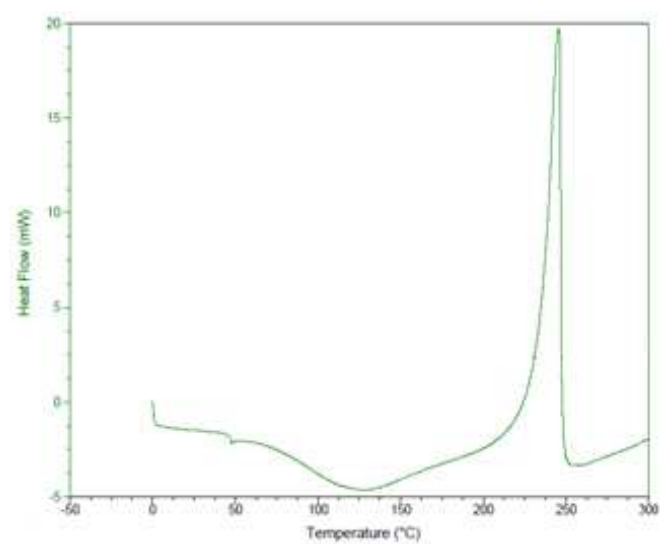
A l'issu de ce travail, nous avons pu constater la diminution de l'activité biologique tant de l'énoxaparine que de la bémiparine au cours du temps, ce, quelle que soit la formulation utilisée. Cependant, il est à remarquer que les granulés d'énoxaparine chargés uniquement d'ERS présentaient encore une biodisponibilité relative de l'ordre de 10 % et une concentration maximale de 0,40 UI anti-Xa/ml 4 mois après leur fabrication. De même, malgré une concentration maximale plus faible, de l'ordre de 0,20 UI anti-Xa/ml, les pellets d'énoxaparine présentaient une biodisponibilité relative de l'ordre de 10 % après 4 mois de fabrication. Ces résultats constituent un véritable progrès par rapport aux nano- ou aux microparticules d'héparine dont l'activité biologique nécessitait une préparation extemporanée. Grâce aux granulés et aux pellets, nous avons d'une part amélioré la biodisponibilité orale de l'énoxaparine et de la bémiparine et d'autre part, prolongé cette augmentation de biodisponibilité durant plusieurs mois. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que l'avenir de ces deux nouvelles formes ne peut-être assuré que si l'activité biologique des héparines incorporées est maintenue à des niveaux thérapeutiques pour des durées plus longues. Ainsi, l'amélioration des granulés et des pellets d'héparine ne peut passer que par une meilleure compréhension de l'origine et des mécanismes gouvernant leur perte d'activité. L'augmentation de la biodisponibilité orale des héparines utilisées étant fortement influencée par la présence ou non d'ERS dans la formulation, la perte d'activité biologique pourrait être vraisemblablement liée à une dégradation du principe actif lui-même, à une dégradation du polymère polycationique ou bien à une combinaison de ces deux phénomènes.

Pour tenter d'apporter quelques réponses à cette question, une étude des granulés chargés uniquement d'Eudragit[®]RS a été réalisée par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). La calorimétrie différentielle à balayage permet de mesurer les températures et les flux de chaleur associés à des changements physiques et chimiques d'un matériau caractérisés par des processus endo- ou exothermiques. La figure 40 présente les différents thermogrammes obtenus pour chacun des constituants entrant dans la formulation des granulés : énoxaparine ou bémiparine, cellulose microcristalline et Eudragit[®]RS. Tous ces constituants furent testés sous forme de poudre à une quantité de 5 mg. Excepté pour la cellulose microcristalline où l'intervalle de température choisi fut compris entre 0 et 350°C, l'intervalle de température fut compris entre 0 et 300°C et la vitesse de chauffage utilisée fut de 10°C/min.

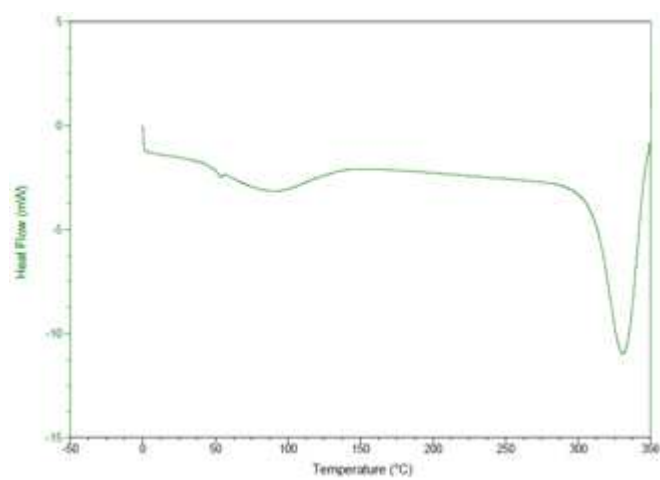
a)



b)



c)



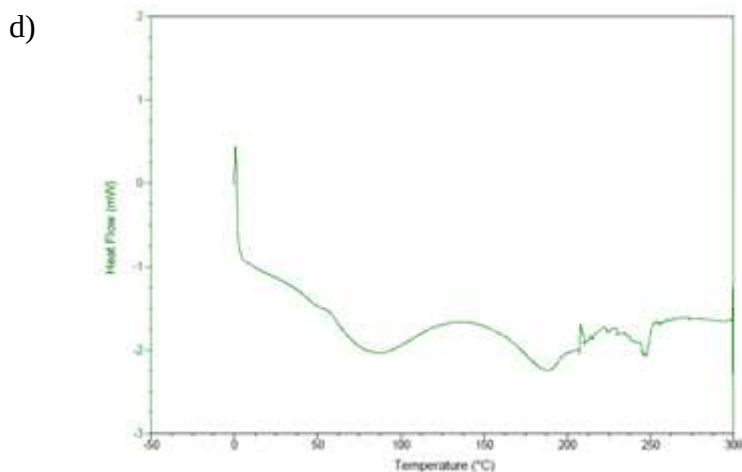


Figure 40 : Thermogrammes des composés utilisés lors de la granulation.

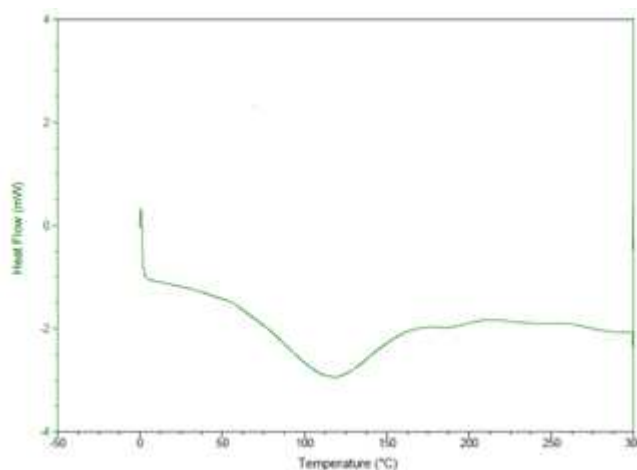
a) Enoxaparine ; b) Bémiparine
c) Cellulose Microcristalline ; d) Eudragit® RS

Après chauffage, tous les constituants révèlent un pic endothermique aux alentours de 100°C correspondant à l'évaporation des molécules d'eau présentes dans chacune des poudres testées. Les deux HBPM testées présentent des comportements thermiques similaires caractérisés par un pic exothermique aux alentours de 240°C correspondant à leur décomposition (figures 40a et 40b). La cellulose microcristalline (figure 40c) présente une décomposition thermique pour des températures supérieures à 300°C caractérisée par un pic endothermique. Enfin, le thermogramme de l'Eudragit® RS (figure 40d) révèle une structure amorphe, une température de transition vitreuse aux alentours de 50-55°C et une dégradation pour des températures supérieures à 180°C.

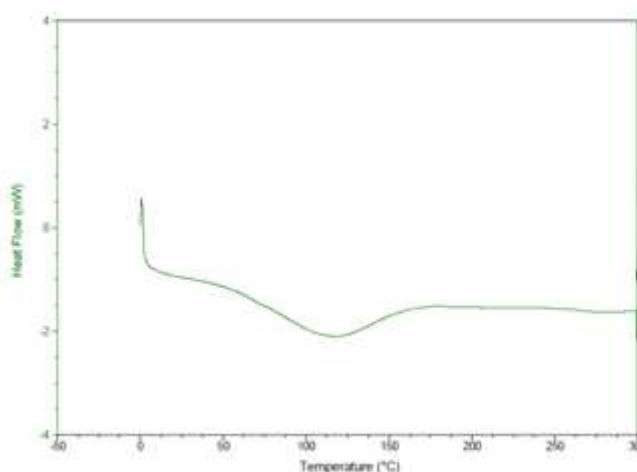
A la suite des essais réalisés sur chacun des composants entrant dans la fabrication des granulés, des essais ont été réalisés sur des granulés vierges (figure 41a) et des granulés chargés d'énoxaparine 0 (figure 41b) et 5 mois (figure 41c) après leur fabrication. Ces différents granulés ont été conservés dans des piluliers contenus dans un dessiccateur sous vide, à l'abri de la lumière et à une température de 5°C. Les thermogrammes des granulés vierges ou chargés en énoxaparine sont similaires à celui de la cellulose microcristalline. Le comportement thermique des granulés qu'ils soient vierges ou chargés semble être gouverné par la cellulose microcristalline puisque ni le pic de dégradation de l'Eudragit® RS ni celui de l'énoxaparine n'ont pu être retrouvés. Ces résultats laissent à penser que l'Eudragit® RS et l'énoxaparine sont

probablement dispersés au sein de la cellulose microcristalline. La présence d'un pic endothermique à une température proche de 100°C est certainement liée à l'évaporation des molécules d'eau au cours du processus de chauffage des différentes formulations. Il est intéressant de constater que ce pic endothermique survient à une plage de températures plus faibles et présente une enthalpie d'évaporation plus importante après 5 mois de stockage laissant à penser que la structure des granulés a pu évoluer au cours du temps. Toutefois, une seconde hypothèse pourrait être formulée à partir de ces thermogrammes et consisterait à dire que la teneur en eau des granulés a augmenté au cours du temps. Cependant, au vu de la méthode de stockage des granulés, cette hypothèse semble peu probable.

a)



b)



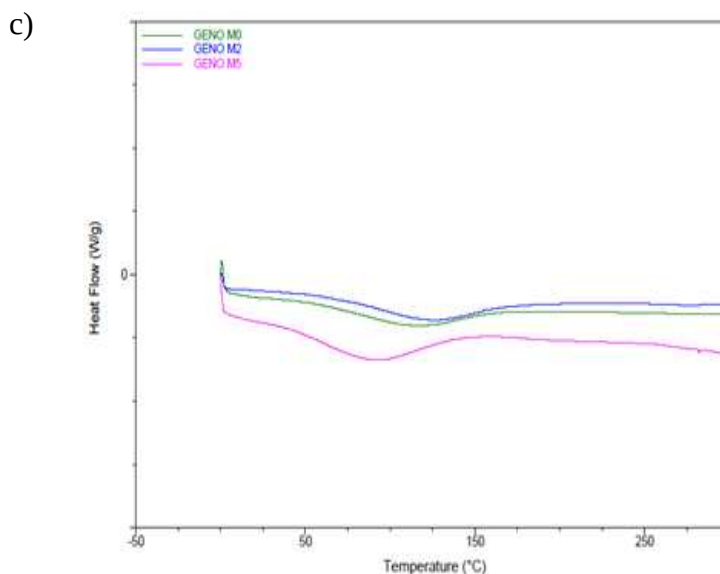


Figure 41 : Thermogrammes de granulés d'énoxaparine.

- a) Granulés vierges
- b) Granulés chargés d'énoxaparine à 0 mois.
- c) Granulés chargés d'énoxaparine à 0, 2 et 5 mois.

De la même façon, une étude des granulés de bémiparine a également été réalisée par DSC (figure 42). Il est intéressant de constater que les granulés de bémiparine ne semblent pas présenter le même comportement thermique que ceux d'énoxaparine. En effet, le thermogramme des granulés de bémiparine présente un pic exothermique ainsi qu'un pic endothermique avec un épaulement.

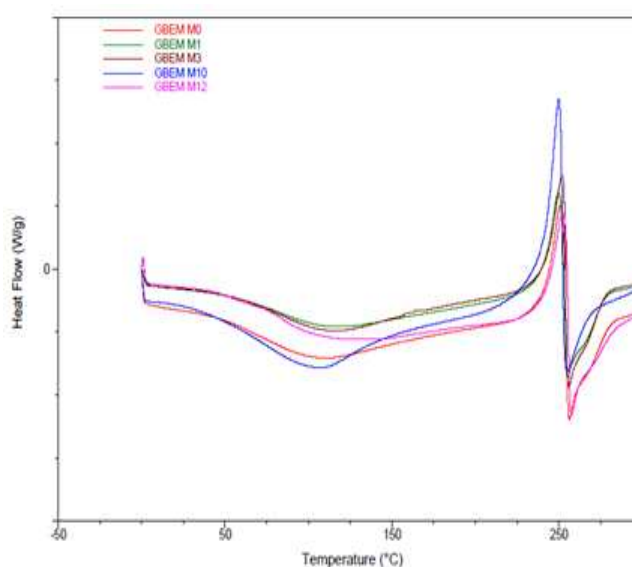


Figure 42 : Thermogrammes des granulés de bémiparine 0, 1, 3, 10 et 12 mois après fabrication.

Le premier pic endothermique présent sur les différents thermogrammes à une température proche de 100°C correspond également ici, au pic d'évaporation des molécules d'eau présentes au sein des granulés de bémiparine. Le pic exothermique survient à une température de l'ordre de 240°C et correspond certainement à la décomposition thermique de la bémiparine. Ce pic est immédiatement suivi par un pic endothermique. Ce second pic endothermique présente un épaulement qui évoque un possible chevauchement de deux pics endothermiques que pourraient être les pics de dégradation de la cellulose microcristalline et de l'Eudragit®RS. Cette différence de comportement des granulés de bémiparine par rapport aux granulés d'énoxaparine, peut être imputable aux caractéristiques différentes de ces deux héparines mais semble cependant plus vraisemblablement résulter d'une différence de rapport entre polymères et principe actif. En effet, la quantité d'héparine incorporée au sein des granulés fut de 50 mg dans le cas des granulés d'énoxaparine et 750 mg dans le cas des granulés de bémiparine pour des quantités respectives de cellulose microcristalline et de polymères de 1 g et 400 mg.

La figure 42 présente les thermogrammes des granulés de bémiparine réalisés 0, 1, 3, 10 et 12 mois après leur fabrication. Les profils des thermogrammes à 0, 1, 3 et 10 mois ne semblent pas présenter de différences. En revanche, comparé aux thermogrammes précédents, le thermogramme à 12 mois se caractérise par la présence d'une transformation de second ordre à une température de l'ordre de 50°C semblant correspondre à la température de transition vitreuse de l'Eudragit®RS. De plus, le pic endothermique rencontré à la température de 100°C semble avoir disparu. Cette observation nous pousse croire qu'après fabrication des granulés, l'Eudragit®RS était certainement complexé à la bémiparine présentant des charges opposées pour former un réseau dans lequel des molécules d'eau pouvait être emprisonnées. Douze mois après leur fabrication, les granulés semblent avoir vu leur structure interne évoluer jusqu'à rupture du réseau formé par l'Eudragit®RS et la bémiparine. Si cette hypothèse peut-être vérifiée, elle ne permet cependant pas de déterminer la chronologie des événements observés : est-ce la perte d'eau qui a provoqué la scission du réseau ou est-ce la scission du réseau qui a provoqué la perte en eau. Ainsi pour parfaire ces premières études de calorimétrie, des études complémentaires pourraient être réalisées à l'aide de techniques telles que la thermogravimétrie ou la diffractométrie par rayons X. La première technique permettrait d'évaluer l'évolution de la masse des granulés au

cours du temps de stockage et la seconde technique, d'évaluer plus finement leur structure interne.

Enfin, il est à rappeler que de nombreuses études font appel à des solvants organiques dans leur développement. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer l'utilisation de solvants de classe 2 tels que le diméthylformamide, le méthanol ou le dichlorométhane ou des solvants de classe 3 tels que l'acétate d'éthyle, l'acide acétique, l'éthanol ou encore le diéthyl éther. L'utilisation de ces solvants pose légitimement la question de la toxicité du produit fini ainsi que celle de leur impact environnemental et se voit ainsi limitée par l'agence européenne de l'évaluation des produits médicaux. La note CPMP/ICH/283/95 relative aux solvants résiduels classe ces solvants en 3 catégories, décrit les méthodes d'évaluation de leurs limites d'exposition ainsi que les procédures analytiques nécessaires à la quantification de ces composés. Les granulés et les pellets préparés dans ce travail n'ont fait appel qu'à des suspensions aqueuses de polymères (Eudragit®RS et/ou Aquacoat®ECD). Le développement de telles formes qui n'ont fait intervenir aucun solvant organique dans leur processus de fabrication représente un avantage certain tant en terme de sécurité pour les patients et les opérateurs qu'en terme de coût et de temps de développement.

2. DEVELOPPEMENT D'UNE FORME A LIBERATION PROLONGEE DE WARFARINE.

Les traitements anticoagulants par antagonistes de la vitamine K concernent près d'un million d'individus en France et ce nombre tend à s'accroître avec le vieillissement de la population et les pathologies cardiovasculaires qui lui sont associées telles que les cardiopathies emboligènes, les infarctus du myocarde ou les maladies thromboemboliques veineuses. Les AVK nécessitent une attention particulière en raison du grand nombre d'accidents iatrogènes associés à leur utilisation qui constituent la première cause d'hospitalisation pour effets indésirables. Face à ces risques iatrogènes et pour améliorer le traitement anticoagulant par AVK, de nombreux travaux tentent d'optimiser l'utilisation de ces AVK soit par la recherche d'une dose optimale [207] soit par la recherche d'une durée de traitement optimale [208]. Des campagnes de prévention sont également réalisées tant pour informer les patients que pour sensibiliser les professionnels de santé [209] ; la compliance des patients et l'implication des professionnels de santé étant des points essentiels pour le bon déroulement du traitement et pour limiter la survenue des effets indésirables [183, 185]. A côté de ces études, quelques équipes tentent d'aborder ce problème sous un angle différent en faisant appel aux technologies pharmaceutiques. Ainsi, certains auteurs avaient pour objectif de mettre au point de nouvelles formes d'administration [189-191, 193, 197] pour ces molécules pendant que d'autres tentaient d'en améliorer les propriétés physico-chimiques [186-188]. Le travail (article 3) que nous avons réalisé sur les microparticules de poly- ϵ -caprolactone, s'inscrit dans la continuité de ces études et tente de mettre au point un nouveau système de délivrance de warfarine permettant l'amélioration de la compliance des patients à leur traitement par une réduction de la fréquence d'administration.

La préparation des microparticules de warfarine, basée sur la méthode de simple émulsion O/W, fit appel à la poly- ϵ -caprolactone, polymère semi-cristallin biodégradable et biocompatible appartenant à la famille des polyesters. De nombreux travaux relatifs à la fabrication de nano- ou de microparticules [210] rapportent l'utilisation de ce polymère. En effet la poly- ϵ -caprolactone présente l'avantage de se dégrader lentement ce qui permet une libération prolongée du principe actif sur des périodes de temps pouvant aller jusqu'à un an. Les taux d'encapsulation obtenus sont relativement faibles (40-50 %) et plutôt inattendus du fait de la faible solubilité (17

µg/ml) de la warfarine dans les milieux hydrophiles. Cependant des études comme celle de Wang et al. [211] laissent à penser qu'il est possible d'optimiser notre formulation pour obtenir des taux d'encapsulation plus élevés. L'évaluation de nombreux paramètres telles que la concentration en tensioactif, le rapport polymère/principe actif ou bien encore la viscosité de la phase dispersée permettrait certainement d'augmenter la quantité de principe actif encapsulée au sein des particules.

Après caractérisation des particules et détermination des conditions SINK, une étude de dissolution *in vitro* fut menée sur les microparticules de warfarine (Figure 43) suspendues en milieu tampon phosphate à pH 7,4 (PBS) ; milieu de dissolution le plus fréquemment utilisé pour l'étude des formes pharmaceutiques non administrées par voie orale. La libération de la warfarine à partir des microparticules de poly-ε-caprolactone présente un profil biphasique constitué d'une libération initiale importante et d'un plateau correspondant à un pourcentage de libération de la warfarine de l'ordre de 60 %. Si la libération initiale importante de warfarine est certainement liée aux molécules de warfarine proches de la surface des microparticules, la libération plus tardive et plus lente du principe correspond vraisemblablement à la diffusion des molécules de warfarine à travers la matrice polymérique. Pour évaluer la possibilité de moduler cette libération, un polymère hydrophile, la polyvinyl pyrrolidone, a été ajouté à la formulation originelle. Les microparticules fabriquées à base du mélange polyvinyl pyrrolidone/poly-ε-caprolactone 1:5 ont vu leur pourcentage de libération passer de 60 à 80 %. Dispersée au sein de la matrice hydrophobe de poly-ε-caprolactone, l'hydrophilie de la polyvinyl pyrrolidone lui permet de se dissoudre au contact du milieu de dissolution pour former des pores au sein de la matrice hydrophobe facilitant ainsi la diffusion de la warfarine vers le milieu de dissolution [212]. De plus, grâce à des interactions faibles de type liaisons hydrogènes ou liaisons de Van der Waals, la polyvinyl pyrrolidone est capable d'améliorer la solubilité de principes actifs faiblement hydrosolubles tels que l'aténolol [213] ou le célécoxib [214]. Il est possible que ces interactions jouent également un rôle dans le cas de la warfarine participant ainsi à l'augmentation de sa dissolution et de sa diffusion dans le milieu externe. L'augmentation de la quantité de polyvinyl pyrrolidone dans la formulation des microparticules (mélange polyvinyl pyrrolidone/poly-ε-caprolactone 2:5) n'a pas permis d'augmenter le pourcentage de libération de la warfarine qui fut de l'ordre de 65 %. Ce résultat est conforme aux

résultats de travaux antérieurs [215, 216] où la dissolution d'une quantité plus importante de polyvinyl pyrrolidone était associée à une augmentation de la viscosité du milieu interne limitant alors la diffusion du principe actif vers le milieu extérieur. Enfin, notre étude a fait appel à des polymères dont les masses moléculaires étaient respectivement de 40 000 Da pour la poly- ϵ -caprolactone et comprises entre 7 000-11 000 Da pour la polyvinyl pyrrolidone mais n'exclut pas l'utilisation de ces mêmes polymères à des masses moléculaires différentes ou l'utilisation d'autres polymères. Ainsi, des travaux complémentaires pourraient être menées afin d'étudier les variations de libération de la warfarine en fonction de la masse moléculaire des polymères utilisés. De plus, d'autres polyesters tels que le copolymère d'acide glycolique et d'acide lactique (PLGA) ou d'autres polymères hydrophiles tels que le polyéthylène glycol pourraient être testés. Enfin, le concept de microparticules composites (nanoparticules de principe actif encapsulées dans des microparticules) développé par Hasan et coll. [217] pourrait être appliqué à la warfarine afin d'en réduire sa libération initiale importante. Là encore, de nombreux travaux peuvent être envisagés afin d'optimiser la libération de la warfarine à partir des microparticules.

En amont des études menées chez l'animal, nous avons procédé à l'évaluation de la resuspension des microparticules de warfarine dans différents milieux, étape importante pour la précision et la reproductibilité des doses administrées. Les deux milieux testés furent une solution physiologique de chlorure de sodium à 0,9 % et un diluant composé de carboxyméthyl cellulose, de mannitol et de monooléate de polyoxyéthylène sorbitane. Les profils de dissolution *in vitro* de la warfarine dans ces deux milieux sont présentés dans les figures 44 et 45. L'utilisation du diluant a permis l'obtention d'une suspension stable et homogène de microparticules et a conduit à la libération d'une quantité relativement importante de warfarine, de l'ordre de 18 % dès les cinq premières minutes. De plus, pour des périodes de temps supérieures à 8 heures, une dégradation de la warfarine a pu être observée dans ce milieu. Contrairement au diluant, l'utilisation d'une solution physiologique de chlorure de sodium à 0,9 % a conduit à une libération *in vitro* initiale de warfarine relativement faible, de l'ordre de 1 % à 5 minutes, et à une suspension homogène mais peu stable de microparticules. La dégradation du principe actif qui était survenue dans le diluant n'a pas été retrouvée dans la solution de chlorure de sodium.

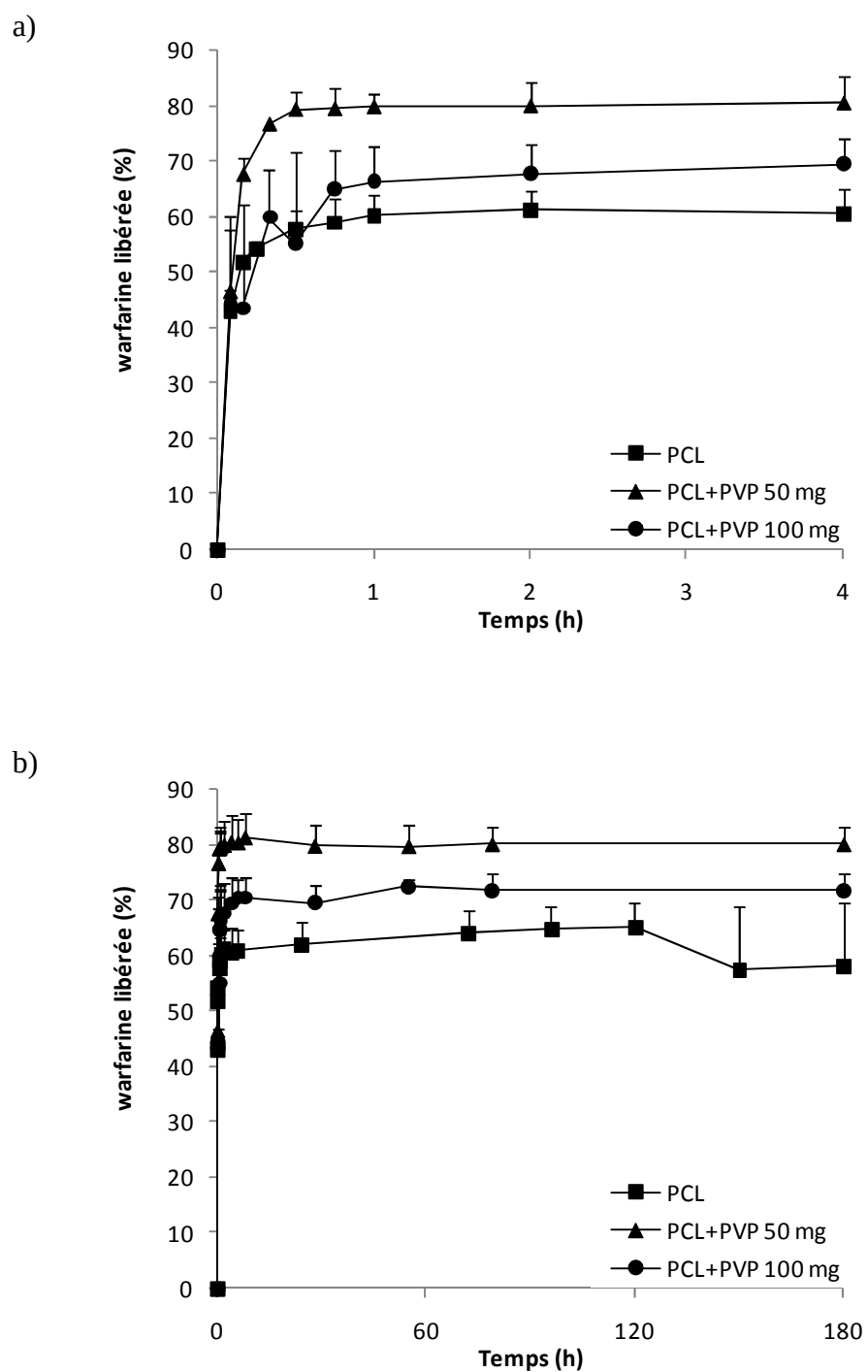


Figure 43 : Etude de dissolution *in vitro* en milieu tampon phosphate à pH 7,4 (n=3).

a) Temps de 0 à 4 heures.

b) Temps de 0 à 180 heures.

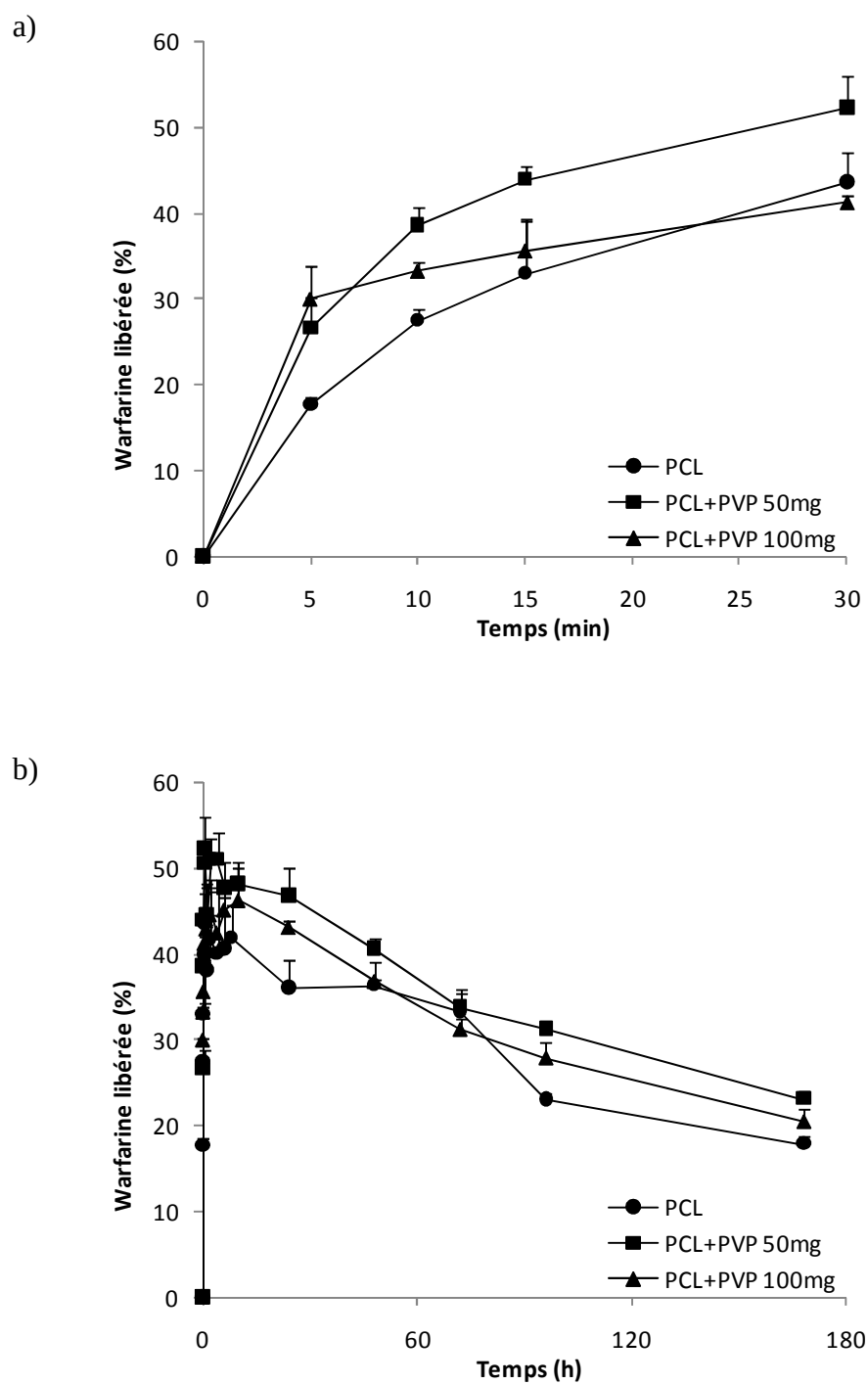


Figure 44 : Etude de dissolution *in vitro* dans un diluant (n=3).

a) Temps de 0 à 4 heures.

b) Temps de 0 à 180 heures.

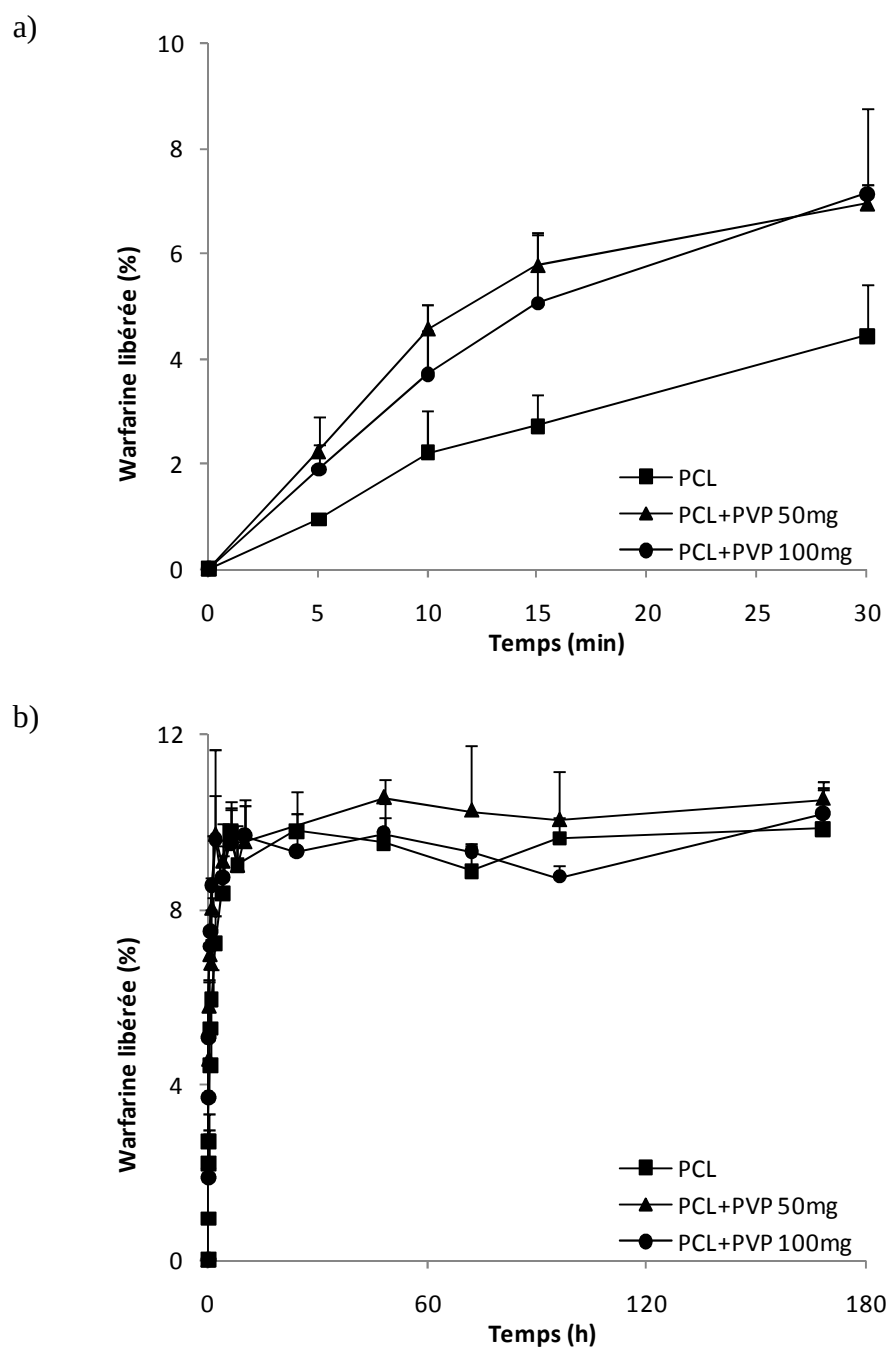


Figure 45 : Etude de dissolution *in vitro* en milieu NaCl 0,9 % (n=3).

a) Temps de 0 à 4 heures.

b) Temps de 0 à 180 heures.

La dernière partie de ce travail concerne l'activité anticoagulante de la warfarine libérée des microparticules de poly- ϵ -caprolactone après leur administration à des lapins par voie sous-cutanée. Au regard des cinétiques de libération *in vitro*, seules les microparticules de poly- ϵ -caprolactone qui présentaient les pourcentages de libération les plus faibles furent testées chez l'animal.

Après administration de la warfarine sous forme de solution ou de microparticules, un pic de concentration plasmatique a pu être observé (Figure 46). Dans le cas des microparticules, ce pic de concentration fut suivi d'une libération constante de warfarine à des concentrations faibles. Les deux phases du profil de libération *in vivo* de la warfarine rappellent les deux phases de son profil de libération *in vitro*. Ainsi, peut-être existe-t-il une première corrélation entre le pic de concentration plasmatique obtenu rapidement après l'administration des microparticules et la libération initiale importante des molécules de warfarine disposées près de la surface des particules ; et une autre corrélation entre la libération tardive de warfarine à de faibles concentrations plasmatiques et la diffusion tardive des molécules de principe actif à travers la matrice polymérique. Concernant la warfarine sous forme de suspension, seule la suspension de warfarine dans le diluant a conduit à un pic de concentration plasmatique ce qui évoque un rôle favorable de ce milieu à la solubilisation et à l'absorption sous-cutanée de la warfarine. Cette tendance semble se confirmer au regard des concentrations plasmatiques maximales obtenues après resuspension des microparticules dans ces différents milieux : $1,17 \pm 0,50 \mu\text{g/ml}$ dans le cas de la solution de chlorure de sodium et $2,36 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$ dans le cas du diluant (Tableau 10). Cependant, ni la détermination des paramètres pharmacocinétiques ni le calcul des INR n'ont permis de démontrer de façon significative un effet différent de ces deux milieux sur la libération *in vivo* de la warfarine ainsi que sur son activité anticoagulante. L'étude chez l'animal n'a également permis d'établir aucune différence significative entre les microparticules et la solution de warfarine tant sur le plan des concentrations plasmatiques que sur le plan des activités anticoagulantes. Enfin, même si une différence semble exister entre les microparticules et les suspensions de warfarine du point de vue des concentrations plasmatiques, cette différence n'a pas été retrouvée au niveau de l'activité anticoagulante. Cette faible corrélation entre concentration plasmatique et INR a déjà été rapportée [218, 219] et peut remettre en cause les conclusions de certains travaux réalisés dans le domaine de la mise au point de systèmes à libération prolongée de warfarine tels que l'étude de

Zacchigna [197] où seules les concentrations plasmatiques avaient été déterminées. Dans la pratique clinique, la surveillance des traitements par antagonistes de la vitamine K est réalisée par la mesure de l'INR. Cependant, dans le cas du développement d'une nouvelle forme pharmaceutique, il est intéressant de procéder également à la détermination des concentrations plasmatiques. Ainsi, dans notre étude cette double détermination nous a permis de dégager certaines tendances. Dans le cas du diluant, l'administration de warfarine sous forme de solution, de suspension ou de microparticules permet l'obtention d'un pic de concentration plasmatique. Cependant, ces pics de concentration dont les valeurs s'échelonnent entre 1,09 µg/ml et 2,36 µg/ml ne permettent pas l'obtention de différences du point de vue de l'activité anticoagulante. De même, la faible concentration plasmatique obtenue après administration de la poudre de warfarine suspendue dans la solution de chlorure de sodium fut associée à des valeurs d'INR à la limite du seuil thérapeutique (INR=2). Un pic de concentration plasmatique ne semble donc pas nécessaire à l'activité anticoagulante de la warfarine administrée par voie sous-cutanée. Une valeur de concentration comprise entre 0,5 et 1,0 µg/ml semble suffisante pour une activité anticoagulante idéale (INR compris entre 2 et 3). Enfin, la quantité de warfarine libérée tardivement des microparticules, de l'ordre de 0,2 µg/ml, n'est pas suffisante au maintien de l'activité anticoagulante. Aussi, un système de libération prolongée de warfarine doit permettre d'obtenir des valeurs de concentrations plasmatiques supérieures à 0,2 µg/ml.

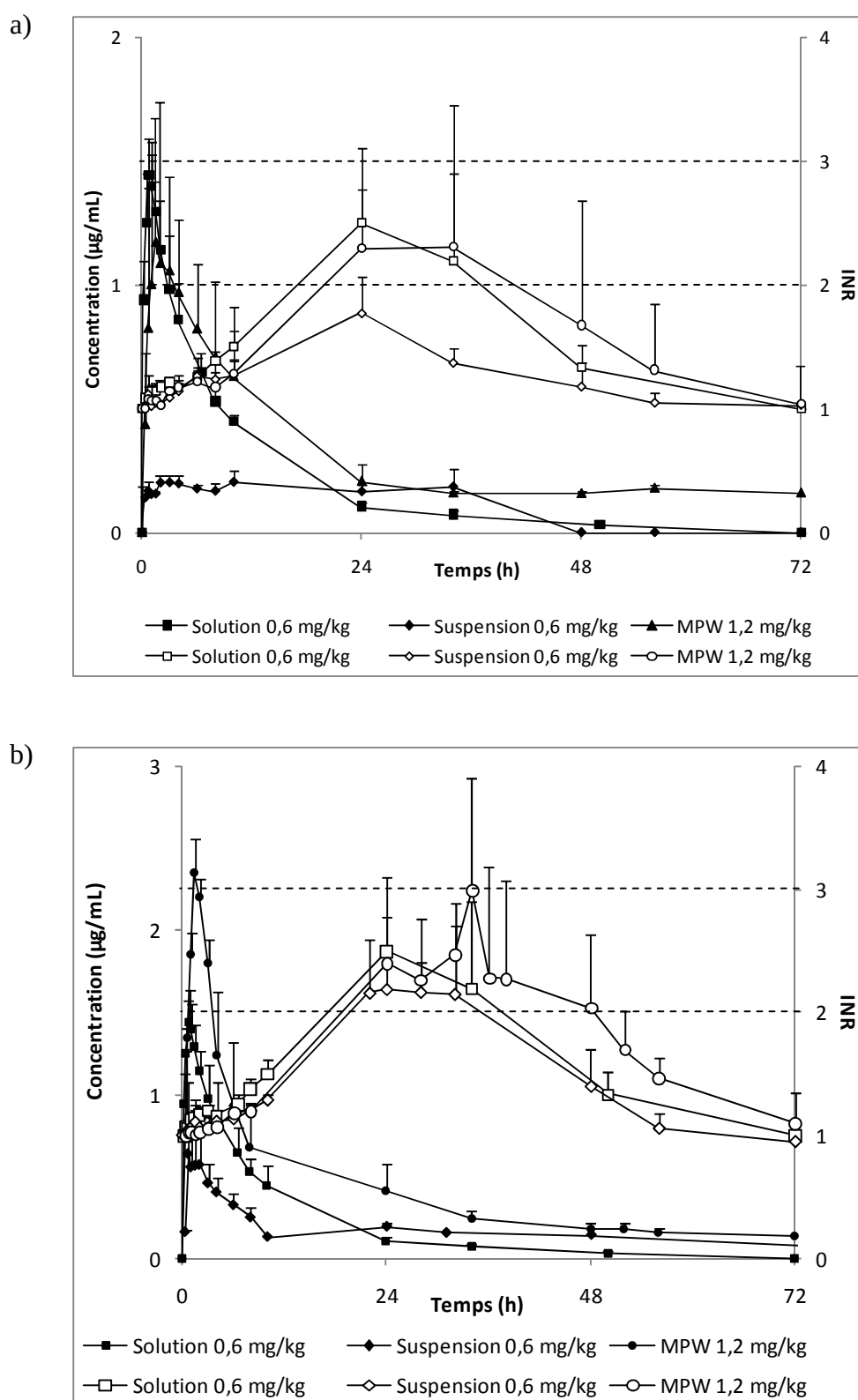


Figure 46 : Concentrations plasmatiques de warfarine et INR obtenus après administration sous-cutanée des microparticules de warfarine à des lapins (n=3).

a) Microparticules suspendues dans la solution de NaCl 0,9%.

b) Microparticules suspendues dans le diluant.

Tableau 10 : Paramètres pharmacocinétiques obtenus après administration des microparticules aux lapins (n=3).

a) Microparticules suspendues dans la solution de NaCl 0,9 %.

Paramètres		Solution de Warfarine	Suspension de Warfarine	Microparticules de Warfarine
		PBS/EtOH 10 %	NaCl 0,9 %	NaCl 0,9 %
Concentration plasmatique	$T_{\max}$ (h)	0,75	3	1,50
	$C_{\max}$ (µg/mL)	1,44 ± 0,20	0,20 ± 0,03	1,17 ± 0,50
	$AUC_{0 \text{ to } 72h}$ (µg/mL/kg)	3,47 ± 0,20	1,88 ± 0,65	6,39 ± 1,29
	F_{72h} (%)	100	54,2 ± 18,8	92,1 ± 18,6
Activité biologique (INR)	$T_{\max}$ (h)	24	24	34
	$INR_{\max}$	2,5 ± 0,6	1,8 ± 0,3	2,3 ± 1,1
	$AUC_{0 \text{ to } 72h}$	44,5 ± 13,8	19,9 ± 6,5	47,0 ± 40,2
	F_{72h} (%)	100	44,8 ± 14,7	52,8 ± 38,2
	$2 < INR < 3$ (h)	21	0	22

b) Microparticules suspendues dans le diluant.

Paramètres		Solution de Warfarine	Suspension de Warfarine	Microparticules de Warfarine
		PBS/EtOH 10 %	Diluant	Diluant
Concentration plasmatique	$T_{\max}$ (h)	0,75	1	1,50
	$C_{\max}$ (µg/mL)	1,44 ± 0,20	1,09 ± 0,51	2,36 ± 0,20
	$AUC_{0 \text{ to } 72h}$ (µg/mL/kg)	3,47 ± 0,20	5,05 ± 1,24	7,70 ± 2,50
	F_{72h} (%)	100	145,6 ± 35,6	117,1 ± 37,9
Activité biologique (INR)	$T_{\max}$ (h)	24	24	34
	$INR_{\max}$	2,5 ± 0,6	2,2 ± 0,3	3,0 ± 0,9
	$AUC_{0 \text{ to } 72h}$	44,5 ± 13,8	50,0 ± 18,8	55,9 ± 12,8
	F_{72h} (%)	100	112,4 ± 42,2	62,8 ± 14,3
	$2 < INR < 3$ (h)	21	15,5	30

Références

1. De Caterina R, Husted S, Wallentin L, et al.
Anticoagulants in heart disease: current status and perspectives.
Eur Heart J 2007; **28**: 880-913.

2. Haas S.
New oral Xa and IIa inhibitors: updates on clinical trial results.
J Thromb Thrombolysis 2008; **25**: 52-60.

3. Khoo CW, Tay KH, Shantsila E et Lip GY.
Novel oral anticoagulants.
Int J Clin Pract 2009; **63**: 630-41.

4. Monkman K, Lazo-Langner A et Kovacs MJ.
A 10 mg warfarin initiation nomogram is safe and effective in outpatients starting oral anticoagulant therapy for venous thromboembolism.
Thromb Res 2009; **124**: 275-80.

5. Couturaud F et Kearon C.
Optimum duration of anticoagulant treatment after an episode of venous thromboembolism.
Rev Pneumol Clin 2008; **64**: 305-15.

6. AFSSAPS, *Mise au point sur le bon usage des médicaments antivitamine K (AVK).* Avril 2009. p. 18.

7. Kimmel SE, Chen Z, Price M, et al.
The influence of patient adherence on anticoagulation control with warfarin: results from the International Normalized Ratio Adherence and Genetics (IN-RANGE) Study.
Arch Intern Med 2007; **167**: 229-35.

8. Parker CS, Chen Z, Price M, et al.
Adherence to warfarin assessed by electronic pill caps, clinician assessment, and patient reports: results from the IN-RANGE study.
J Gen Intern Med 2007; **22**: 1254-9.

9. Mileti IF et Bajpai PK.
Development of a hydroxyapatite ceramic matrix for the continuous delivery of coumadin.
Biomed Sci Instrum 1995; **31**: 177-182.

10. Tarr ER, Lasserre A, Szmulowicz U et Bajpai PK.
A hydroxyapatite system for the continuous release of coumadin an anticoagulant.
Biomed Sci Instrum 1997; **33**: 143-8.

11. Barbato F, La Rotonda MI, Maglio G, Palumbo R et Quaglia F.
Biodegradable microspheres of novel segmented poly(ether-ester-amide)s based on poly(epsilon-caprolactone) for the delivery of bioactive compounds.
Biomaterials 2001; **22**: 1371-8.

12. Mathiowitz E, Jacob JS, Jong YS, et al.
Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems.
Nature 1997; **386**: 410-4.

13. Zacchigna M, Di Luca G, Cateni F et Maurich V.
Improvement of warfarin biopharmaceutics by conjugation with poly(ethylene glycol).
Eur J Pharm Sci 2004; **23**: 379-84.

14. Ammar HO, Ghorab M, El-Nahhas SA et Makram TS.
Improvement of the biological performance of oral anticoagulant drugs. 1. Warfarin.
Pharmazie 1997; **52**: 627-631.

-
15. Lin SY et Yang JC.
Inclusion complexation of warfarin with cyclodextrins to improve some pharmaceutical characteristics.
Pharm Weekbl Sci 1986; **8**: 223-8.

 16. Zingone G et Rubessa F.
Preformulation study of the inclusion complex warfarin-beta-cyclodextrin.
Int J Pharm 2005; **291**: 3-10.

 17. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R et Trehan A.
Poly-[epsilon]-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview.
Int J Pharm 2004; **278**: 1-23.

 18. Wang X, Wang Y, Wei K, et al.
Drug distribution within poly(ε-caprolactone) microspheres and in vitro release.
J Mater Process Technol 2009; **209**: 348-354.

 19. Raguime JA, Arthanareeswaran G, Thanikaivelan P, Mohan D et Raajenthiren M.
Performance characterization of cellulose acetate and poly(vinylpyrrolidone) blend membranes.
J Appl Polym Sci 2007; **104**: 3042-3049.

 20. Moneghini M, Carcano A, Zingone G et Perissutti B.
Studies in dissolution enhancement of atenolol. Part I.
Int J Pharm 1998; **175**: 177-183.

 21. Gupta P, Thilagavathi R, Chakraborti AK et Bansal AK.
Role of molecular interaction in stability of celecoxib-PVP amorphous systems.
Mol Pharm 2005; **2**: 384-391.

 22. Lafreniere LY, Talbot FDF, Matsuura T et Sourirajan S.
Effect of polyvinylpyrrolidone additive on the performance of polyethersulfone ultrafiltration membranes.
Ind Eng Chem Res 1987; **26**: 2385-2389.

23. Torres MR, Soriano E, de Abajo J et dela Campa JG.
Comparative study of the behaviour of experimental polyamide UF membranes. The effect of polyvinylpyrrolidone used as an additive.
J Memb Sci 1993; **81**: 31-42.
24. Hasan AS, Socha M, Lamprecht A, et al.
Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release.
Int J Pharm 2007; **344**: 53-61.
25. Sun S, Wang M, Su L, et al.
Study on warfarin plasma concentration and its correlation with international normalized ratio.
J Pharm Biomed Anal 2006; **42**: 218-222.
26. Lombardi R, Chantarangkul V, Cattaneo M et Tripodi A.
Measurement of warfarin in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) and its correlation with the international normalized ratio.
Thromb Res 2003; **111**: 281-284.

CONCLUSION

Les maladies cardiovasculaires consécutives à des accidents thromboemboliques représentent un véritable problème de santé publique tant par leur fréquence que par leur gravité. Utilisés pour la prévention ou pour le traitement des thromboses, les héparines et les antagonistes de la vitamine K constituent les deux pierres angulaires du traitement anticoagulant médicamenteux. Ces molécules présentent cependant certains inconvénients pouvant limiter leur utilisation : administration parentérale pour les héparines et risque iatrogène important pour les antagonistes de la vitamine K. Devant ces limitations, des travaux ont été menés tant en clinique pour optimiser les protocoles de traitement qu'en développement pharmaceutique pour rechercher de nouvelles molécules ou de nouvelles formes d'administration. Les granulés, les pellets ou les microparticules que nous avons mis au point dans nos différents travaux s'inscrivent dans la continuité de ces études.

Faciles à fabriquer et n'utilisant aucun solvant organique, les granulés et les pellets d'héparines de bas poids moléculaire ont permis l'obtention d'activités anti-Xa supérieures au seuil thérapeutique de 0,2 U anti-Xa/ml après leur administration orale chez le lapin. Par ses propriétés mucoadhésives, l'Eudragit®RS30D, semble jouer un rôle important tant sur la libération des héparines que sur leur absorption par voie entérale. La conservation de l'activité biologique des héparines, jusqu'à 4 et 7 mois respectivement pour les granulés et les pellets, constitue un véritable progrès par rapport aux nano- ou aux microparticules. Même si un développement plus poussé de ces formes devra inéluctablement répondre à la question de la perte de l'activité biologique au cours du temps, ces deux nouvelles formes n'en sont pas moins prometteuses.

Notre dernière étude a permis de montrer la faisabilité de la fabrication de microparticules de warfarine à base de poly-ε-caprolactone. L'incorporation de polyvinyl pyrrolidone au sein de la matrice polymérique a permis d'augmenter la quantité de principe actif libéré de 60 à 80 %. Après administration des microparticules par voie sous-cutanée, les concentrations plasmatiques de warfarine ainsi que les INR furent déterminées. Même si ce travail n'a pas permis d'obtenir un système de libération prolongée de warfarine parfaitement abouti (faible taux d'encapsulation, libération initiale importante), il peut cependant être utilisé comme base de travail à des études ultérieures. De nombreux points relatifs à la fabrication des microparticules méritent d'être étudiés afin d'augmenter les taux d'encapsulation, de diminuer la libération initiale importante de warfarine et permettre une

concentration plasmatique constante supérieure à 0,5 µg/ml, gage d'une activité anticoagulante dans la zone thérapeutique. Ces résultats préliminaires développés par rapport à la voie sous-cutanée peuvent constituer une base de travail pour la mise au point soit de microparticules destinées à d'autres voies telles que la voie orale, plus rationnelle pour une utilisation clinique, soit d'autres systèmes utilisant la voie sous-cutanée comme les implants, déjà utilisés pour d'autres principes actifs administrés au long cours (contraceptifs, hormones, antinéoplasiques).

Enfin, devant les limitations du traitement anticoagulant classique, les dernières années ont vu le développement d'inhibiteurs directs ou indirects du facteur Xa et d'inhibiteurs directs de la thrombine. Même si ces molécules semblent prometteuses, des molécules comme le fondaparinux ou l'idraparinux ne peuvent être administrées que par voie parentérale. Quant aux inhibiteurs directs des facteurs Xa et IIa, ils présentent l'inconvénient d'une administration quotidienne d'une ou plusieurs doses pouvant aboutir à une mauvaise observance du patient à son traitement. Les systèmes développés et mis au point dans nos travaux peuvent non seulement être appliqués aux molécules anticoagulantes classiques mais également aux nouvelles molécules anticoagulantes et plus largement encore à toute molécule à faible absorption entérale ou nécessitant une libération prolongée afin d'en augmenter l'observance lors d'un traitement au long cours.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. van der Putten RF, Glatz JF, Hermens WT.
Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes.
Clin Chim Acta 2006; **371**: 37-54.
2. Ajjan R, Grant PJ.
Coagulation and atherothrombotic disease.
Atherosclerosis 2006; **186**: 240-59.
3. Edgington TS, Dickinson CD, Ruf W.
The structural basis of function of the TF. VIIa complex in the cellular initiation of coagulation.
Thromb Haemost 1997; **78**: 401-5.
4. Coughlin SR.
How the protease thrombin talks to cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 1999; **96**: 11023-7.
5. Keller FG, Ortel TL, Quinn-Allen MA, Kane WH.
Thrombin-catalyzed activation of recombinant human factor V.
Biochemistry 1995; **34**: 4118-24.
6. Nogami K, Shima M, Hosokawa K, et al.
Factor VIII C2 domain contains the thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at Arg1689.
J Biol Chem 2000; **275**: 25774-80.
7. Gailani D, Broze GJ, Jr.
Factor XI activation by thrombin and factor XIa.
Semin Thromb Hemost 1993; **19**: 396-404.
8. Xi M, Beguin S, Hemker HC.
Importance of factor-IX-dependent prothrombinase formation--the Josso pathway--in clotting plasma.
Haemostasis 1989; **19**: 301-8.
9. Colman RW, Schmaier AH.
Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes.
Blood 1997; **90**: 3819-43.
10. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA.
The structure and biological features of fibrinogen and fibrin.
Ann N Y Acad Sci 2001; **936**: 11-30.
11. Jin L, Abrahams JP, Skinner R, et al.
The anticoagulant activation of antithrombin by heparin.
Proc Natl Acad Sci U S A 1997; **94**: 14683-8.

12. Maekawa H, Tollefsen DM.
Role of the proposed serpin-enzyme complex receptor recognition site in binding and internalization of thrombin-heparin cofactor II complexes by hepatocytes.
J Biol Chem 1996; **271**: 18604-9.
13. Esmon CT.
Regulation of blood coagulation.
Biochim Biophys Acta 2000; **1477**: 349-60.
14. O'Brien LM, Mastri M, Fay PJ.
Regulation of factor VIIIa by human activated protein C and protein S: inactivation of cofactor in the intrinsic factor Xase.
Blood 2000; **95**: 1714-20.
15. Baugh RJ, Broze GJ, Jr., Krishnaswamy S.
Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor.
J Biol Chem 1998; **273**: 4378-86.
16. Bombeli T, Mueller M, Haeberli A.
Anticoagulant properties of the vascular endothelium.
Thromb Haemost 1997; **77**: 408-23.
17. Bénard E, Lafuma A, Ravaud P.
Epidemiology of venous thromboembolic disease.
Presse med 2005; **34**: 415-9.
18. Jaffer AK.
An overview of venous thromboembolism: impact, risks, and issues in prophylaxis.
Cleve Clin J Med 2008; **75 Suppl 3**: S3-6.
19. Heit JA.
The epidemiology of venous thromboembolism in the community.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; **28**: 370-2.
20. Lopez JA, Kearon C, Lee AY.
Deep venous thrombosis.
Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2004: 439-56.
21. Kyrle PA, Eichinger S.
Deep vein thrombosis.
Lancet 2005; **365**: 1163-74.
22. Bagot CN, Arya R.
Virchow and his triad: a question of attribution.
Br J Haematol 2008; **143**: 180-90.
23. Meissner MH, Wakefield TW, Ascher E, et al.
Acute venous disease: venous thrombosis and venous trauma.
J Vasc Surg 2007; **46 Suppl S**: 25S-53S.

24. Armand-Perroux A, Barrellier MT.
La thrombose veineuse : quoi de neuf ?
Réanimation 2008; **17**: 736-44.
25. Wakefield TW, Henke PK.
The role of inflammation in early and late venous thrombosis: Are there clinical implications?
Semin Vasc Surg 2005; **18**: 118-29.
26. Walenga JM, Jeske WP, Messmore HL.
Mechanisms of venous and arterial thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia.
J Thromb Thrombolysis 2000; **10 Suppl 1**: 13-20.
27. Morel O, Morel N, Hugel B, et al.
The significance of circulating microparticles in physiology, inflammatory and thrombotic diseases.
Rev Med Interne 2005; **26**: 791-801.
28. Wakefield TW, Myers DD, Henke PK.
Mechanisms of venous thrombosis and resolution.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; **28**: 387-91.
29. Henke PK, Wakefield T.
Thrombus resolution and vein wall injury: dependence on chemokines and leukocytes.
Thrombosis Research 2009; **123**: S72-S8.
30. Piazza G, Goldhaber SZ.
Acute pulmonary embolism: part I: epidemiology and diagnosis.
Circulation 2006; **114**: e28-32.
31. Goldhaber SZ, Elliott CG.
Acute pulmonary embolism: part I: epidemiology, pathophysiology, and diagnosis.
Circulation 2003; **108**: 2726-9.
32. Perrin M, Gillet JL, Guex JJ, *Syndrome post-thrombotique*, in *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Angéiologie*, Elsevier, Editor. 2003: Paris. p. 19-2040, 12 p.
33. Geerts WH, Bergqvist D, Pineo GF, et al.
Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition).
Chest 2008; **133**: 381S-453S.
34. Leclerc JR.
Strategies for prevention of pulmonary embolism during at-risk surgeries and in the medical environment.
Rev Mal Respir 1999; **16**: 939-48.
35. Hirsh J, Guyatt G, Albers GW, Harrington R, Schünemann HJ.
*Antithrombotic and Thrombolytic Therapy**.
Chest 2008; **133**: 110S-2S.

36. McLean J.
The thromboplastic action of cephalin.
Am J Physiol 1916; **41**: 250-7.
37. Brinkhous KM, Smith HP, Jr., Warner ED, Seegers WH.
Heparin and Blood Clotting.
Science 1939; **90**: 539.
38. Abildgaard U.
Highly purified antithrombin 3 with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis.
Scand J Clin Lab Invest 1968; **21**: 89-91.
39. Rosenberg RD, Lam L.
Correlation between structure and function of heparin.
Proc Natl Acad Sci U S A 1979; **76**: 1218-22.
40. Rosenberg RD.
Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism.
Am J Med 1989; **87**: 2S-9S.
41. Lindahl U, Backstrom G, Hook M, et al.
Structure of the antithrombin-binding site in heparin.
Proc Natl Acad Sci U S A 1979; **76**: 3198-202.
42. Samama M, Babinet-Berthier A.
The new heparins.
J Mal Vasc 1992; **17**: 91-106.
43. Casu B, Gennaro U.
A conductimetric method for the determination of sulphate and carboxyl groups in heparin and other mucopolysaccharides.
Carbohydr Res 1975; **39**: 168-76.
44. Casu B.
Structure and conformation of polysaccharides by NMR spectroscopy.
Carbohydr Polym 1982; **2**: 247-53.
45. Casu B, *Heparin, chemical and biological properties, clinical application*, ed. D. Lane and U. Lindahl. 1989, Boca Raton, Florida: CRC Press. 25-49.
46. Radoff S, Danishefsky I.
Location on heparin of the oligosaccharide section essential for anticoagulant activity.
J Biol Chem 1984; **259**: 166-72.

47. Volpi N.
Characterization of heparins with different relative molecular masses (from 11,600 to 1600) by various analytical techniques.
J Chromatogr 1993; **622**: 13-20.
48. Tyrrell DJ, Kilfeather S, Page CP.
Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant.
Trends Pharmacol Sci 1995; **16**: 198-204.
49. Choay J.
A new approach of chemistry of heparine and its fragments: Structure and synthesis.
Angiologie 1986; **38**: 123-32.
50. Casu B, Oreste P, Torri G.
The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and ¹³C nuclear-magnetic-resonance studies.
Biochem J 1981; **197**: 599-609.
51. Dubois JP, *L'héparine. Fabrication, structure, propriétés, analyses.* 1984, Paris: Masson. 414.
52. Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Soderstrom G.
Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma.
Thromb Res 1979; **15**: 531-41.
53. Elalamy I, Horellou MH, Samama MM.
Pharmacological characteristics of heparins.
Sem Hop 1995; **71**: 389-400.
54. Hirsh J, Raschke R.
Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy.
Chest 2004; **126**: 188S-203S.
55. Bachmann F, *Anticoagulants et thrombolytiques.*, in *Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques.*, M. Schorderet, Editor. 1992: Genève. p. 267-85.
56. Maimone MM, Tollefsen DM.
Activation of heparin cofactor II by heparin oligosaccharides.
Biochem Biophys Res Commun 1988; **152**: 1056-61.
57. Weitz JI, Young E, Johnston M, et al.
Vasoflux, a new anticoagulant with a novel mechanism of action.
Circulation 1999; **99**: 682-9.

58. Castellot Jr JJ, Choay J, Lormeau JC.
Structural determinants of the capacity of heparin to inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells. II. Evidence for a pentasaccharide sequence that contains a 3-O-sulfate group.
J Cell Biol 1986; **102**: 1979-84.
59. Barzu T, Lormeau JC, Petitou M, Michelson S, Choay J.
Heparin-derived oligosaccharides: Affinity for acidic fibroblast growth factor and effect on its growth-promoting activity for human endothelial cells.
J Cell Physiol 1989; **140**: 538-48.
60. Samama MM, Kher A.
Effects of standard heparin and low molecular weight heparins on fibrinolysis. Stimulation of artefact?
Sang Thrombose Vaisseaux 1992; **4**: 455-7.
61. Decousus H, Mismetti P.
Anticoagulants: Heparin.
Rev Prat 1995; **45**: 1009-13.
62. Hull RD, Raskob GE, Hirsh J, et al.
Continuous intravenous heparin compared with intermittent subcutaneous heparin in the initial treatment of proximal-vein thrombosis.
N Engl J Med 1986; **315**: 1109-14.
63. Hirsh J, van Aken WG, Gallus AS, et al.
Heparin kinetics in venous thrombosis and pulmonary embolism.
Circulation 1976; **53**: 691-5.
64. Young E, Prins M, Levine MN, Hirsh J.
Heparin binding to plasma proteins, an important mechanism for heparin resistance.
Thromb Haemost 1992; **67**: 639-43.
65. Barzu T, Molho P, Tobelem G, Petitou M, Caen J.
Binding and endocytosis of heparin by human endothelial cells in culture.
Biochim Biophys Acta 1985; **845**: 196-203.
66. Norrby K.
Low-molecular-weight heparins and angiogenesis.
APMIS 2006; **114**: 79-102.
67. Olsson P, Lagergren H, Ek S.
The elimination from plasma of intravenous heparin. An experimental study on dogs and humans.
Acta Med Scand 1963; **173**: 619-30.
68. De Swart CAM, Nijmeyer B, Roelofs JMM, Sixma JJ.
Kinetics of intravenously administered heparin in normal humans.
Blood 1982; **60**: 1251-8.

69. Bjornsson TD, Wolfram KM, Kitchell BB.
Heparin kinetics determined by three assay methods.
Clin Pharmacol Ther 1982; **31**: 104-13.
70. Glimelius B, Busch C, Hook M.
Binding of heparin on the surface of cultured human endothelial cells.
Thromb Res 1978; **12**: 773-82.
71. Mahadoo J, Heibert L, Jaques LB.
Vascular sequestration of heparin.
Thromb Res 1978; **12**: 79-90.
72. Friedman Y, Arsenis C.
Studies on the heparin sulphamidase activity from rat spleen. Intracellular distribution and characterization of the enzyme.
Biochem J 1974; **139**: 699-708.
73. Dawes J, Papper DS.
Catabolism of low-dose heparin in man.
Thromb Res 1979; **14**: 845-60.
74. Hirsh J.
Heparin.
N Engl J Med 1991; **324**: 1565-74.
75. Hetzel GR, Sucker C.
The heparins: all a nephrologist should know.
Nephrol Dial Transplant 2005; **20**: 2036-42.
76. Levine MN, Raskob G, Beyth RJ, Kearon C, Schulman S.
Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy.
Chest 2004; **126**: 287S-310S.
77. Schulman S, Beyth RJ, Kearon C, Levine MN.
Hemorrhagic complications of anticoagulant and thrombolytic treatment: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition).
Chest 2008; **133**: 257S-98S.
78. Keeling D, Davidson S, Watson H.
The management of heparin-induced thrombocytopenia.
Br J Haematol 2006; **133**: 259-69.
79. Lee DH, Warkentin TE, *Frequency of heparin induced thrombocytopenia.*, W. T.E. and G. A., Editors. 2004, Marcel Dekker: New York. p. 107-48.

80. Girolami B, Prandoni P, Stefani PM, et al.
The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in hospitalized medical patients treated with subcutaneous unfractionated heparin: a prospective cohort study.
Blood 2003; **101**: 2955-9.
81. Prandoni P, Siragusa S, Girolami B, Fabris F.
The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in medical patients treated with low-molecular-weight heparin: a prospective cohort study.
Blood 2005; **106**: 3049-54.
82. Martel N, Lee J, Wells PS.
Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis.
Blood 2005; **106**: 2710-5.
83. Lindhoff-Last E, Nakov R, Misselwitz F, Breddin HK, Bauersachs R.
Incidence and clinical relevance of heparin-induced antibodies in patients with deep vein thrombosis treated with unfractionated or low-molecular-weight heparin.
Br J Haematol 2002; **118**: 1137-42.
84. Pohl C, Kredteck A, Bastians B, et al.
Heparin-induced thrombocytopenia in neurologic patients treated with low-molecular-weight heparin.
Neurology 2005; **64**: 1285-7.
85. Warkentin TE, Kelton JG.
Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia.
N Engl J Med 2001; **344**: 1286-92.
86. Warkentin TE.
Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management.
Br J Haematol 2003; **121**: 535-55.
87. Rauova L, Poncz M, McKenzie SE, et al.
Ultralarge complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia.
Blood 2005; **105**: 131-8.
88. Horsewood P, Warkentin TE, Hayward CP, Kelton JG.
The epitope specificity of heparin-induced thrombocytopenia.
Br J Haematol 1996; **95**: 161-7.
89. Gennari C, Martini G, Nuti R.
Secondary osteoporosis.
Aging 1998; **10**: 214-24.
90. Guevara A, Labarca J, Gonzalez-Martin G.
Heparin-induced transaminase elevations: a prospective study.
Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 1993; **31**: 137-41.

91. Mathelier-Fusade P, Deschamps A, Abuaf N, Leynadier F.
Skin reactions to heparin: Immunologic and clinical features.
Presse Med 1995; **24**: 323-5.
92. Arnold J, Cohen H.
Heparin-induced skin necrosis.
Br J Haematol 2000; **111**: 992.
93. Harenberg J.
Pharmacology of low molecular weight heparins.
Semin Thromb Hemost 1990; **16 Suppl**: 12-8.
94. Johnson EA, Kirkwood TB, Stirling Y, et al.
Four heparin preparations: anti-Xa potentiating effect of heparin after subcutaneous injection.
Thromb Haemost 1976; **35**: 586-91.
95. Bergqvist D, Nilsson B, Hedner U, Pedersen PC, Ostergaard PB.
The effect of heparin fragments of different molecular weights on experimental thrombosis and haemostasis.
Thromb Res 1985; **38**: 589-601.
96. Carter CJ, Kelton JG, Hirsh J.
The relationship between the hemorrhagic and antithrombotic properties of low molecular weight heparin in rabbits.
Blood 1982; **59**: 1239-45.
97. Bara L, Samama M.
Pharmacokinetics of low molecular weight heparins.
Acta Chir Scand Suppl 1988; **543**: 65-72.
98. Bradbrook ID, Magnani HN, Moelker HC, et al.
ORG 10172: a low molecular weight heparinoid anticoagulant with a long half-life in man.
Br J Clin Pharmacol 1987; **23**: 667-75.
99. Bratt G, Tornebohm E, Widlund L, Lockner D.
Low molecular weight heparin (KABI 2165, Fragmin): pharmacokinetics after intravenous and subcutaneous administration in human volunteers.
Thromb Res 1986; **42**: 613-20.
100. Briant L, Caranobe C, Saivin S, et al.
unfractionated heparin and CY 216: Pharmacokinetics and bioavailabilities of the antifactor Xa and IIa effects after intravenous and subcutaneous injection in the rabbit.
Thromb Haemost 1989; **61**: 348-53.

101. Frydman AM, Bara L, Le Roux Y, et al.
The antithrombotic activity and pharmacokinetics of enoxaparine, a low molecular weight heparin, in humans given single subcutaneous doses of 20 to 80 mg.
J Clin Pharmacol 1988; **28**: 609-18.
102. Matzsch T, Bergqvist D, Hedner U, Ostergaard P.
Effects of an enzymatically depolymerized heparin as compared with conventional heparin in healthy volunteers.
Thromb Haemost 1987; **57**: 97-101.
103. Hemker HC, Beguin S, Kakkar VV.
Can the haemorrhagic component of heparin be identified? Or an attempt at clean thinking on a dirty drug.
Haemostasis 1996; **26**: 117-26.
104. Mukherjee D, Topol EJ.
The role of low-molecular-weight heparin in cardiovascular diseases.
Prog Cardiovasc Dis 2002; **45**: 139-56.
105. Handeland GF, Abildgaard U, Holm HA, Arnesen KE.
Dose adjusted heparin treatment of deep venous thrombosis: a comparison of unfractionated and low molecular weight heparin.
Eur J Clin Pharmacol 1990; **39**: 107-12.
106. Boneu B, Caranobe C, Cadroy Y, et al.
Pharmacokinetic studies of standard unfractionated heparin, and low molecular weight heparins in the rabbit.
Semin Thromb Hemost 1988; **14**: 18-27.
107. Palm M, Mattsson C.
Pharmacokinetics of heparin and low molecular weight heparin fragment (Fragmin) in rabbits with impaired renal or metabolic clearance.
Thromb Haemost 1987; **58**: 932-5.
108. Hirsh J, Levine MN.
Low molecular weight heparin.
Blood 1992; **79**: 1-17.
109. Weitz JI.
Low-molecular-weight heparins.
N Engl J Med 1997; **337**: 688-98.
110. Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, et al.
Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin.
N Engl J Med 1995; **332**: 1330 - 5.

111. Shaughnessy SG, Young E, Deschamps P, Hirsh J.
The effects of low molecular weight and standard heparin on calcium loss from fetal rat calvaria.
Blood 1995; **86**: 1368-73.
112. Bhandari M, Hirsh J, Weitz JI, et al.
The effects of standard and low molecular weight heparin on bone nodule formation in vitro.
Thromb Haemost 1998; **80**: 413-7.
113. Kim TD, Sakon M, Kawasaki T, et al.
Studies on liposome-encapsulated heparin.
Thromb Res 1986; **43**: 603-12.
114. Daugherty AL, Mrsny RJ.
Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier Part one.
Pharm Sci Technolo Today 1999; **4**: 144-51.
115. Haton C, *Effet des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale.*, in *Physiologie Physiopathologie*. 2005, Paris VI.
116. Daugherty AL, Mrsny RJ.
Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier.
Pharm Sci Technolo Today 1999; **2**: 281-7.
117. Doutremepuich C, Toulemonde F, Kuttler MC, et al.
Oral administration of heparin and low molecular weight heparin fractions in rabbits.
Thérapie 1984; **39**: 147-52.
118. Hiebert LM, Wice SM, McDuffie NM, Jaques LB.
The heparin target organ-the endothelium. Studies in a rat model.
Q J Med 1993; **86**: 341-8.
119. Hiebert LM, Wice SM, Jaques LB.
Antithrombotic activity of oral unfractionated heparin.
J Cardiovasc Pharmacol 1996; **28**: 26-9.
120. Hiebert LM, Wice SM, Ping T, et al.
Tissue distribution and antithrombotic activity of unlabeled or 14C-labeled porcine intestinal mucosal heparin following administration to rats by the oral route.
Can J Physiol Pharmacol 2000; **78**: 307-20.
121. Hiebert LM, Ping T, Wice SM.
Antithrombotic activity of orally administered low molecular weight heparin (Logiparin) in a rat model.
Haemostasis 2000; **30**: 196-203.

122. Hiebert LM, Wice SM, Ping T, Herr D, Laux V.
Antithrombotic efficacy in a rat model of the low molecular weight heparin, reviparin sodium, administered by the oral route.
Thromb Haemost 2001; **85**: 114-8.
123. Costantini V, Deveglio R, Stabile A, Nenci GG.
Absorption and antithrombotic activity of unfractionated heparin after intraduodenal administration in rats.
Blood Coagul Fibrinolysis 2000; **11**: 7-13.
124. Dryjski M, Schneider DE, Mojaverian P, Kuo BS, Bjornsson TD.
Investigations on plasma activity of low molecular weight heparin after intravenous and oral administrations.
Br J Clin Pharmacol 1989; **28**: 188-92.
125. Horwitz O, Johnson WT, Sayen JJ, Roberts B, Whereat AF.
Heparin for oral use: preliminary studies.
Trans Am Clin Climatol Assoc 1993; **104**: 94-102; discussion-3.
126. Windsor E, Cronheim GE.
Gastro-intestinal absorption of heparin and synthetic heparinoids.
Nature 1961; **190**: 263-4.
127. Tidball CS, Lipman RI.
Enhancement of jejunal absorption of heparinoid by sodium ethylenediaminetetraacetate in the dog.
Proc Soc Exp Biol Med 1962; **111**: 713-5.
128. Koh TY.
Intestinal absorption of heparin.
Can J Biochem 1969; **47**: 951-4.
129. Koh TY, Bharucha KR.
Intestinal absorption of stable heparinic acid complexes.
J Lab Clin Med 1972; **80**: 47-55.
130. Morton AK, Edwards HE, Allen JC, Phillips GO.
An evaluation of the oral administration of commercial and fractionated heparin samples in rats.
Int J Pharm 1981; **9**: 321-35.
131. Ziv E, Eldor A, Kleinman Y, Bar-On H, Kidron M.
Bile salts facilitate the absorption of heparin from the intestine.
Biochem Pharmacol 1983; **32**: 773-6.
132. Dal Pozzo A, Acquasaliente M, Geron MR, Andriuoli G.
New heparin complexes active by intestinal absorption: I-multiple ion pairs with basic organic compounds.
Thromb Res 1989; **56**: 119-24.

133. Zoppetti G, Caramazza I, Murakami Y, Ohno T.
Structural requirements for duodenal permeability of heparin-diamine complexes.
Biochim Biophys Acta 1992; **1156**: 92-8.
134. Leone-Bay A, Paton DR, Variano B, et al.
Acylated non-alpha-amino acids as novel agents for the oral delivery of heparin sodium, USP.
J Control Release 1998; **50**: 41-9.
135. Money SR, York JW.
Development of oral heparin therapy for prophylaxis and treatment of deep venous thrombosis.
Cardiovasc Surg 2001; **9**: 211-8.
136. Rivera TM, Leone-Bay A, Paton DR, Leipold HR, Baughman RA.
Oral delivery of heparin in combination with sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate: pharmacological considerations.
Pharm Res 1997; **14**: 1830-4.
137. Baughman RA, Kapoor SC, Agarwal RK, et al.
Oral delivery of anticoagulant doses of heparin. A randomized, double-blind, controlled study in humans.
Circulation 1998; **98**: 1610-5.
138. Gonze MD, Salartash K, Sternbergh WC 3rd, et al.
Orally administered unfractionated heparin with carrier agent is therapeutic for deep venous thrombosis.
Circulation 2000; **101**: 2658-61.
139. Berkowitz SD, Marder VJ, Kosutic G, Baughman RA.
Oral heparin administration with a novel drug delivery agent (SNAC) in healthy volunteers and patients undergoing elective total hip arthroplasty.
J Thromb Haemost 2003; **1**: 1914-9.
140. Hull RD, Kakkar AK, Marder VJ, et al.
Oral SNA-heparin vs enoxaparin for preventing venous thromboembolism following total hip replacement.
J Thromb Haemost 2003; **1 Suppl 1** July: Abstract number.
141. Salartash K, Gonze MD, Leone-Bay A, et al.
Oral low-molecular weight heparin and delivery agent prevents jugular venous thrombosis in the rat.
J Vasc Surg 1999; **30**: 526-31.
142. Salartash K, Lepore M, Gonze MD, et al.
Treatment of experimentally induced caval thrombosis with oral low molecular weight heparin and delivery agent in a porcine model of deep venous thrombosis.
Ann Surg 2000; **231**: 789-94.

143. Lee Y, Kim SH, Byun Y.
Oral delivery of new heparin derivatives in rats.
Pharm Res 2000; **17**: 1259-64.
144. Lee Y, Nam JH, Shin HC, Byun Y.
Conjugation of low-molecular-weight heparin and deoxycholic acid for the development of a new oral anticoagulant agent.
Circulation 2001; **104**: 3116-20.
145. Lee YK, Kim SK, Lee DY, et al.
Efficacy of orally active chemical conjugate of low molecular weight heparin and deoxycholic acid in rats, mice and monkeys.
J Control Release 2006; **111**: 290-8.
146. Kim SK, Lee EH, Vaishali B, et al.
Tricaprylin microemulsion for oral delivery of low molecular weight heparin conjugates.
J Control Release 2005; **105**: 32-42.
147. Kim SK, Vaishali B, Lee E, et al.
Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation.
Thromb Res 2006; **117**: 419-27.
148. Thanou M, Verhoef JC, Nihot MT, Verheijden JH, Junginger HE.
Enhancement of the intestinal absorption of low molecular weight heparin (LMWH) in rats and pigs using Carbopol 934P.
Pharm Res 2001; **18**: 1638-41.
149. Thanou M, Nihot MT, Jansen M, Verhoef JC, Junginger HE.
Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo.
J Pharm Sci 2001; **90**: 38-46.
150. Thanou M, Henderson S, Kydonieus A, Elson C.
N-sulfonato-N,O-carboxymethylchitosan: a novel polymeric absorption enhancer for the oral delivery of macromolecules.
J Control Release 2007; **117**: 171-8.
151. Mori S, Matsuura A, Rama Prasad YV, Takada K.
Studies on the intestinal absorption of low molecular weight heparin using saturated fatty acids and their derivatives as an absorption enhancer in rats.
Biol Pharm Bull 2004; **27**: 418-21.
152. Rama Prasad YV, Minamimoto T, Yoshikawa Y, et al.
In situ intestinal absorption studies on low molecular weight heparin in rats using labrasol as absorption enhancer.
Int J Pharm 2004; **271**: 225-32.

153. Ito Y, Kusawake T, Prasad YV, et al.
Preparation and evaluation of oral solid heparin using emulsifier and adsorbent for in vitro and in vivo studies.
Int J Pharm 2006; **317**: 114-9.
154. Bernkop-Schnurch A, Kast CE, Guggi D.
Permeation enhancing polymers in oral delivery of hydrophilic macromolecules: thiomers/GSH systems.
J Control Release 2003; **93**: 95-103.
155. Kast CE, Guggi D, Langoth N, Bernkop-Schnurch A.
Development and in vivo evaluation of an oral delivery system for low molecular weight heparin based on thiolated polycarbophil.
Pharm Res 2003; **20**: 931-6.
156. Schmitz T, Leitner VM, Bernkop-Schnurch A.
Oral heparin delivery: design and in vivo evaluation of a stomach-targeted mucoadhesive delivery system.
J Pharm Sci 2005; **94**: 966-73.
157. Hayes PY, Ross BP, Thomas BG, Toth I.
Polycationic lipophilic-core dendrons as penetration enhancers for the oral administration of low molecular weight heparin.
Bioorg Med Chem 2006; **14**: 143-52.
158. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, et al.
New class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules.
Polymer J 1984; **17**: 117-32.
159. Newkome GR, Yao ZQ, Baker GR, Gupta VK.
Cascade molecules: A new approach to micelles. A [27]-arborol.
J Org Chem 1985; **50**: 2003-4.
160. Jiao Y, Ubrich N, Marchand-Arvier M, et al.
In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits.
Circulation 2002; **105**: 230-5.
161. Lamprecht A, Ubrich N, Hombreiro Perez M, et al.
Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification.
Int J Pharm 1999; **184**: 97-105.
162. Jiao Y, Ubrich N, Hoffart V, et al.
Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits.
J Pharm Sci 2002; **91**: 760-8.

163. Hoffart V, Lamprecht A, Maincent P, et al.
Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system.
J Control Release 2006; **113**: 38-42.
164. Griminger P.
Vitamin K antagonists: the first 50 years.
J Nutr 1987; **117**: 1325-9.
165. Link KP.
The discovery of dicumarol and its sequels.
Circulation 1959; **19**: 97-107.
166. Siguret V.
Vitamin K: metabolism, physiopathology, implication in the inter- and intra-individual variability in the response to the vitamin K antagonists.
Hématologie 2006; **12**: 389-99.
167. Plaza SM, Lamson DW.
Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis.
Altern Med Rev 2005; **10**: 24-35.
168. Stafford DW.
The vitamin K cycle.
J Thromb Haemost 2005; **3**: 1873-8.
169. Gage BF, Lesko LJ.
Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues.
J Thromb Thrombolysis 2008; **25**: 45-51.
170. De Caterina R, Husted S, Wallentin L, et al.
Anticoagulants in heart disease: current status and perspectives.
Eur Heart J 2007; **28**: 880-913.
171. D'Andrea G, D'Ambrosio R, Margaglione M.
Oral anticoagulants: Pharmacogenetics Relationship between genetic and non-genetic factors.
Blood Rev 2008; **22**: 127-40.
172. CRAT. 11 Janvier 2008 [cited 12 Mai 2009]; www.lecrat.org.
173. Ufer M.
Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol.
Clin Pharmacokinet 2005; **44**: 1227-46.
174. Becquemont L.
Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice.
Eur J Clin Pharmacol 2008; **64**: 953-60.

175. Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR, et al.
Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range.
Chest 1998; **114**: 445S-69S.
176. Pineo GF, Hull RD.
Vitamin K antagonists and direct thrombin inhibitors: present and future.
Hematol Oncol Clin North Am 2005; **19**: 69-85, vi.
177. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, et al.
Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition).
Chest 2008; **133**: 160S-98S.
178. Bircher AJ, Harr T, Hohenstein L, Tsakiris DA.
Hypersensitivity reactions to anticoagulant drugs: diagnosis and management options.
Allergy 2006; **61**: 1432-40.
179. Reynaud F, Giraud P, Cisterne JM, et al.
Acute immuno-allergic interstitial nephritis after treatment with fluindione. Seven cases.
Nephrol Ther 2009; **5**: 292-8.
180. Frouin E, Roth B, Grange A, et al.
Hypersensitivity to fluindione (Previscan). Positive skin patch tests.
Ann Dermatol Venereol 2005; **132**: 1000-2.
181. Thurot C, Reymond JL, Bourrain JL, Pinel N, Beani JC.
Fluindione-induced acute exanthematous pustulosis with renal involvement.
Ann Dermatol Venereol 2003; **130**: 1146-9.
182. Chtioui M, Cousin-Testard F, Zimmermann U, et al.
Fluindione-induced acute generalised exanthematous pustulosis confirmed by patch testing.
Ann Dermatol Venereol 2008; **135**: 295-8.
183. Kimmel SE, Chen Z, Price M, et al.
The influence of patient adherence on anticoagulation control with warfarin: results from the International Normalized Ratio Adherence and Genetics (IN-RANGE) Study.
Arch Intern Med 2007; **167**: 229-35.
184. Waterman AD, Milligan PE, Bayer L, et al.
Effect of warfarin nonadherence on control of the International Normalized Ratio.
Am J Health Syst Pharm 2004; **61**: 1258-64.
185. Parker CS, Chen Z, Price M, et al.
Adherence to warfarin assessed by electronic pill caps, clinician assessment, and patient reports: results from the IN-RANGE study.
J Gen Intern Med 2007; **22**: 1254-9.

186. Ammar HO, Ghorab M, El-Nahhas SA, Makram TS.
Improvement of the biological performance of oral anticoagulant drugs. 1. Warfarin.
Pharmazie 1997; **52**: 627-31.
187. Lin SY, Yang JC.
Inclusion complexation of warfarin with cyclodextrins to improve some pharmaceutical characteristics.
Pharm Weekbl Sci 1986; **8**: 223-8.
188. Zingone G, Rubessa F.
Preformulation study of the inclusion complex warfarin-beta-cyclodextrin.
Int J Pharm 2005; **291**: 3-10.
189. Mileti IF, Bajpai PK.
Development of a hydroxyapatite ceramic matrix for the continuous delivery of coumadin.
Biomed Sci Instrum 1995; **31**: 177-82.
190. Tarr ER, Lasserre A, Szmulowicz U, Bajpai PK.
A hydroxyapatite system for the continuous release of coumadin an anticoagulant.
Biomed Sci Instrum 1997; **33**: 143-8.
191. Barbato F, La Rotonda MI, Maglio G, Palumbo R, Quaglia F.
Biodegradable microspheres of novel segmented poly(ether-ester-amide)s based on poly(epsilon-caprolactone) for the delivery of bioactive compounds.
Biomaterials 2001; **22**: 1371-8.
192. Chickering D, Jacob J, Mathiowitz E.
Poly(fumaric-co-sebacic) microspheres as oral drug delivery systems.
Biotechnol Bioeng 1996; **52**: 96-101.
193. Mathiowitz E, Jacob JS, Jong YS, et al.
Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems.
Nature 1997; **386**: 410-4.
194. Chickering III DE, Jacob JS, Desai TA, et al.
Bioadhesive microspheres: III. An in vivo transit and bioavailability study of drug-loaded alginate and poly(fumaric-co-sebacic anhydride) microspheres.
J Control Release 1997; **48**: 35-46.
195. Thanos CG, Liu Z, Reineke J, Edwards E, Mathiowitz E.
Improving relative bioavailability of dicumarol by reducing particle size and adding the adhesive poly(fumaric-co-sebacic) anhydride.
Pharm Res 2003; **20**: 1093-100.
196. Thanos CG, Liu Z, Goddard M, et al.
Enhancing the oral bioavailability of the poorly soluble drug dicumarol with a bioadhesive polymer.
J Pharm Sci 2003; **92**: 1677-89.

197. Zacchigna M, Di Luca G, Cateni F, Maurich V.
Improvement of warfarin biopharmaceutics by conjugation with poly(ethylene glycol).
Eur J Pharm Sci 2004; **23**: 379-84.
198. Vervaet C, Baert L, Remon JP.
Extrusion-spheronisation A literature review.
Int J Pharm 1995; **116**: 131-46.
199. Erkoboni DF, *Extrusion/Spheronization*, in *Pharmaceutical Extrusion Technology*, I. Ghebre-Sellassie and C. Martin, Editors. 2003, Dekker, M.: New York, Basel. p. 277-322.
200. Baert L, Remon JP, Elbers JAC, Van Bommel EMG.
Comparison between a gravity feed extruder and a twin screw extruder.
Int J Pharm 1993; **99**: 7-12.
201. Rowe RC.
Spheronization: a novel pill-making process ?
Pharm Int 1985; **6**: 119-23.
202. Freitas S, Merkle HP, Gander B.
Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology.
J Control Release 2005; **102**: 313-32.
203. Li M, Rouaud O, Poncelet D.
Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches.
Int J Pharm 2008; **363**: 26-39.
204. Park J, Ye M, Park K.
Biodegradable Polymers for Microencapsulation of Drugs.
Molecules 2005; **10**: 146-61.
205. Haas S.
New oral Xa and IIa inhibitors: updates on clinical trial results.
J Thromb Thrombolysis 2008; **25**: 52-60.
206. Khoo CW, Tay KH, Shantsila E, Lip GY.
Novel oral anticoagulants.
Int J Clin Pract 2009; **63**: 630-41.
207. Monkman K, Lazo-Langner A, Kovacs MJ.
A 10 mg warfarin initiation nomogram is safe and effective in outpatients starting oral anticoagulant therapy for venous thromboembolism.
Thromb Res 2009; **124**: 275-80.

208. Couturaud F, Kearon C.
Optimum duration of anticoagulant treatment after an episode of venous thromboembolism.
Rev Pneumol Clin 2008; **64**: 305-15.
209. AFSSAPS, *Mise au point sur le bon usage des médicaments antivitamin K (AVK).*
Avril 2009. p. 18.
210. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A.
Poly-[epsilon]-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview.
Int J Pharm 2004; **278**: 1-23.
211. Wang X, Wang Y, Wei K, et al.
Drug distribution within poly(ε-caprolactone) microspheres and in vitro release.
J Mater Process Technol 2009; **209**: 348-54.
212. Raguime JA, Arthanareeswaran G, Thanikaivelan P, Mohan D, Raajenthiren M.
Performance characterization of cellulose acetate and poly(vinylpyrrolidone) blend membranes.
J Appl Polym Sci 2007; **104**: 3042-9.
213. Moneghini M, Carcano A, Zingone G, Perissutti B.
Studies in dissolution enhancement of atenolol. Part I.
Int J Pharm 1998; **175**: 177-83.
214. Gupta P, Thilagavathi R, Chakraborti AK, Bansal AK.
Role of molecular interaction in stability of celecoxib-PVP amorphous systems.
Mol Pharm 2005; **2**: 384-91.
215. Lafreniere LY, Talbot FDF, Matsuura T, Sourirajan S.
Effect of polyvinylpyrrolidone additive on the performance of polyethersulfone ultrafiltration membranes.
Ind Eng Chem Res 1987; **26**: 2385-9.
216. Torres MR, Soriano E, de Abajo J, dela Campa JG.
Comparative study of the behaviour of experimental polyamide UF membranes. The effect of polyvinylpyrrolidone used as an additive.
J Memb Sci 1993; **81**: 31-42.
217. Hasan AS, Socha M, Lamprecht A, et al.
Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release.
Int J Pharm 2007; **344**: 53-61.
218. Sun S, Wang M, Su L, et al.
Study on warfarin plasma concentration and its correlation with international normalized ratio.
J Pharm Biomed Anal 2006; **42**: 218-22.

219. Lombardi R, Chantarangkul V, Cattaneo M, Tripodi A.
Measurement of warfarin in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) and its correlation with the international normalized ratio.
Thromb Res 2003; **111**: 281-4.