



THESE de doctorat en cotutelle

Pour l'obtention du grade de docteur en sciences

DE L'UNIVERSITÉ Paris 13

&

DE L'INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR (TUNISIE)

Spécialité: Génie biologique et médical

**Nanosystèmes polymères pour la libération contrôlée de la
Warfarine : conception et évaluation biologique**

Présentée par

Ines Msolli Memmi

Soutenue le 16 décembre 2016 devant la commission d'examen:

Rapporteur	M. M. MSADDEK	Professeur, Université de Monastir
Rapporteur	M.L PICTON	Professeur, Université de Rouen
Examineur	M. M. BEN MANSOUR	Maître assistant, Université de Monastir
Examineur	M. F. CHAUBET	Professeur, Université Paris 13
Directeur de thèse	M. R. M. MAAROUFI	Professeur, Université de Monastir
Co-directeur de thèse	M ^{me} C. BARBAUD	Professeure, Université Paris 13

Dédicaces

À ma très chère mère Fatma

Qui a fait des sacrifices pour mon éducation, qui a tout sacrifié pour mon bien-être et mon avenir, dont l'amour, la tendresse et la bonté m'ont toujours soutenue moralement dans les moments les plus difficiles de ma vie.

Qui m'a élevée avec tant d'affection et de tendresse, qui m'a appris à lutter contre toutes les difficultés, qui m'a appris le vrai sens de la patience.

Je t'aime maman

Mon mari Fares

Pour tous les efforts que tu as consentis en ma faveur. Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement et l'affection que je te porte. Tu m'as aimée et soutenue sans cesse dans les moments les plus délicats, ta patience, ton grand cœur et ta générosité m'inspirent un nouveau souffle et un nouvel élan pour continuer.

À ma chère sœur Imen, son mari Ali et ses fils Omar, Haroun et Yazid, À mes très chères sœurs Amira, Intissar et Sioir et mes très chers frères Aymen et Anoir

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien moral et financier m'ont été d'un grand secours au long de ma vie. Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments d'amour.

A mes très chers beaux-parents Mohamed et Naziha

À mon cher beau-frère Walid, sa femme Houda, sa fille Yasmine et son fils Mohamed

À mon beau-frère Naim, sa femme Sana et ses petites Sarra et Sirine

À mon beau-frère Omar

À toute ma famille

À tous mes amis et mes collègues

En témoignage de mon profond amour, mon attachement et l'expression de mes sentiments d'affection et de gratitude. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de succès.

– Remerciements –

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire : «Laboratory for VascularTranslational Science»: LVTS (Paris 13) et le laboratoire de «Génétique, Biodiversité et Valorisation des Bioressources: GBVB»(Monastir).

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu pour la santé, la patience et la confiance qu'il m'a donné pour arriver à accomplir ce travail.

Je tiens à remercier M Raoui Mounir Maaroufi, Professeur à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, pour la pleine confiance qu'il m'a accordé et d'avoir accepté de diriger ce travail. Merci pour votre disponibilité et votre dévouement avec lesquels vous m'avez suivi tout au long de cette thèse en tant que Directeur de thèse en me permettant d'acquérir une formation à la recherche scientifique sur une thématique passionnante.

Je me fais un devoir d'exprimer mes sentiments de gratitude et de respect à Mme Christel Barbaud, Professeure à l'université de Paris 13. Vous m'avez fait un grand honneur en acceptant de diriger ce travail. Merci pour m'avoir accueillie et me faire bénéficier de votre savoir et de vos compétences. J'ai pour vous le respect qu'impose votre mérite et vos qualités humaines aussi bien que professionnelles. Vous étiez toujours à mes côtés. Merci.

Je tiens également à remercier M Frédéric Chaubet, Professeur à l'université de Paris 13, pour l'accueil agréable et pour la qualité de votre apport qui ont fortement enrichi ma formation. Je vous remercie vivement pour toute l'aide et tous les conseils que vous avez pu me fournir tout au long de cette thèse. Vous m'avez apporté des

suggestions constructives durant la réalisation de mon travail. Il m'est particulièrement agréable de vous exprimer toute ma gratitude.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance pour M Didier Letourneur, Directeur de Recherche CNRS, pour l'accueil chaleureux au sein de son laboratoire et pour ses qualités humaines.

Je remercie également M Moncef MSADDEK, Professeur à la Faculté des Sciences de Monastir, pour votre précieuse collaboration et pour la qualité de votre apport et d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Un grand MERCI également à M Luc Picton, professeur à l'université de Rouen, d'avoir accepté de juger mon travail. Je suis très honorée par votre présence.

Je tiens à remercier aussi M Mohammed Ben Mansour, Maître assistant à l'Institut Supérieur de Sciences Appliquées et de Technologie de Mahdia (ISSATM, Université de Monastir), pour sa collaboration, et d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Mes sincères remerciements vont également à l'ensemble du personnel administratif et technique et aux personnes du LVTS et du GBVB.

Résumé

Dans ce travail de thèse, nous avons synthétisé des dérivés de poly(acide (*R,S*)-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA). Les copolymères de PDMMLA sont composés principalement de deux monomères: un monomère hydrophobe contenant un groupement hexylique et un monomère hydrophile contenant un groupement acide. Grâce à la proportion de chaque monomère dans le copolymère final, la balance hydrophile/hydrophobe est ajustée. Donc six copolymères ont été obtenus: trois copolymères statistiques PDMMLAH_{n-co}-Hex_{100-n} et trois copolymères à blocs PDMMLAH_{n-b}-Hex_{100-n}. Ces copolymères sont à l'origine de nanoparticules sans et avec un principe actif. La Warfarine a été encapsulée à la fois avec des nanoparticules de PDMMLAH_{n-co}-Hex_{100-n} et de PDMMLAH_{n-b}-Hex_{100-n}.

Les nanoparticules formées sont caractérisées afin d'en déterminer la forme, la taille et la charge de surface. Donc des nanoparticules de forme sphérique, ayant une taille inférieure à 100 nm et ayant une charge de surface inférieure à -30 mV ont été obtenues. Les nanoparticules de PDMMLAH_{30-co}-Hex₇₀, ont été choisies pour étudier la libération contrôlée de la warfarine dans des conditions de température et de pH physiologiques. Les résultats obtenus montrent une libération lente et progressive de la warfarine à partir des systèmes nanoparticulaires ainsi conçus et réalisés. De tels systèmes nanoparticulaires à base de dérivés amphiphiles du PDMMLA offriraient ainsi des outils d'intérêt pour l'encapsulation et la libération contrôlée de nombreux principes actifs hydrophobes tels que le dérivé coumarinique inhibiteur de la thrombine (DCBC) dont l'activité antithrombine en système purifié est plus élevée que celle de l'argatroban.

Mots clés: PDMMLA, synthèse, nanoparticules, encapsulation, warfarine, DLS, MET, HPLC.

Abstract:

In this work we synthesized derivatives of poly((*R,S*)-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA). PDMMLA copolymers are mainly composed of two monomers: a hydrophobic monomer containing a hydroxyl group and a hydrophilic monomer containing an acid group. Due to the proportion of each monomer in the final copolymer, the hydrophilic / hydrophobic balance is modulated. Thus, six copolymers were obtained: three random copolymers PDMMLAHn-*co*-Hex100-n and three block copolymers: PDMMLAHn-*b*-Hex100-n.

These copolymers are at the origin of nanoparticles without and with an active principle. Warfarin, which has been successfully encapsulated with both PDMMLAHn-*co*-Hex100-n and block, copolymer nanoparticles: PDMMLAHn-*b*-Hex100-n. The formed nanoparticles showed fairly high encapsulation efficiency for both types of copolymers.

The PDMMLA nanoparticles are characterized in order to determine their shape, size and surface charge. Thus nanoparticles of spherical shape, having less than 100 nm size and having a surface charge of less than -30 mV have been obtained. The PDMMLAH₃₀-*co*-Hex₇₀ nanoparticles were chosen to study the controlled release of warfarin under physiological temperature and pH conditions. Obtained results show a slow and progressive release of warfarin. Such nanoparticulate systems based on amphiphilic derivatives of PDMMLA would thus offer tools of interest for the encapsulation and controlled release of many hydrophobic active principles such as the coumarin derivative thrombin inhibitor (DCBC) whose antithrombin activity in purified system is higher than that of argatroban.

Key words: PDMMLA, synthesis, nanoparticles, encapsulation, warfarin, DLS, MET, HPLC.

Table des matières

Liste des figures	10
Liste des schémas	12
Liste des tableaux	13
Introduction générale.....	1
Chapitre I.....	4
Partie bibliographique	4
I. Coagulation sanguine et hémostase.....	4
I.1. L'athérosclérose :	5
I.2. La thrombose:	7
I.3 Structure normale des vaisseaux sanguins:.....	8
I.4. Système cardiovasculaire :.....	10
I.5. La coagulation sanguine et l'hémostase :	10
I.6. Les anticoagulants :.....	14
II. Les dérivés coumariniques	19
1. La warfarine :	22
2. Mécanisme d'action de la warfarine :	24
3 Cycle de la vitamine K.....	24
4. Exemple d'un dérivé coumarinique inhibiteur direct de la thrombine : le 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (DCBC) :.....	25
III. Les polymères biodégradables.....	26
1. les dérivés de poly (acide (<i>R,S</i>)-3,3-diméthylmalique) PDMMLA :	30
IV. La nanotechnologie.....	32
1. Nanoparticules et traitement des maladies cardiovasculaires :	35
2. Nanoparticules thérapeutiques et théranostiques :	37
3. Principe de la nanoprécipitation :	38
4. Caractéristiques et avantages des nanoparticules :.....	40
5. la libération contrôlée de principe actif :	41
Chapitre II	43
Partie expérimentale.....	43
I. Matériels.....	43
II. Méthodes :.....	43
II.1-Caractérisations structurales des copolymères :	43
II.1.1. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) :.....	43
II.1.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :	43
II.1.3. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC) :	44
II.1.4.Mesure de la température de la transition vitreuse (<i>T_g</i>):	44
II.2-Caractérisations des nanoparticules :	45
1. Etude morphologique des nanoparticules par Microscopie Electronique à Transmission (MET) :	45
2. Evaluation de la taille des nanoparticules par Zetasizer NanoZS Diffusion Dynamique de la Lumière :.....	45
3. Evaluation de la charge de la surface des nanoparticules : mesure du Potentiel Zêta par Zetasizer NanoZS (DLS) :.....	46
4. Lavage des nanoparticules par ultracentrifugation:	46
5. Optimisation des conditions d'élution du principe actif encapsulé : la warfarine et de standard utilisé : la phénylbutazone :	47
6. Libération contrôlée de la warfarine :	50

II.3-Caractérisation du dérivé coumarinique : le 2,5-dichlorophényl 6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (DCBC):	51
1. Détermination de l'absorbance de dérivé coumarinique : (DCBC):	51
2. Evaluation de l'activité anticoagulante de DCBC :	51
III. Synthèse et caractérisation des dérivés du PDMMLA	53
I. Synthèse des β -lactones α,α,β -trisubstituées.....	53
1.Méthylation:	54
2. Réduction	54
3.Hydrolyse basique	54
4. Monoestérification:	55
5. Lactonisation:	55
II. Polymérisation anionique des β -lactones α,α,β -trisubstituées.....	56
1. Synthèse de copolymères:	56
2. Synthèse des copolymères statistiques :	57
3. Synthèse de copolymères à blocs :	59
4. Déprotection des copolymères par hydrogénolyse catalytique :	65
5. Précipitation des copolymères :	66
IV. Développement des nanoparticules dérivées du PDMMLA	67
I. Formulation et caractérisation des nanoparticules dérivées du PDMMLA:	67
1-Optimisation de la formulation des nanoparticules dérivées du PDMMLA:	67
2. Optimisation des pourcentages d'encapsulation de la warfarine :	68
V. La libération contrôlée de la warfarine :	69
1. Dosage de la warfarine:	69
2 Evaluation de l'activité anticoagulante du 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (DCBC) par inhibition directe de la thrombine:	70
Chapitre III	70
Résultats et Discussion.....	70
I. Synthèse et caractérisations des copolymères de PDMMLA:	73
II. Développement des nanoparticules dérivées du PDMMLA:	88
1. Formulation et caractérisation des nanoparticules dérivées du PDMMLA:	88
2. Etude des caractéristiques des nanoparticules vides:	89
III. Formation et caractérisation des nanoparticules de PDMMLAH _{30-co} -Hex ₇₀ (P1') et PDMMLAH _{30-b} -Hex ₇₀ (P4'):	95
1. Optimisation du pourcentage d'encapsulation avec le (P1') en déterminant l'efficacité d'encapsulation (EE):	95
2. Détermination de la forme des nanoparticules de P1' et P4' avec 3% de la warfarine par MET:	96
IV. La libération contrôlée de la warfarine de P1' et P4':	98
V. Evaluation de l'effet biologique de 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (DCBC):	101
1. Caractérisations de dérivé coumarinique:	101
2. Evaluation de l'activité antithrombine en système purifié :	104
3. Les tests coagulométriques:	106
Conclusion générale	109
Article dans RSC Advances	111
Conclusions et perspectives	112
Bibliographie	114

Liste des figures

Figure 1: Représentation des maladies fréquentes dans le monde selon l’OMS (2007)	4
Figure 2: Mécanisme de formation de l’athérosclérose	7
Figure 3: Vue schématique des couches de la paroi des artères (Moore et al.[26])	9
Figure 4: voies intrinsèque et extrinsèque de la coagulation sanguine (Vandita et al.[48])	13
Figure 5 : Rôle procoagulant et anticoagulant de la thrombine (Marcello et al.[54])	14
Figure 6: Mécanisme d’inhibition de la thrombine par l’héparine (Weitz et al. [64])	16
Figure 7: Interaction de la thrombine (IIa) avec les différents anticoagulants directs (Lee et al. [63])	17
Figure 8: Les principaux sites d’action des anticoagulants (Jay et al.[95])	21
Figure 9: Action de la warfarine sur le cycle de la vitamine K [102]	23
Figure 10: Cycle de la vitamine K.	25
Figure 11: La nanotechnologie (Chauvierre et al.[156])	33
Figure 12: les approches de la nanotechnologie pour le diagnostique et le traitement des MCV : nanoparticules (a) contraste de l’image multimodale (b) traitement pour une plaque d’athérosclérose en ciblant les cellules immunes ou ligand spécifique dans l’endothélium lésé (c) sonde <i>in vivo</i> implantée dans la région péricardique ou dans l’un des principaux vaisseaux sanguins (d) stent contenant un principe actif/nanoparticules (Godin B et al [164]).....	38
Figure 13 : Spectre UV-Visible de la longueur d’onde d’absorbance de standard utilisé : phénylbutazone.....	48
Figure 14 : UV-Visible de la longueur d’onde d’absorbance de la warfarine	49
Figure 15 : Chromatogramme de la warfarine et de la phénylbutazone	50
Figure 16: Principe de la nanoprécipitation	67
Figure 17 : Principe de la libération contrôlée	69
Figure 18 : Droite d’étalonnage de la warfarine en présence de standard (phénylbutazone)	70
Figure 19: Droite d’étalonnage de la thrombine.	72
Figure 20 : Structure H ¹ RMN de monoester benzylique.....	75
Figure 21: spectre IR de la lactone hexylique.....	77
Figure 22 : Spectre RMN ¹ H de la lactone benzylique	77
Figure 23: Evolution du spectre IR au cours de la polymérisation	78
Figure 24: Evolution du spectre IR de P4’ au cours de la polymérisation: A (début de polymérisation), B (après 48 heures), et C (Après 72 heures, fin de polymérisation)	81
Figure 25 : Spectre RMN ¹ H du PDMMLAH ₃₀ -CO-Hex ₇₀	81
Figure 26: Calcul du pourcentage des monomères benzylique et hexylique de chacun des copolymères statistique et à bloc à partir du spectre RMN ¹ H: % CH ₂ -O-Bn (a) = (a/ (a+b)) ×100, % CH ₂ -O-Hex (b) = (b/ (a+b)) ×100.....	82
Figure 27 : Profil de spectre RMN ¹ H de PDMMLAH ₇₀ -CO-Hex ₃₀ après l’hydrogénolyse catalytique.....	83
Figure 28 : Exemple de Tg de copolymère statistique P1 (A) et P1’(B)	85

Figure 29 : Exemple de <i>Tg</i> de copolymère à bloc P6 (A) et P6'(B)	86
Figure 30 : Spectre de masse moléculaire pour P1 et P1'	87
Figure 31 : Spectre de masse moléculaire pour P6 et P6'	87
Figure 32: Nanoparticules de PDMMLA formées par nanopréciipitation	88
Figure 33: nanoparticules en forme de tige obtenues avec 1 ml d'acétone	88
Figure 34: Images des nanoparticules de PDMMLA statistiques respectivement pour P1', P2'et P3' données par la microscopie électronique à transmission MET	89
Figure 35: les nanoparticules des PDMMLA à blocs déterminées par MET : respectivement de P4', P5' et P6'	90
Figure 36 : Aspect des nanoparticules de copolymère statistique P1' (A) et copolymère à bloc P4' (B) chargées avec 3% de la warfarine en MET.....	96
Figure 37 : Comparaison de la taille (A) et du potentiel zêta (B) des nanoparticules de P1' et P4'	98
Figure 38: Profils de la libération contrôlée de la warfarine pour le W-NP1'(B) et le W-NP4'(A) sur 4 semaines	99
Figure 39: Détermination de la longueur d'onde de dérivé coumarinique : C1= 1g/mL, C2=0,1mg/ml, C3=0, 2 mg/ml, C4=0, 04 mg/mL, C4=0,02 mg/ml et C5=0,01mg/ml	102
Figure 40: Comparaison de la surface de pic de dérivé coumarinique en fonction de la concentration et avec un débit de 0,5 et 1 mL/min	103
Figure 41: Droite d'étalonnage de dérivé coumarinique.....	103
Figure 42: Mécanisme d'action de DCBC et de l'argatroban (Frédéric R [66])	104
Figure 43: Thrombine résiduelle en fonction de la concentration de dérivé coumarinique.	105
Figure 44: Thrombine résiduelle en fonction de la concentration de l'argatroban.....	105
Figure 45: TQ en fonction de la concentration du dérivé coumarinique et de l'argatroban	107
Figure 46:TCA en fonction de la concentration du dérivé coumarinique et de l'argatroban	107
Figure 47: TT en fonction de la concentration du dérivé coumarinique et de l'argatroban.....	108

Liste des schémas

Schéma 1 : Structure chimique de l'Argatroban	18
Schéma 2 : Structure chimique de la coumarine [83].....	19
Schéma 3 : Structure de la Warfarine	22
Schéma 4 : Structure chimique de la Warfarine et de DCBC	26
Schéma 5: Mécanisme de la monoestérification	55
Schéma 6 : Mécanisme de formation des lactones : réaction de Mitsunobu.	56
Schéma 7 : Mécanisme de la polymérisation anionique	57
Schéma 8: Structure générale de copolymère statistique: PDMMLABn _{.co} .Hex	57
Schéma 9: Structure générale des copolymères à blocs PDMMLABn _{.b} .Hex	60
Schéma 10 : Etapes de synthèse du 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate(DCBC)	71
Schéma 11: Synthèse du 2-méthyl-2-oxalpropionate de diéthyle (1).....	73
Schéma 12: Synthèse du 3,3-diméthylmalate de diéthyle (2)	74
Schéma 13 : Synthèse de l'acide 3,3-diméthylmalique (3)	74
Schéma 14: Synthèse des monoesters benzylique et hexylique ⁴ et 5.....	75
Schéma 15: Synthèse des β -lactones α,α,β -trisubstituées 6 et 7.	76
Schéma 16: Synthèse de trois copolymères statistiques.....	79
Schéma 17: Synthèse des copolymères à blocs.....	79

Liste des tableaux

Tableau 1 : Masses théoriques et expérimentales des lactones benzylique et hexylique pour former les trois copolymères statistiques : P1, P2 et P3.	58
Tableau 2: Volume d’amorceur ajouté pour chaque copolymère	59
Tableau 3 : Masses théoriques et expérimentales des lactones benzylique et hexylique pour former les trois copolymères à bloc : P4, P5, et P6.	61
Tableau 4 : Masses des polymères et palladium utilisées pour l’hydrogénolyse catalytique.	66
Tableau 5: les pourcentages expérimentaux de monomères obtenus pour chaque copolymère : P1, P2, P3, P4, P5, et P6	82
Tableau 6: Caractérisations physicochimiques des copolymères statistiques et à blocs avant et après hydrogénolyse catalytique	84
Tableau 7: Caractérisations de nanoparticules de PDMMLA statistiques et à blocs par le DLS : détermination de la taille et du potentiel zêta dans une solution de NaCl (1mM)	92
Tableau 8: Tableau comparatif entre les nanoparticules vides (NP1 et NP4) et avec un pourcentage de warfarine (W-NP1’ et W-NP4’) : en taille, charge de surface (potentiel zêta) et l’indice de polydispersité (PDI) dans une solution d’NaCl (1 mM).	97

Glossaire

ANSM: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

APC: Protéine C activée

ATH: Complexe antithrombine-héparineAVK : AntivitamineK

CCM: Chromatographie sur couche mince

CML: Cellule musculaire lisse

DLS: Diffusion Dynamique de la Lumière

DSC: Calorimétrie Différentielle à Balayage

EE: Efficacité d'encapsulation

$\text{Et}_4\text{N}^+ \text{PhCO}_2^-$: benzoate de tétraéthylammonium

FDA: Food and Drug Administration

FT-IR: Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

FVIIa: Facteur VII activé

HEPES: L'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HIV: Virus d'immunodéficience humain

HPLC: Chromatographie liquide à haute pression

IPD: Indice de polydispersité

KO: Vitamine k- époxyde

LDL: Lipoprotéines de faible densité

MEC: Matrice extracellulaire

MET: Microscopie Electronique à Transmission

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PCL: Poly(ϵ -caprolactone)

PDMMLA: Poly(acide(*R,S*) -3,3 diméthylmalique)

PEG: Poly(éthylène glycol)

PGA: Poly(acide glycolique)

PLA: Poly(acide lactique)

PLGA: Poly(acide glycolique-*co*-lactique)

PMLA: Le poly(acide malique)

RMN: Résonance magnétique nucléaire

ROP: Polymérisation par ouverture de cycle

RT-HPLC: Chromatographie Liquide à Haute Performance en Phase Inverse

TCA: Temps de céphaline activé

FT: Facteur tissulaire

TFA: Acide trifluoroacétique

TFAA: Anhydride trifluoroacétique

T_g : Températures de transition vitreuse

TQ: Temps de Quick

TT: Temps de la thrombine

VKORC1: Epoxyde réductase C1

Introduction générale

La nanotechnologie est l'ingénierie et la production des matériaux à l'échelle atomique et moléculaire, c'est une technologie transformative ayant le potentiel de stimuler l'innovation scientifique par le développement des nouvelles modalités thérapeutiques plus efficaces et plus sûres [1]. La nanotechnologie est souvent décrite comme potentiellement «révolutionnaire» en termes d'impact possible sur les méthodes de production industrielle. Elle apporte des solutions possibles à toute une série de problèmes actuels par le biais de matériaux, composants et systèmes plus petits, plus légers, plus rapides et plus efficaces. Des progrès énormes sont aujourd'hui réalisés dans la course mondiale à la nanotechnologie [2].

Au cours de la dernière décennie, la nanotechnologie a eu un impact de plus en plus important sur le développement préclinique en médecine. Aujourd'hui, plusieurs types de nanoparticules sont en phase clinique citant les nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc dans les produits cosmétiques, un ciment orthopédique contenant des nanoparticules d'hydroxyapatite permettant d'accélérer l'intégration osseuse, et le paclitaxel dans une formulation de nanoparticules liées à l'albumine en 2016 etc...(ANSM)

Par ailleurs, l'application de la nanotechnologie à la délivrance des principes actifs pourrait largement changer la physionomie de l'industrie pharmaceutique et biotechnologique dans un avenir proche. En effet le développement continu des nouveaux systèmes de libération est déterminé par le besoin d'optimiser l'activité thérapeutique et minimiser les effets secondaires des principes actifs. Ce développement est essentiel pour une thérapie efficace des futurs principes actifs, ce qui implique des composés synthétiques plus variés et plus sophistiqués [3]. Pour cette raison les nanoparticules sont devenues de plus en plus impliquées dans le développement des nouveaux matériaux pour l'innovation des applications d'imageries médicales et de systèmes de libération contrôlée telle que les nanoparticules polymères biodégradables.

La vectorisation de molécules thérapeutiques vers l'organe, le tissu ou la cellule malade constitue un défi majeur pour le traitement des maladies humaines. Pour atteindre ce but, des nanoparticules auto-assemblées à partir de polymères amphiphiles ont été largement étudiés

pour l'administration de médicaments [4][5]. La formulation de ces nanoparticules dépend du choix du système polymère approprié ayant une encapsulation maximale, l'amélioration de la biodisponibilité et le temps de rétention. Ces critères sont influencés par la taille des particules, la charge de surface, la modification de surface et l'hydrophobie [6].

En effet, le choix du polymère biodégradable et bioassimilable approprié pour une telle application médicale passe obligatoirement par des monomères ayant des propriétés bien déterminées. Suite à la polymérisation de ces derniers, une variété de polymères avec des propriétés bien définies peut être obtenue.

Les dérivés du PDMMLA sont des nouveaux polyesters amphiphiles très prometteurs. En effet, les copolymères amphiphiles sont constitués d'une partie hydrophobe et d'une partie hydrophile et forment des systèmes très efficaces utilisés comme vecteurs pour la libération des principes actifs grâce à leur versatilité de synthèse qui permet d'ajuster leur balance hydrophobe/hydrophile. Cette modulation se fait au cours de leur synthèse en jouant d'abord sur le choix du monomère et sur le pourcentage de ce dernier, par conséquent des polyesters amphiphiles, hydrophobes, hydrophiles ou aussi neutres peuvent être obtenus. En plus, les dérivés du PDMMLA peuvent être synthétisés avec des masses moléculaires bien déterminées par une polymérisation anionique par ouverture de cycle des lactones monomères. Cette polymérisation a permis d'avoir soit des longues chaînes de copolymère avec une masse moléculaire assez élevée en choisissant un rapport amorceur/monomère = 10^{-3} ou des courtes chaînes de ces derniers avec une faible masse moléculaire en choisissant le rapport amorceur/monomère = 10^{-2} .

Grâce à cette polymérisation, deux types de copolymères ont été obtenus : les copolymères statistiques et les copolymères à blocs. Avec les copolymères statistiques, trois copolymères ont été synthétisés avec des proportions différentes de la lactone benzylique et de la lactone hexylique. Les mêmes proportions sont utilisées pour synthétiser les copolymères à blocs. A partir de ces copolymères, des nanoparticules ont été préparées par nanopréciptation. Cette méthode est simple à mettre en œuvre, rapide et efficace particulièrement pour l'encapsulation des principes actifs hydrophobes comme la warfarine.

La warfarine constitue à ce niveau un principe actif hydrophobe modèle qui sera encapsulée dans des conditions comparables à celles envisagées pour d'autres molécules bioactives hydrophobes telles que le 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-

carboxylate (DCBC), un dérivé inhibiteur de la thrombine dont l'activité anticoagulante est évaluée dans ce travail.

Le 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (DCBC), dérivé coumarinique de structure comparable à celle de la warfarine, est évalué pour son activité anticoagulante, en préalable à une encapsulation dans les mêmes systèmes nanoparticulaires et à l'étude ultérieure de sa cinétique de libération.

Il est à noter que la synthèse du DCBC a été réalisée dans le cadre d'un projet de recherche incluant le présent travail de thèse et comportant de même l'encapsulation et la cinétique de libération de cette molécule à partir des mêmes systèmes nanoparticulaires et l'évaluation biologique de ces derniers dans des modèles expérimentaux.

La formulation des nanoparticules est optimisée afin d'obtenir une meilleure encapsulation, une bonne stabilité et une libération contrôlée du principe actif. Des nanosphères seront formées avec les copolymères statistiques (warfarine dispersée dans la matrice copolymère) et des structures cœur-couronne avec les copolymères à blocs (warfarine dispersée dans un cœur hydrophobe et protégée par une couronne hydrophile).

Enfin, les caractéristiques des nanoparticules sans et avec le principe actif ont été mises en évidence par différentes techniques physico-chimiques. La forme des nanoparticules a été déterminée par la Microscopie Electronique à Transmission (MET), la taille et la charge de la surface en mesurant le potentiel zêta par la Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS).

La libération contrôlée de la warfarine est suivie par la Chromatographie Liquide à Haute Performance en Phase Inverse (RP-HPLC) dans des conditions proches des conditions physiologiques (Tampon phosphate pH= 7,4, température =37 °C et sous agitation). Le but de cette libération contrôlée est d'évaluer la libération de la warfarine d'une manière prévisible et contrôlable en fonction du temps et par la suite améliorer son efficacité. L'encapsulation de la warfarine permet aussi de la protéger contre la dégradation et l'élimination physiologique. En effet au fur et à mesure de la dégradation des copolymères, la warfarine se libère. La cinétique de libération du principe actif va dépendre des propriétés physico-chimiques des copolymères. Donc on va identifier et essayer de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le processus de la libération.

Chapitre I

Partie bibliographique

I. Coagulation sanguine et hémostasie

Les maladies cardiovasculaires (MCV) comptent parmi les causes les plus courantes de décès de la population active et en particulier dans les pays industriels ou en développement où ces maladies tendent également à devenir plus fréquentes[7][8] (**Figure 1**). A l'échelle mondiale, le nombre de décès attribuables aux maladies cardiovasculaires ne cesse d'augmenter au fur et à mesure que les populations vieillissent et adoptent un mode de vie de plus en plus occidental caractérisé par la sédentarité et la consommation accrues de graisses [9][10].

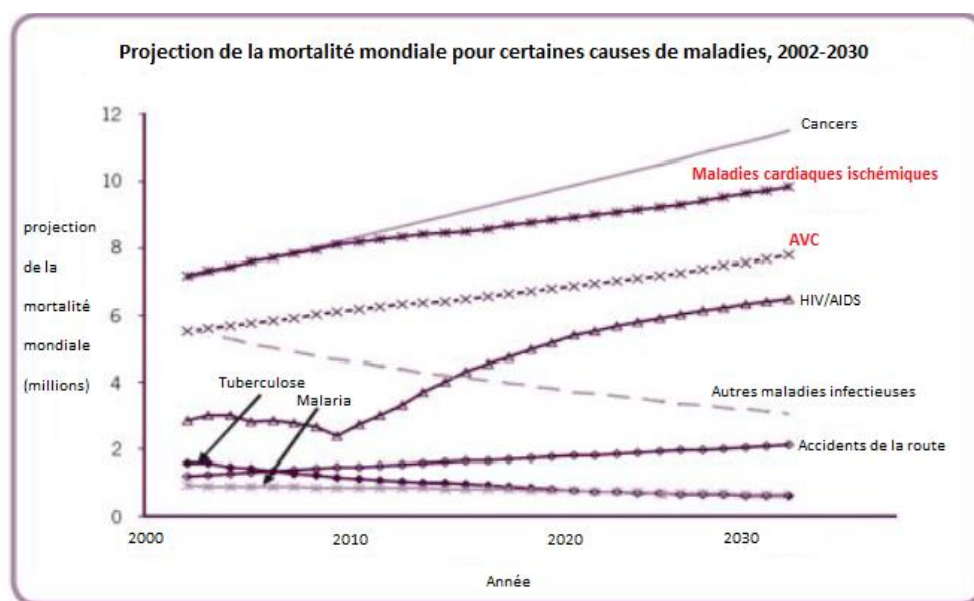


Figure 1: Représentation des maladies fréquentes dans le monde selon l'OMS (2007)

La lutte contre ces maladies cardiovasculaires est une priorité pour la santé publique. Des diagnostics précoces et des moyens d'améliorer les traitements sont indispensables [11]. Les principales formes de maladies cardiovasculaires sont la coronaropathie et les accidents cérébrovasculaires. Les MCV (crise cardiaque, insuffisance cardiaque, angine) sont des maladies du cœur (muscle cardiaque) ou des vaisseaux sanguins (vasculature). Le terme maladie cardiaque (ou coronaropathie) est utilisé pour les affections provoquées par le rétrécissement des vaisseaux sanguins du cœur (maladies coronariennes) par l'athérome. Les maladies cérébrovasculaires (accident cérébral vasculaire et attaque ischémique transitoire) sont des maladies des artères du cerveau [12]. Les maladies des artères coronaires sont généralement dues à une occlusion athérosclérotique des artères coronaires [10].

L'athérosclérose continue d'être l'un des principaux sujets de la recherche pathologique. La complexité intrigante de sa pathogénie ainsi que l'importance de ses séquelles cliniques fournissent une justification pour cette maladie [13].

Par conséquent, l'un des moyens les plus importants pour améliorer la survie de l'homme et la qualité de vie est toujours la surveillance des MCV par la détection et les traitements précoces [14]. Pour surmonter ces nouveaux défis, les connaissances fondamentales des sciences de la vie doivent être intégrées aux progrès des sciences physiques pour développer des nouveaux outils moléculaires pour mieux diagnostiquer, surveiller et traiter ces maladies complexes [15].

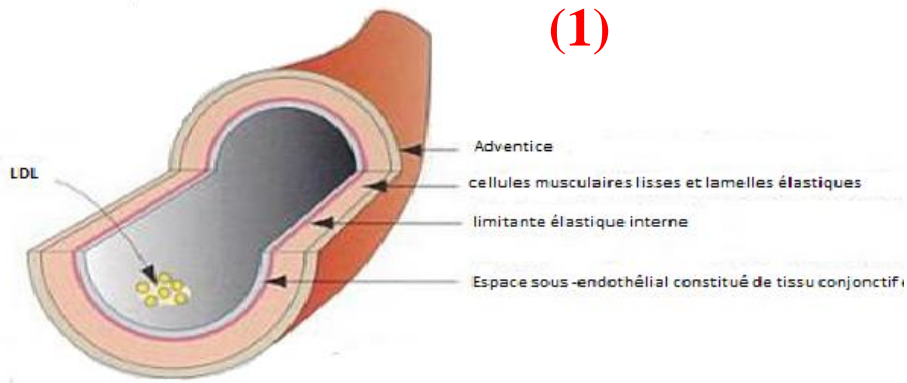
I.1. L'athérosclérose :

«Athérosclérose» est un mot inventé en 1904 par Félix Marchand à partir du grec athéré qui signifie 'bouillie' et de skléros qui signifie 'dur'. Donc c'est une maladie inflammatoire chronique qui touche les artères de larges et moyens diamètres [16].

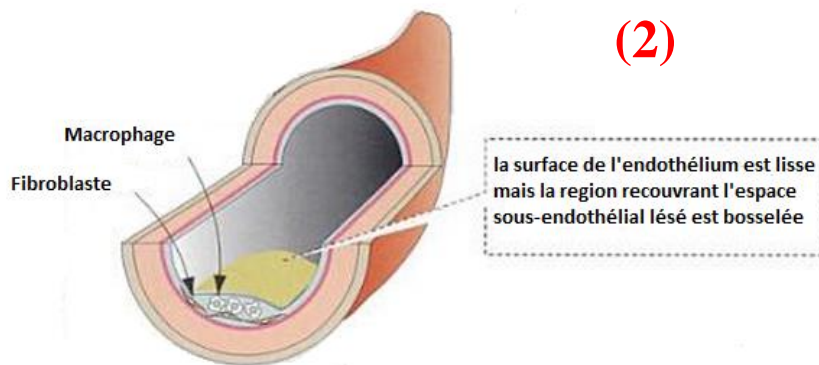
L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'athérosclérose comme «une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyens calibres consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Le tout s'accompagne d'une modification de la média» (OMS). Donc l'athérosclérose est la conséquence d'un processus inflammatoire chronique [17]. C'est une maladie qui évolue lentement : elle commence dès l'enfance mais elle ne se manifeste que à moyen âge ou même plus tard [18]. C'est un phénomène biologique très dynamique et important qui aboutit à la formation d'un caillot de fibrine localisé au site de la lésion vasculaire [1]. Ce phénomène est médié par deux principaux mécanismes : la coagulation sanguine et l'activation des plaquettes [2].

L'athérosclérose se produit en étapes (**Figure 2**):

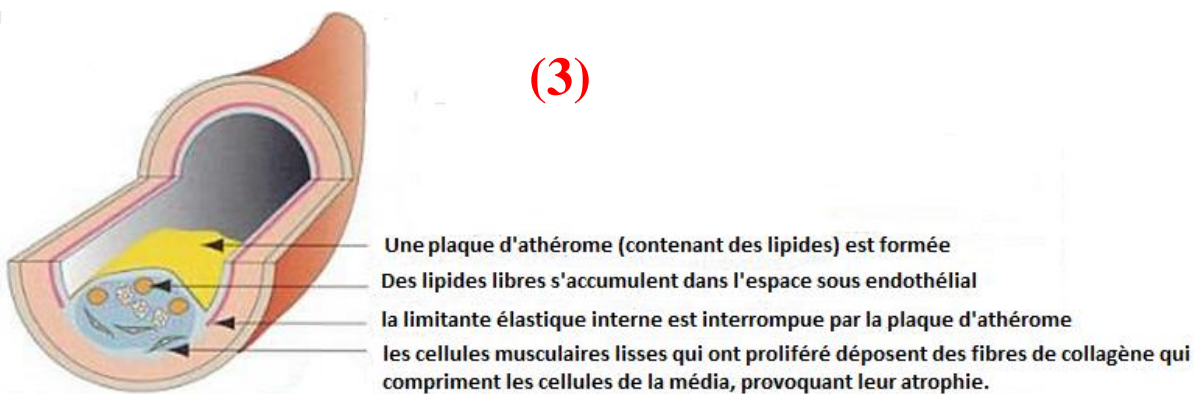
➤ Une lésion de l'endothélium d'une artère, provoquée par une hypercholestérolémie, est suivie par une infiltration de l'espace extracellulaire par des lipoprotéines de faible densité (LDL) riches en cholestérol dans l'intima (1).



✓ les lipides sont captés par des macrophages de l'intima et les fibroblastes de l'espace sous endothélial prolifèrent (2).



✓ les macrophages relarguent les lipides dans l'espace sous endothélial et les cytokines dérivées des macrophages stimulent la production de collagène par les cellules musculaires lisses en prolifération (3).



✓ l'ulcération de la plaque d'athérome favorise la formation de thrombose (formation d'un thrombus contenant de la fibrine et des plaquettes) (4).

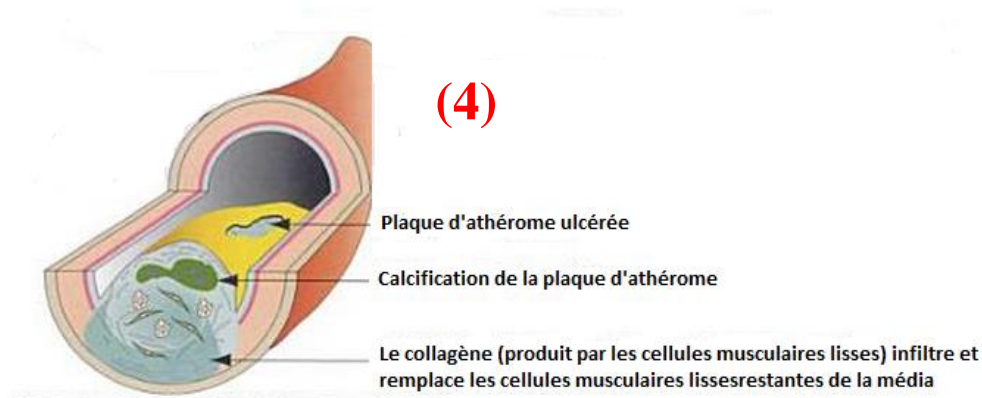


Figure 2: Mécanisme de formation de l'athérosclérose

Ce processus est à l'origine de conséquences graves dans l'athérosclérose coronarienne lorsqu'il aboutit à l'obstruction de la lumière vasculaire, provoquant un infarctus du myocarde ou parfois la mort subite [19].

I.2. La thrombose:

La thrombose est une réponse protectrice critique qui stabilise la perte de sang en générant la thrombine et en précipitant des dépôts de fibrine et de plaquettes au niveau des sites de lésion vasculaire. En effet, les composants moléculaires et cellulaires de la cascade de coagulation peuvent déclencher et propager des processus inflammatoires qui peuvent finalement favoriser la maladie. Le cas de l'athérosclérose souligne comment l'interface entre la thrombose et l'inflammation peut contribuer à une maladie chronique. L'activation de la cascade de coagulation provoque une série d'événements moléculaires qui déclenchent des signaux inflammatoires athérogènes, conduisant à la progression et la rupture de la plaque et favorisant les événements qui peuvent provoquer une formation de thrombus occlusif, un infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral ou une ischémie des membres. Les taux de thrombine augmentent dans les sites de lésion vasculaire et pendant les syndromes coronariens aigus. La thrombine possède des effets pro-inflammatoires puissants sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les plaquettes qui favorisent le développement de la maladie vasculaire [20].

L'athérosclérose coronaire sans thrombose est en général une maladie bénigne. La survie est assez importante si les complications par une formation de thrombus sont évitées. Le risque de la thrombose associée à l'athérosclérose dépend principalement du type de la plaque plutôt que de la taille de cette dernière. Seule la plaque athéromateuse riche en lipides est vulnérable à la rupture avec la formation subséquente de thrombus [21]. Par conséquent, il est clair que la composition de la plaque et sa propension à la rupture sont des déterminants majeurs des événements ischémiques futurs.[22]

Les troubles thrombotiques (la thrombo-embolie veineuse et la thrombose artérielle) sont la cause la plus fréquente de mortalité dans le monde. La thrombose veineuse est le résultat de la stagnation du sang dans les veines: stase sanguine en absence de lésion endothéliale, alors que la thrombose artérielle est principalement déclenchée par la rupture des plaques d'athérosclérose. Les deux procédés nécessitent l'activation des plaquettes et la formation de la fibrine. La thrombose affecte non seulement les grands vaisseaux, mais se produit également dans les micro-vaisseaux [23].

Dans toutes les formes de la thrombose, la coagulation et l'inflammation sont deux voies principales qui agissent ensemble dans la «réponse à la lésion». Malgré de nombreuses différences dans les facteurs contributifs, l'interface principale semble être l'endothélium vasculaire, servant de régulateur critique de l'écoulement, de l'hypercoagulabilité et de la thrombose. L'implication endothéliale dépend de ses réponses sur l'interaction dynamique entre la paroi vasculaire et le compartiment sanguin. Le système de coagulation joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité endothéliale ainsi que dans l'initiation ou l'accélération de la pathophysiologie menant à la thrombose. En outre, l'endothélium n'est pas une entité unique, il est très hétérogène dans son phénotype et son comportement, ce qui est peut être pertinent pour la localisation de la thrombose. [24]

I.3 Structure normale des vaisseaux sanguins:

La paroi des vaisseaux est composée de trois tuniques, l'adventice, la média et l'intima, tunique la plus interne [25] (**Figure 3**).

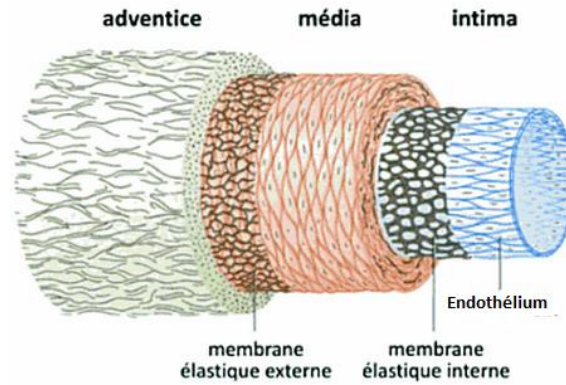


Figure 3: Vue schématique des couches de la paroi des artères (Moore et al.[26])

L'intima : constituée d'une limitante élastique interne et de l'endothélium (couche monocellulaire de cellules endothéliales). Elle est située au contact direct du sang circulant dans la lumière, reposant sur une assise conjonctive, la lame basale [25] riche en collagène [27]. Cette tunique est présente dans tous les types de vaisseaux [25].

La média : est dans la paroi artérielle saine la tunique la plus épaisse. La composition de la média détermine les propriétés mécaniques des artères. Elle est constituée de cellules musculaires lisses (CMLs) empilées de façon concentrique en couches perpendiculaires au flux sanguin formant ainsi des unités lamellaires. Chaque unité lamellaire est constituée de CMLs entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) composée de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine), et de protéoglycanes de la substance fondamentale et séparée de l'intima d'une part et de l'adventice d'autre part, par une couche conjonctive : la «limitante élastique». Cette limitante n'est retrouvée qu'au niveau des vaisseaux de gros calibres [28][29].

L'adventice : couche conjonctive et externe de la paroi vasculaire. Son épaisseur est extrêmement variable selon les territoires artériels. Elle est composée en grande partie de collagène mais également de cellules musculaires lisses, notamment dans les veines. Dans ces dernières, l'adventice est souvent la couche la plus développée. Dans l'adventice des vaisseaux ayant une paroi épaisse, on observe de petits vaisseaux sanguins, le vasa vasorum qui envoie des rameaux pénétrant dans la média pour lui fournir du sang. Ils n'en existent pas dans les vaisseaux plus petits dont les parois sont oxygénées par diffusion à partir de la lumière. Dans l'adventice cheminent également des nerfs du système nerveux autonome innervant le muscle lisse de la média [30].

I.4. Système cardiovasculaire :

Le système cardiovasculaire composé du cœur et des vaisseaux sanguins est le premier organe fonctionnel formé pendant l'embryogénèse chez les vertébrés [31]. Grâce à ce système le cœur pulse le sang dans le vaste réseau vasculaire du corps[32].

Les différents types de vaisseaux sanguins :

Il existe 3 grands types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires.

- **Les artères :**

On peut distinguer deux grands types d'artères d'après la composition générale de la média :

- Artères de type élastique
- Artères de type musculaire

Le type élastique caractérise les grandes artères proches du cœur (aorte et tronc pulmonaire avec leurs branches importantes). Les artères qui naissent plus loin sont de type musculaire. Ce sont ces dernières qui permettent le mieux d'observer les trois couches de la paroi et qui seront donc décrites les premières [26][19].

- **Les veines :**

Caractérisées par une fine média pauvre en fibres musculaires lisses et riche en fibres élastiques. La grande extensibilité de leurs parois induit une faible résistance à l'écoulement et la possibilité d'une grande capacité [33].

Les capillaires ont la structure la plus simple, faite d'une couche de cellules endothéliales, et idéale pour assurer les échanges moléculaires [34].

I.5. La coagulation sanguine et l'hémostase :

1. Historique :

Au départ, on pensait que l'exposition du sang à l'air était le déclencheur de la coagulation après une blessure et jusqu'au milieu de 19^{ème} siècle que le concept de la capacité de coaguler était dépendant des composants spécifiques du sang. Au début des années 1900, on croyait que le seul processus enzymatique nécessaire à la formation d'un caillot était la conversion de prothrombine (FII) en thrombine (FIIa) et que tous les autres composants identifiés étaient des

produits de dégradation de la prothrombine et donc des artefacts [35]. Les modèles de coagulation ont été développés au début du 20^{ème} siècle en décrivant les phases finales de la coagulation quand le fibrinogène est converti en fibrine par la thrombine, mais le mécanisme responsable de la génération de la thrombine n'a été découvert que beaucoup plus tard [36].

2. La coagulation sanguine :

La coagulation sanguine est un mécanisme ayant comme objectif la protection contre l'hémorragie létale. Ce mécanisme est constitué d'une série de réactions enzymatiques hautement régulées [24][37] et d'un système équilibré de facteurs pro-et anticoagulants, aboutissant à la formation de la fibrine réticulée[38][39].

La coagulation est traditionnellement décrite comme un mécanisme par lequel, la réponse naturelle de l'organisme et le saignement contrôlé par des agents hémostatiques sont des processus physiologiques complexes qui impliquent deux cascades distinctes d'événements d'activation protéolytiques : les voies intrinsèque et extrinsèque [40][41]. La coagulation sanguine est toujours considérée comme un facteur déterminant qui agit sur la thrombose et l'hémostase [42].

3. L'hémostase :

L'hémostase est un changement de l'état physique du sang dû à la transformation d'une protéine plasmatique, le fibrinogène, en monomères de fibrine, qui, après polymérisation, forment un gel solide consolidant le clou plaquettaire. Cette transformation a pour finalité la limitation de la déperdition de sang au niveau de la brèche vasculaire, grâce au colmatage de celle-ci. Ce processus physiologique comporte deux étapes, l'hémostase primaire qui représente l'ensemble des interactions complexes entre la paroi vasculaire, les plaquettes et les facteurs hémodynamiques permettant ainsi la formation d'un thrombus plaquettaire constituant le clou plaquettaire. L'hémostase obtenue par ce dernier est fragile et temporaire, et doit être consolidée par la coagulation plasmatique à travers la génération d'un réseau protéique qui réalise ainsi une hémostase permanente. Ce phénomène implique treize protéines plasmatiques (Facteurs I à XIII de la coagulation).

La coagulation plasmatique est une cascade de réactions d'activations enzymatiques aboutissant au clivage enzymatique du fibrinogène en fibrine par la thrombine qui est l'enzyme clé de la coagulation. Elle fait intervenir un ensemble de protéines plasmatiques appelés facteurs de la coagulation circulant sous forme de zymogènes (précurseurs

d'enzymes) et de cofacteurs inactifs, les plaquettes, une lipoprotéine tissulaire (facteur tissulaire), certaines structures vasculaires et les ions calcium. Ces facteurs de la coagulation sont activés séquentiellement en particulier au contact de la surface plaquettaire activée [24][37].

La coagulation sanguine est un mécanisme complexe hautement régulé à travers un équilibre dynamique entre forces pro-et anticoagulantes, ces dernières étant constituées par des systèmes inhibiteurs [38][39].

4. Physiologie de la coagulation :

Chez les humains et d'autres vertébrés, la coagulation sanguine est la première ligne de défense contre les traumatismes du système vasculaire. Dans le cas d'une blessure non intentionnelle (cas des accidents) ou intentionnelle (cas de chirurgie), la coagulation sanguine forme rapidement un caillot de sang. Le temps approximatif pour l'arrêt d'un saignement est en moyenne 2-5 minutes si le système fonctionne correctement. S'il y a une défaillance à un certain niveau, le saignement peut considérablement être prolongé [43].

Généralement la coagulation sanguine est initiée par l'exposition du collagène sous-endothélial et du facteur tissulaire (FT) au contact du sang au niveau de la lésion [44]. Les plaquettes adhèrent au contact du collagène, s'activent et acquièrent une surface phospholipidique chargée négativement, au contact de laquelle s'effectue l'activation en plusieurs étapes des facteurs de la coagulation aboutissant à la génération de la thrombine.

Le FT se lie au facteur VII pour l'activer en facteur VIIa. Le complexe VIIa-FT active le facteur X, pour donner le Xa, qui en présence du facteur Va, transforme la prothrombine en thrombine (thrombino-formation). Cette voie d'activation est connue classiquement sous le nom de la voie extrinsèque, reconnue comme prépondérante. Un effet rétroactif positif de la thrombine sur l'activation des cofacteurs V et VIII, rend sa génération explosive.

D'autre part, l'activation dite des facteurs de contact, débutant par l'activation du facteur XII en XIIa, représente une deuxième voie de génération de thrombine appelée classiquement voie intrinsèque.[45]

La nouvelle théorie de la coagulation, propose une voie unique triphasique constituée par une phase d'initiation (déclenchée par le contact du FT avec le sang, ancienne voie extrinsèque) une phase de propagation à travers le FXIa par la thrombine à leur surface (voie alterne). Le

FXIa peut aussi être obtenu à travers l'activation des facteurs de contact (ancienne voie intrinsèque) [46][47] (**Figure 4**).

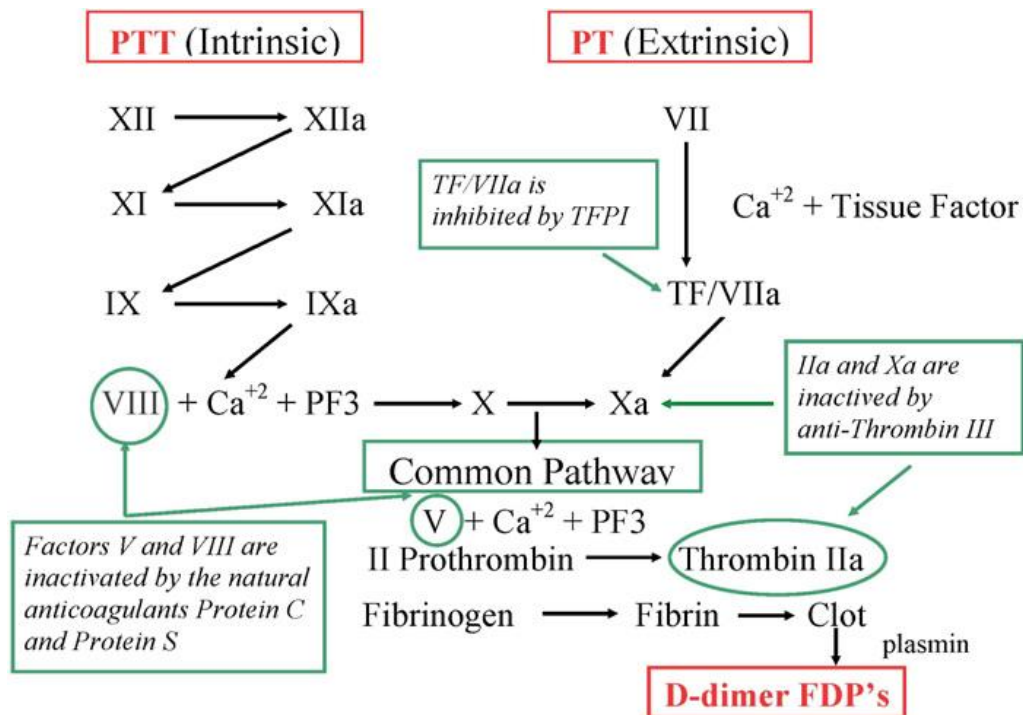


Figure 4: voies intrinsèque et extrinsèque de la coagulation sanguine (Vandita et al.[48])

La formation excessive de la fibrine est limitée par plusieurs mécanismes anticoagulants. Sous les conditions physiologiques normales, un niveau de base d'une coagulation activée est maintenu d'une manière FT dépendante [49]. Ce taux faible d'activité offre un système flexible qui peut répondre rapidement à une lésion endothéliale. Cette dernière déclenche la cascade de coagulation mais aussi la voie fibrinolytique. Dans celle-ci, le plasminogène est transformé en plasmine dégradant le fibrinogène et la fibrine, limitant la taille du caillot formé et par ailleurs réduisant le caillot fibrino-plaquettaire une fois la lésion endothéliale réparée [24].

5. Le facteur tissulaire :

Le FT est une glycoprotéine membranaire intégrale qui est étroitement liée aux phospholipides. Il a une forte affinité au facteur VII qui circule dans le sang. Quand une lésion vasculaire se produit, les deux protéines forment un complexe en présence des ions de calcium ce qui facilite la conversion du facteur VII à une sérine protéase (FVIIa) par une protéolyse [50].

6. La thrombine :

La thrombine est une sérine-protéase de type trypsine [51], elle est l'enzyme finale de la cascade de coagulation et l'enzyme-clé de la coagulation [52][48]. La thrombine est critique pour l'amorçage, la propagation et l'atténuation de la réponse hémostatique. Elle régule également sa propre production soit en la stimulant en particulier par un mécanisme de rétroaction positive en activant en retour les facteurs V et VIII, soit en l'abaissant par un mécanisme de rétroaction négative en particulier quand elle se lie à la thrombomoduline, une glycoprotéine de la surface des cellules endothéliales [48][53], à ce moment, la thrombine se transforme d'un procoagulant à un anticoagulant et active la protéine C [45] (**Figure 5**).

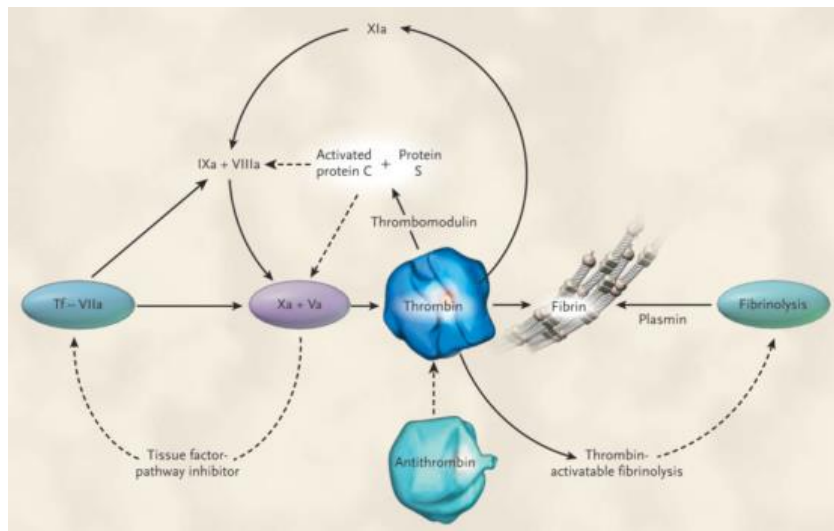


Figure 5 : Rôle procoagulant et anticoagulant de la thrombine (Marcello et al.[54])

I.6. Les anticoagulants :

Les anticoagulants sont des agents primordiaux pour la prévention et le traitement des troubles thromboemboliques. En effet, les choix des anticoagulants ont augmenté de façon exponentielle ces dernières années, avec de nouvelles options disponibles pour la prévention et le traitement de la maladie thrombotique.

Le traitement anticoagulant réduit l'incidence de décès et les événements thromboemboliques. Le risque de saignement associé au traitement est la principale limite pour l'utilisation des anticoagulants [55].

Depuis plus de 60 ans, l'utilisation des anticoagulants oraux était limitée aux antagonistes de la vitamine K (AVK). Les AVK sont efficaces et recommandés pour la prévention de la thromboembolie veineuse et artérielle dans les maladies cardiovasculaires, mais leur

pharmacodynamie est difficile à prédire et les réponses interindividuelle et intra-individuelle très variables au traitement expliquent la nécessité d'une surveillance continue. Cela a incité à l'exploration intensive de nombreuses substances au cours de la dernière décennie pour tenter de combler les lacunes de l'anticoagulation orale actuelle avec les AVK [56].

1. Régulation du système de la coagulation :

Trois types d'anticoagulants naturels régulent la coagulation sanguine :

- **La voie de l'inhibiteur du facteur tissulaire TFPI (Tissue Factor Inhibitor Pathway) :**

L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) est une protéine sécrétée par l'endothélium, est le principal inhibiteur naturel de la coagulation à travers le facteur tissulaire (FT). Le TFPI est un inhibiteur de type Kunitz qui inhibe le complexe FT-FVIIa via un mécanisme de rétroaction en deux étapes par formation d'un complexe biomoléculaire FXa-TFPI qui interagit ensuite avec FT-FVIIa, donnant un complexe quaternaire inactif et aboutissant à la terminaison de l'activation de FX catalysée par FT-FVIIa [57][58].

- **Le système de protéine S-protéine C :**

La protéine S est une composante essentielle de la voie de la protéine C. La protéine C activée (APC) est une sérine protéase qui inhibe la production de la thrombine par inactivation des facteurs de coagulation Va et VIIIa. La protéine S est un cofacteur dans ces réactions qui augmente l'activité anticoagulante de l'APC jusqu'à 20 fois. La protéine S peut également diminuer la production de la thrombine en absence d'APC [57][59].

- **Les inhibiteurs physiologiques circulants : antithrombine et héparine cofacteur II :**

L'antithrombine (AT) et l'héparine cofacteur II (HCII) sont deux inhibiteurs physiologiques plasmatiques circulants des sérine-protéases de la coagulation. Leur effet inhibiteur est augmenté par l'héparine et les polysaccharides heparin-like. Le complexe antithrombine-héparine (ATH) réagit rapidement avec la thrombine et catalyse efficacement l'inhibition de la thrombine ou du facteur Xa par l'antithrombine exogène [60] (**Figure 6**).

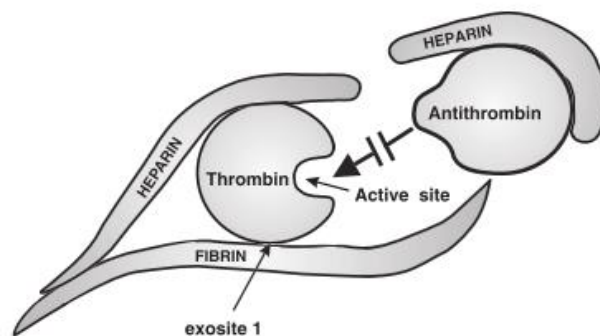


Figure 6: Mécanisme d'inhibition de la thrombine par l'héparine (Weitz et al. [64])

2. Les anticoagulants directs et indirects :

Deux classes d'agents antithrombotiques ont été étudiées: les molécules anticoagulantes et les molécules antiplaquettaires qui inhibent la formation et la croissance du thrombus. La thérapie anti-thrombotique est utilisée pour la prévention et le traitement de la thrombose artérielle et veineuse. La thrombose artérielle est formée sous des conditions de forces de cisaillement assez élevées générant ainsi des plaquettes riches en fibrine. Par conséquent les médicaments anti plaquettaires sont plus efficaces dans le traitement de la thrombose artérielle, cependant les antithrombotiques sont généralement plus efficaces dans la prévention et le traitement de thrombo-embolismes veineux [61].

Les médicaments anti-thrombotiques sont utilisés pour la prévention et le traitement de la thrombose ciblant différentes composantes du système. Ces agents comprennent les agents antiplaquettaires, anticoagulants, et les agents fibrinolytiques [62]. La plupart des anticoagulants oraux, notamment la warfarine, sont des antagonistes de la vitamine K [63].

En effet les inhibiteurs de la thrombine peuvent être classés comme étant soit direct ou indirect. Les inhibiteurs indirects de la thrombine, tels que les héparines et les antagonistes de la vitamine K, bloquent respectivement l'action et la production de la thrombine, soit en activant des inhibiteurs de la thrombine d'origine naturelle ou en inhibant des facteurs spécifiques dans le système de coagulation pour les premiers ou en empêchant la production de facteurs de la coagulation fonctionnels au niveau hépatique pour les seconds. [64].

Les antagonistes de la vitamine K étaient les agents primaires utilisés pour l'anticoagulation dans certaines maladies cardiovasculaires et thromboemboliques durant plus de 50 ans. Leur action est parfois problématique, car il existe des différences individuelles interpatients qui donnent lieu à une efficacité variable du traitement et de sa durée d'action. Des problèmes

sont aussi liés à l'utilisation des héparines, tels le risque hémorragique et la thrombopénie induite par l'héparine (TIH) [65].

Par conséquent, les inhibiteurs directs de la thrombine ont été développés et examinés pour leurs utilités dans la prophylaxie et le traitement de thromboembolismes veineux, le syndrome coronarien aigue et la TIH.

Répondant aux besoins de nouveaux anticoagulants, actuellement plusieurs inhibiteurs directs de l'activité de la thrombine sont approuvés par la «Food and Drug Administration» (FDA) comme: lepirudine, desirudine, hirudine, mélagatran, bivalirudine et l'argatroban [63]. Ces inhibiteurs directs de la thrombine, atteignent leur effet anticoagulant en se liant directement à la molécule de la thrombine l'empêchant ainsi d'interagir avec ses substrats [64] (**Figure 7**).

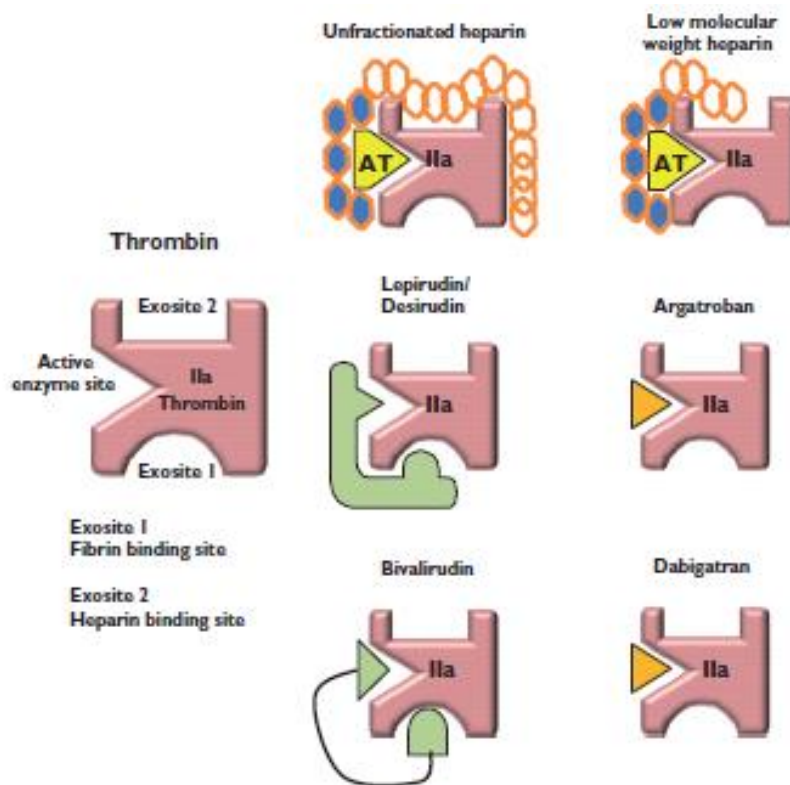


Figure 7: Interaction de la thrombine (IIa) avec les différents anticoagulants directs (Lee et al. [63])

3. Exemple d'inhibiteur compétitif direct de la thrombine : L'argatroban:

L'activité anticoagulante de la molécule de dérivé coumarinique (DCBC) synthétisée, qui est un inhibiteur direct de la thrombine (démonstré par Raphaël et al [66]), a été évaluée en

comparaison avec un inhibiteur compétitif direct de la thrombine, l'argatroban, c'est un dérivé synthétique commercial de la L-arginine utilisé dans la prophylaxie et le traitement des thrombopénies induites par l'héparine [67].

L'argatroban est un inhibiteur sélectif, direct et puissant de la thrombine [68] découvert en 1970 par Shousuke Okamoto [69] (**Schéma1**). C'est un dérivé d'arginine, de faible poids moléculaire avec une demi-vie de 39 à 51 min [70]. L'argatroban est dotée d'une action antithrombine rapide et efficace.

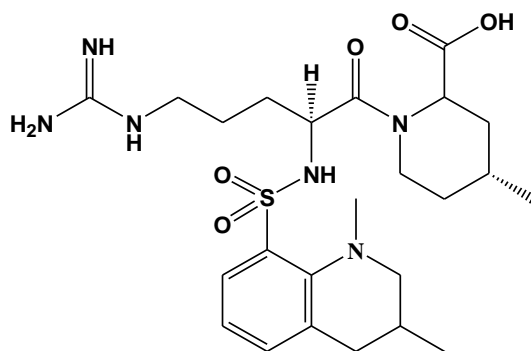


Schéma 1 : Structure chimique de l'Argatroban

L'argatroban se lie au site actif de la thrombine d'une façon sélective et réversible inhibant ainsi ses activités catalytiques [67] contrairement à l'héparine qui inhibe la thrombine en stimulant l'action inhibitrice de la protéase de l'antithrombine III [71], l'argatroban inhibe la thrombine directement via l'interaction avec le site actif de la sérine, donc il inhibe tous les effets médiés par la thrombine y compris l'agrégation plaquettaire, la formation de fibrine, et l'activation de facteur XIIIa en absence de l'antithrombine III. L'argatroban possède une courte durée d'action (25 min) chez les animaux et les humains [70]. Pour toutes ces raisons, cette molécule a été choisie afin de comparer ses activités antithrombiques à celles du dérivé coumarinique synthétisé.

En revanche, la plupart des médicaments antithrombotiques sont caractérisés par une efficacité thérapeutique très limitée à cause de leur nature hydrophobe [72], ces médicaments présentent deux limitations majeures : un indice thérapeutique étroit et une fluctuante relation dose-réponse [73][74].

Toutefois, les dérivés coumariniques constituent une partie de ces médicaments.

II. Les dérivés coumariniques

les dérivés coumariniques sont des molécules naturelles qui se trouvent généralement dans les herbes, les orchidées, les agrumes et les légumes dans toutes les parties des plantes (feuilles, tige, racines, etc...) [14][75] ou synthétiques[76]. Ces composés appartenant à la famille de benzopyrones [77] sont connus pour leur importance dans la médecine [78] avec un large éventail d'activités biologiques [13].

Jusqu'à présent, plus de 1300 coumarines ont été identifiées de sources naturelles. Elles ont pris leur nom de «coumarou», le nom vernaculaire de la fève de tonka (famille des Fabacées), à partir de laquelle la coumarine est isolée en 1820 [79][80]. Les coumarines sont solubles dans l'alcool [15] et sont connues par leurs odeurs agréables [81]. Quelques huiles essentielles contiennent aussi de la coumarine, particulièrement l'huile des écorces de cannelle, l'huile de feuille de cassia, et l'huile de lavande. Bien que la plupart des coumarines naturelles sont isolées à partir des plantes, une partie de coumarines est découverte dans les microorganismes tels que Streptomyces et Aspergillus [82].

Les coumarines (2H-1-benzopyran-2-ones) sont des coumarines synthétiques, appartenant à la famille de benzopyrones[77]. ces sont des hétérocycles contenant de l'oxygène, et elles comprennent une classe très large de substances phénoliques incolores ayant un goût amer [11] (**Schéma 2**).

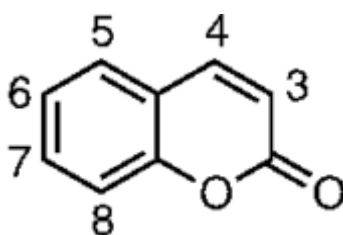


Schéma 2 : Structure chimique de la coumarine [83]

Certains dérivés coumariniques d'origines naturelles et synthétiques ont montré diverses activités biologiques y compris : des activités anticancéreuse [84], anti-HIV [77], anti-inflammatoire [85], antibactérienne [86] et dans la maladie d'Alzheimer [87][88]. Par ailleurs, ils sont utilisés dans la conception des médicaments et aussi comme marqueurs biologiques [89]. les propriétés pharmacologiques et biochimiques des coumarines ainsi que leurs applications thérapeutiques dépendent de motifs de substitution [79].

les principales applications des dérivés coumariniques correspondent à la prévention et au traitement des maladies thromboemboliques [90], grâce à leurs activités anticoagulantes [16].

Les coumarines ont été synthétisées pour la première fois en 1868, elles étaient utilisées dans l'industrie pharmaceutique comme des précurseurs de la synthèse d'un certain nombre des anticoagulants pharmaceutiques synthétiques [83].

L'histoire de la découverte et le développement des effets anticoagulants de coumarines a commencé dans les années 1920 dans le Nord du Dakota (Etats-Unis) et en Alberta (Canada), lorsque les bovins ont été frappés par un nouveau type de maladie hémorragique. En 1939, Campbell et Link ont identifié l'agent hémorragique : «le dicoumarol». En 1941, ce dernier a été testé avec succès, comme agent anticoagulant, dans le traitement des thromboses postopératoires chez les patients de la clinique Mayo. Cependant, par crainte d'une éventuelle toxicité, il a fallu attendre les années 1950 pour que les dérivés coumariniques soient introduits en médecine. Depuis, les dérivés coumariniques ont démontré leur efficacité clinique dans la prévention et le traitement des thromboembolies veineuses et artérielles [17].

Certains dérivés coumariniques agissent comme des inhibiteurs compétitifs de la vitamine K époxyde réductase, qui est responsable de la régénération de la vitamine K réduite, après qu'elle ait été consommée comme cofacteur pour la synthèse des facteurs de coagulation : II, VII, IX et X (appelés facteurs de la coagulation vitamine K dépendants), entraînant ainsi la formation de protéines non fonctionnelles [18]. La formation de facteurs fonctionnels requiert en particulier une γ -carboxylation, qui ne peut être réalisée en l'absence de vitamine K ou en présence d'agonistes de celle-ci. Il en résulte une production hépatique PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence/Agonists) dépourvues d'activité procoagulante [19]. Les coumarines créent aussi un déficit fonctionnel des protéines anticoagulantes C et S [20].

Les anticoagulants oraux sont introduits dans la pratique médicale depuis des années, mais leurs mécanismes d'action restent incomplètement connus. L'utilisation extensive de ces médicaments dans la prévention et le traitement des maladies thromboemboliques les ont rendu un parmi les agents pharmacologiques les plus utilisés [91].

Actuellement, la plupart des agents anticoagulants sont des coumarines comme la warfarine, le dicoumarol, et l'acénocoumarol. Ces molécules appartiennent à la classe des 4-hydroxycoumarines qui sont des anticoagulants oraux utilisés pour la prévention du thromboembolisme veineux primaire et secondaire, l'embolisme systémique et la fibrillation

artérielle. Ces sont aussi des prophylactiques utilisés chez les patients ayant souffert d'infarctus aigu du myocarde, et dans la prévention de l'embolisme systémique chez les patients ayant un risque élevé de sténose mitrale [92].

Il convient de souligner que les patients sous anticoagulants oraux doivent être suivis pour le contrôle des effets secondaires [93].

Les limites d'utilisation des anticoagulants existants, antagonistes de la vitamine K et héparines en particulier, ont conduit au développement de nouvelles thérapies anticoagulantes. Par conséquent, des nouveaux anticoagulants ont été conçus pour cibler spécifiquement des enzymes ou des étapes de la coagulation [94] [95]. (**Figure 8**)

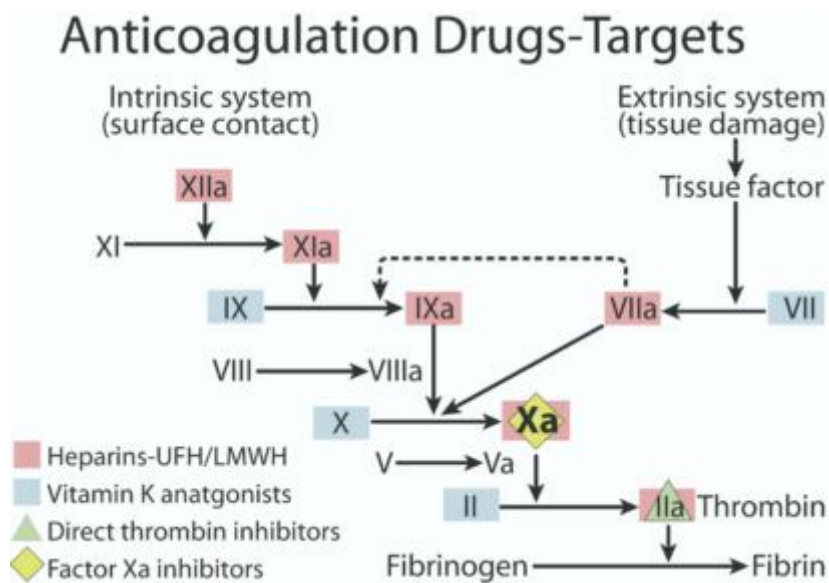


Figure 8: Les principaux sites d'action des anticoagulants (Jay et al.[95])

Ainsi des nouveaux anticoagulants sont actuellement sous évaluation dans les essais cliniques y compris : des inhibiteurs indirects et directs de facteur VIIa/FT, inhibiteur de facteur FXa, activateur de la protéine C et les inhibiteurs directs de la thrombine (ANSM).

Le ximelagatran, un inhibiteur oral direct de la thrombine, est le premier d'une série de nouveaux agents qui semblaient prometteurs. La phase III des essais cliniques évaluant le ximelagatran pour la prévention secondaire de thromboembolisme veineux, et la prévention des événements d'embolie cardiaque chez les patients souffrant d'une fibrillation artérielle a été effectuée [94]. Toutefois, ce médicament a été retiré du marché après sa

commercialisation, suite à un cas d'hépatite grave survenu chez un patient après 35 jours de son utilisation (ANSM).

Selon des études récentes, de nouveaux dérivés de la warfarine dans laquelle le groupe fonctionnel «phenylpentan-2-one» en position C3 sont remplacés par une chaîne latérale d'isoprenyl, sont évalués pour leurs propriétés anticoagulantes *in vitro*. L'étude a montré que d'autres groupes fonctionnels, structurellement différents en les comparant avec le 4-phenylpentan-2-one, peuvent aussi contribuer à l'activité anticoagulante [96].

1. La warfarine :

La warfarine, de son nom chimique 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phénylbutyl)-2H-chromén-2-one [97] appelée aussi coumaphène ou coumadine a été largement utilisée depuis plus de 50 ans [98] et se présente comme l'un des principaux anticoagulants oraux administrés pour le traitement prophylactique de divers troubles thromboemboliques [99] (**Schéma 3**). Selon les statistiques, dans la prescription cardiovasculaire, la warfarine occupe le quatrième rang [100]. A l'origine, elle était utilisée comme rodenticide, sa première utilisation humaine était une tentative de suicide en 1952 [101].

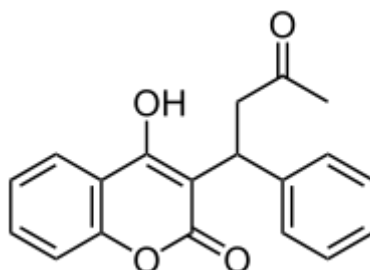


Schéma 3 : Structure de la Warfarine

La warfarine est un antagoniste de la vitamine K. Elle exerce son effet anticoagulant en interférant avec la conversion cyclique de la vitamine K, par conséquent, la production de facteurs de coagulation vitamine K dépendants (II, VII, IX et X) non fonctionnels et les inhibiteurs de la thrombine (protéine C et protéine S) (**Figure 9**).

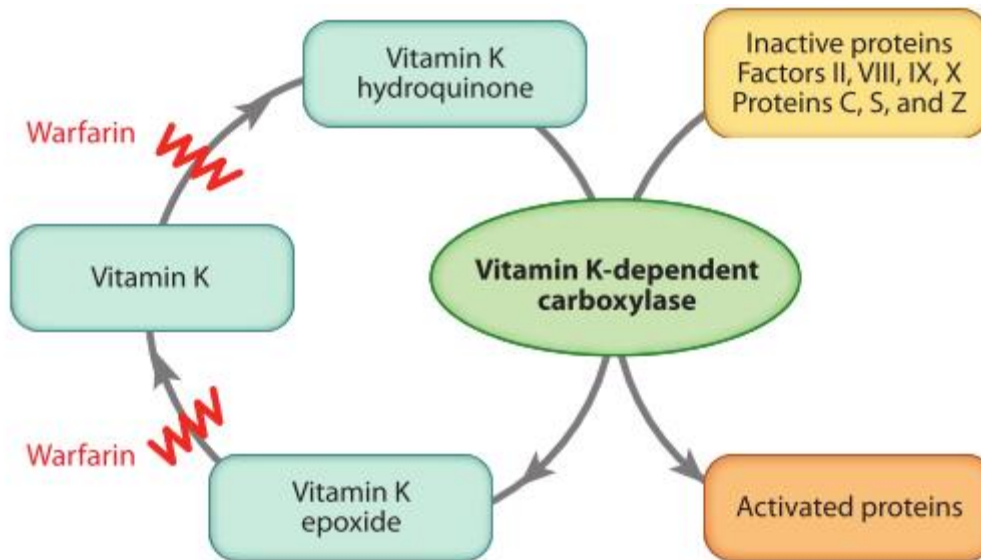


Figure 9: Action de la warfarine sur le cycle de la vitamine K [102]

En outre, la relation dose-réponse de la warfarine diffère entre les sujets sains et peut varier largement chez les patients. Elle peut être influencée par plusieurs facteurs tels que les facteurs pharmacocinétiques en raison des différences dans l'absorption ou la clairance métabolique de la drogue induite ou pas par des interactions médicamenteuses ou le sexe du patient [103].

Bien que ce médicament soit utilisé depuis longtemps et fréquemment, les complications qui peuvent survenir en raison de son faible indice thérapeutique, et les difficultés générales associées au suivi de cette substance et de la corrélation avec l'état physiologique du patient [98] restent les limitations majeures pour son utilisation. De plus, rappelons que l'utilisation de la warfarine est ainsi limitée par un indice thérapeutique étroit qui exige une surveillance fréquente et une thérapie particulière personnalisée pour chaque patient [92]. La warfarine peut être quantifiée par plusieurs méthodes d'analyse comme: la spectrophotométrie, la fluorimétrie, et l'HPLC [97]

D'autre part, la warfarine est plus utilisée que l'acenocoumarol en raison de sa demi vie plus longue (36 h), théoriquement la warfarine entraîne un effet anticoagulant stable et évite les variations du facteur VII qui pourrait éventuellement se produire pendant le traitement avec l'acenocoumarine (demi-vie = 10 h) [83].

2. Mécanisme d'action de la warfarine :

La warfarine interfère avec la synthèse des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants par l'inhibition de la sous-unité C1 du complexe enzymatique Vitamine K époxyde réductase (VKORC1), ce qui réduit la régénération de la vitamine K réduite. Le degré d'inhibition dépend de la dose administrée et, en partie, du génotype VKORC1 du patient. Les doses thérapeutiques de la warfarine diminuent la quantité totale de la forme active de chacun des facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K produite par le foie d'environ 30% à 50%.

Un effet anticoagulant se produit généralement dans les 24 heures après l'administration du médicament. Cependant, l'effet anticoagulant optimal peut être retardé de 72 à 96 heures. La durée d'action d'une seule dose de warfarine racémique est de 2 à 5 jours. Les effets de la warfarine peuvent devenir plus prononcés quand les effets des doses quotidiennes se chevauchent. Les anticoagulants n'ont aucun effet direct sur un thrombus établi, ni sur les dommages dans les tissus ischémiques. Cependant, une fois un thrombus formé, l'objectif du traitement anticoagulant est d'empêcher une nouvelle extension du caillot et prévenir les complications thromboemboliques secondaires qui peuvent entraîner des séquelles graves et parfois fatales [104].

3 Cycle de la vitamine K

La vitamine K est responsable de la conversion post-traductionnelle des résidus du glutamate en acide glutamique «Gla» dans un nombre limité de protéines. Les plus connues d'entre elles sont les facteurs de coagulation sanguine II, VII, IX, X, protéine C, protéine S, protéine Z, et les protéines de la matrice osseuse [20].

L'acide γ -carboxyglutamique permet la liaison du calcium à ces protéines induisant, de ce fait, leur changement conformationnel, indispensable à leur liaison avec les différents cofacteurs actifs de la surface cellulaire. La forme réduite de la vitamine K (KH_2) agit comme un coenzyme pour la carboxylase. L'oxydation de la vitamine par l'oxygène en vitamine k-époxyde (KO) fournit de l'énergie pour fixer le dioxyde de carbone (CO_2) à la position γ du résidu glutamate [20].

A ce moment là, la vitamine K sera recyclée, d'abord par la vitamine KO réductase en vitamine K (quinone), ensuite par la vitamine K réductase en vitamine KH_2 (hydroxyquinone). Les anticoagulants oraux inhibent la vitamine KO réductase et la vitamine K réductase, induisant la diminution de la vitamine KH_2 et, par conséquent, l'accumulation de

vitamine KO dans les tissus comme le foie et le plasma (**Figure 10**) et la production de facteurs de la coagulation vitamine K dépendants non fonctionnels appelés PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence/Agonists [105][106]).

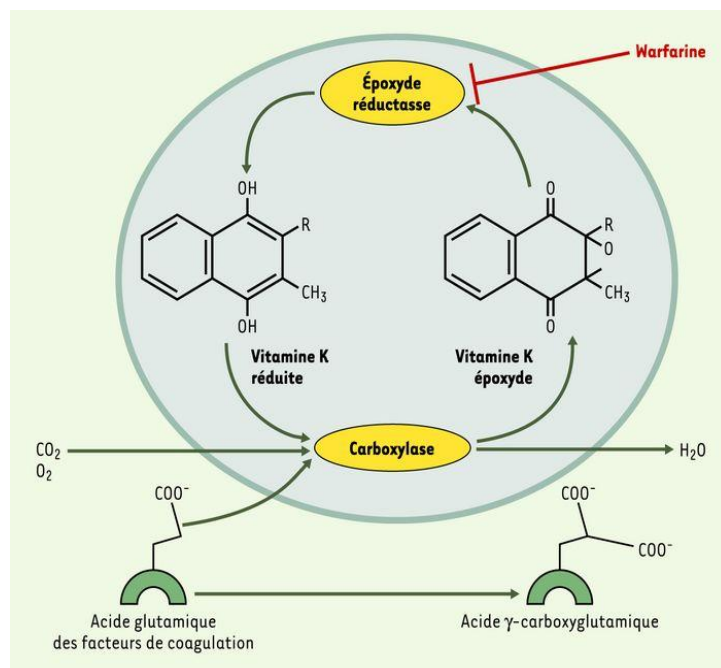


Figure 10: Cycle de la vitamine K.

4. Exemple d'un dérivé coumarinique inhibiteur direct de la thrombine : le 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (DCBC) :

Le 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (DCBC) (**Schéma 4**) est un dérivé coumarinique synthétisé dans le cadre d'un projet global dans lequel s'inscrit la présente étude, possédant des similarités de structure avec la warfarine qui, rappelons-le, est prise comme molécule modèle dans l'élaboration des systèmes nanoparticulaires à base de dérivés de PDMMLA et servant de système de libération contrôlée.

Cette molécule a été synthétisée en premier lieu par Raphaël et al [66] ainsi que d'autres dérivés coumariniques afin de déterminer leurs effets antithrombotiques vis-à-vis du facteur IIa

(la thrombine) et du facteur Xa de la coagulation. Le DCBC a montré une activité antithrombique plus efficace par rapport à tous les autres dérivés dans un système purifié.

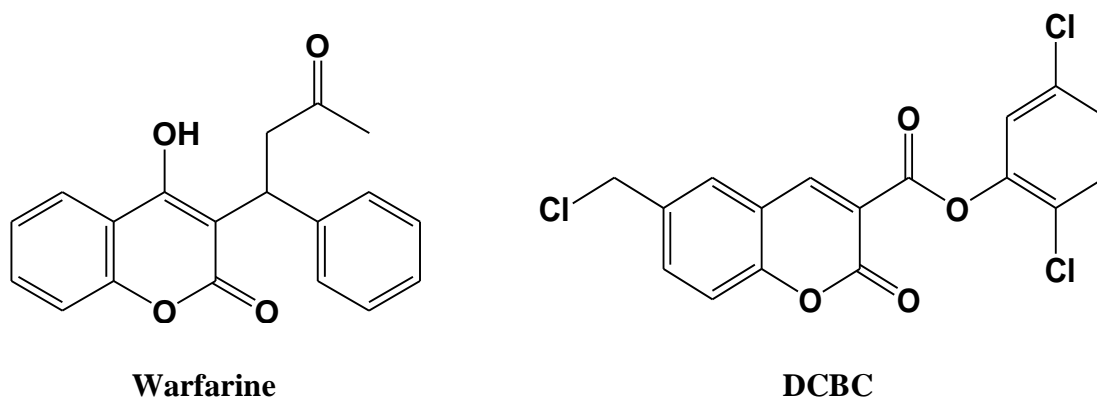


Schéma 4 : Structure chimique de la Warfarine et de DCBC

Ce dérivé ne possède pas d'activité antivitamine K, analogue à celle de la warfarine, mais possède néanmoins des propriétés anticoagulantes d'intérêt en tant qu'inhibiteur direct de la thrombine, enzyme clé de la coagulation.

III. Les polymères biodégradables

L'ingénierie des biomatériaux est un domaine passionnant et multidisciplinaire. Il s'agit de matériaux conçus et développés pour des applications biomédicales destinées à l'amélioration de la santé et de la qualité de la vie humaine. Un biomatériau est une substance qui est utilisée dans les prothèses ou dans des dispositifs médicaux conçus pour une application bien déterminée pendant une durée de temps bien précise dans l'organisme [107].

Les applications des biomatériaux vont des applications diagnostiques telles que le développement des réseaux de gènes et de biocapteurs, des équipements médicaux tels que les poches de sang et des outils chirurgicaux, des traitements thérapeutiques jusqu'aux les implants et les dispositifs médicaux ainsi que la médecine régénérative impliquant le génie tissulaire [108].

Par ailleurs, ces matériaux présentent un intérêt exponentiel dans les applications médicales et pharmaceutiques comme :

- les systèmes d'administration de médicaments,
- Le traitement local d'un cancer,
- Développement de vaccins,
- La formulation de nanoparticules avec une amélioration de la demi-vie plasmatique,
- Les systèmes de libération contrôlée autorégulés,
- Les appareils orthopédiques et la lutte contre l'insuffisance organique [109], [110],[111]
- Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire [112].

La sélection de biomatériaux joue un rôle très important dans la conception et le développement des implants médicaux et de produits d'ingénierie tissulaire [113][114].

Les polymères, à la fois synthétiques et naturels, constituent des classes très diversifiées de biomatériaux. Ils sont disponibles dans une grande variété de compositions et des propriétés. Ils peuvent être facilement traités pour former des formes complexes avec toutes les tailles en fonction de leur application finale. En outre, leurs propriétés de surface, qui sont importantes dans les applications biologiques, peuvent être facilement modifiées physiquement, chimiquement ou biochimiquement [107]. Par conséquent le développement rapide des exigences en matière de techniques et d'appareils, implique de plus en plus des nouveaux systèmes basés sur des matériaux polymères [73].

Actuellement et avec le progrès des applications biologiques des polymères, un polymère doit avoir plusieurs caractéristiques, essentiellement la bioassimilabilité, la non toxicité et la biodégradabilité [115].

Par conséquent des biopolymères ayant des diverses propriétés spécifiques sont nécessaires pour des applications *in vivo* en raison de la diversité et de la complexité des environnements *in vivo*. Par conséquent, les polymères biodégradables ont connu un intérêt croissant au cours des deux dernières décennies dans la recherche fondamentale, ainsi que dans l'industrie chimique [116].

Dans ce contexte, l'évolution du génie tissulaire, de la médecine régénérative, de la thérapie génique et de la libération contrôlée des médicaments a suscité la nécessité de nouvelles propriétés des biomatériaux biodégradables [117].

En effet, les matériaux dégradables ont suscité un intérêt croissant pendant ces dernières années [118]. Un polymère donc est considéré comme biodégradable si la dégradation est due à l'action des enzymes, ou un processus chimique comme l'hydrolyse et l'oxydation. Les polymères biodégradables constituent une classe intéressante de matériaux lesquels se dégradent pour donner des produits non-toxiques. Ces polymères sont utilisés pour le développement des matériaux écologiques, pour la conception des matériaux de chirurgie comme les plaques de fixation osseuse, les sutures, les dispositifs d'administration de médicaments dans le domaine pharmaceutique et dans les structures de soutien (scaffolds) pour des applications en ingénierie tissulaire [119].

Les polymères biodégradables, qui ont été utilisés pour les applications biomédicales, peuvent être divisés en deux classes générales:

- ✓ Les polymères naturels qui sont disponibles dans une large variété de compositions et propriétés [120] : polysaccharides tels que l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, la chitine et le chitosane, les alginates et la cellulose [121], et des protéines telles que le collagène [120][122].

- ✓ Les polymères synthétiques : comme les poly(alkylcyanoacrylates)[123], le poly(éther-ester) [124], les polyesters aliphatiques et aromatiques [119][125], le poly(amino)acide [115], le polyurethanes[126], les polyanhydrides[107], les poly(ortho) esters [127], les polyphosphazènes[128] et les polydepsiptides[129]...

Les biopolymères naturels et synthétiques biodégradables ont attiré une attention considérable. De nos jours, les biopolymères synthétiques sont devenus des alternatives attrayantes pour les applications biomédicales pour les raisons suivantes:

- Bien que la plupart des polymères biodégradables naturels possèdent une bonne biocompatibilité, certains peuvent déclencher une réponse immunitaire dans le corps humain, qui pourrait éventuellement être évitée par l'utilisation d'un biopolymère synthétique approprié;

- Les modifications chimiques des polymères biodégradables naturels sont difficiles;
- Les modifications chimiques provoquent vraisemblablement la modification des propriétés globales des polymères biodégradables naturels.

Par conséquent, on peut obtenir une variété de propriétés avec la possibilité d'effectuer plusieurs modifications avec des biopolymères synthétiques convenablement conçus sans modifier les propriétés originales [117]. Ainsi les polymères synthétiques sont souvent

préférés par rapport aux polymères naturels, étant donné qu'ils peuvent faire l'objet d'un meilleur contrôle de l'homogénéité et des propriétés mécaniques désirées qu'on veut leur faire acquérir [130]. Ils peuvent être facilement transformés pour constituer des formes complexes avec des tailles diverses selon leurs applications finales. En plus, leurs propriétés de surface, qui sont importantes dans les applications biologiques, peuvent être facilement modifiées [131].

La structure chimique des polymères joue un rôle essentiel dans leur biodégradation : elle est liée à la stabilité de leurs groupements fonctionnels, leur réactivité, et leur hydrophilie [132]. Les polymères synthétiques sont utilisés dans plusieurs domaines comprenant le transport, la construction, emballage, électronique, et les applications médicales [133].

Citant l'exemple des stents cardiovasculaires biodégradables comme une application médicale essentielle et croissante des polymères biodégradables, les stents actuels sont principalement constitués de matériaux métalliques, tels que l'acier inoxydable, le cobalt-chrome ou le nitinol. Cependant, les complications à long terme associées aux endoprothèses métalliques ont conduit à des recherches de remplacement totalement dégradables. Plusieurs exigences clés doivent être assurées par le stent polymère, les deux premières étant des propriétés mécaniques et des caractéristiques de dégradation, dans ce sujet les produits de dégradation devraient être biocompatibles et le processus de dégradation ne devrait pas compromettre l'intégrité structurale de l'appareil jusqu'à 6 mois [134][108].

Le poly (acide glycolique) (PGA), le poly (acide lactique) (PLA), et leurs copolymères poly (acide glycolique-acide *co*-lactique) (PLGA) sont les polymères synthétiques dégradables les plus utilisés en médecine. Le PGA a la structure la plus simple et est plus hydrophile que le PLA. Le PGA est hautement cristallin et possède un point de fusion élevé et une faible solubilité dans les solvants organiques. Le PGA a été utilisé dans le développement de la première suture résorbable totalement synthétique [128].

D'un autre côté, le poly (ϵ -caprolactone) (PCL) est un polyester aliphatique qui a été étudié d'une manière intensive comme biomatériau. La découverte de la dégradation de PCL par les micro-organismes a conduit à l'évaluation du PCL en tant que matériau d'emballage biodégradable; plus tard, il s'est avéré que le PCL peut également être dégradé par un mécanisme hydrolytique dans des conditions physiologiques. Dans certaines circonstances, le PCL réticulé peut être dégradé par voie enzymatique, selon le mécanisme d'érosion de

surface. Par rapport au PGA ou au PLA, la dégradation du PCL est nettement plus lente. Par conséquent le PCL, été utilisé pour la conception des matériaux ayant une dégradation à long terme, tels que les systèmes implantables, et les dispositifs contraceptifs implantables [128].

En particulier, les homopolymères et les copolymères de l'acide lactique et glycolique ont été utilisés dans la recherche comme des polymères appropriés pour les systèmes d'administration des médicaments en raison de leur biocompatibilité et leur dégradation hydrolytique en acides lactique et glycolique, qui sont ultérieurement éliminés sous forme de dioxyde de carbone et d'eau via le cycle de Krebs [110][135]. Par conséquent, les recherches dans l'utilisation des polymères synthétiques comme vecteur pour la libération contrôlée des médicaments ont évolué rapidement ces dernières années [136][137].

1. les dérivés de poly (acide (*R,S*)-3,3-diméthylmalique) PDMMLA :

Les dérivés de poly (acide (*R,S*)-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA) sont des nouveaux polymères biodégradables et bioassimilables obtenus à partir du produit commercial «2-oxalpropionate de diéthyle» par une polymérisation par ouverture de cycle. Cette technique de polymérisation s'est avérée être une voie de synthèse utile de polymères très spécifiques et intéressants avec des propriétés contrôlables [138].

La polymérisation par ouverture de cycle ou *Ring Opening Polymerization* (ROP) de lactones pour produire des poly (ester) aliphatiques fournit des polymères biocompatibles et biodégradables polyvalents possédant des bonnes propriétés mécaniques. Ces avantages sont à l'origine d'une attention croissante au cours des dernières années, grâce à leur application en tant que substituts biodégradables pour les applications dans le domaine biomédical [139]

Le poly acide malique (PMLA) est à l'origine du PDMMLA. En effet le PMLA est hautement biodégradable et biocompatible grâce à sa solubilité dans l'eau. Les propriétés de PMLA peuvent être modifiées pour diversifier ses applications par la modification chimique des groupes carboxyliques latéraux [140]. La méthylation des groupes carboxyles latéraux, a permis la formulation des nanoparticules stables et solubles dans l'eau, qui peuvent être chargées avec des protéines ou des médicaments pour des applications d'administration de principes actifs [141]. L'application la plus avancée rapportée pour le PMLA est le développement de «Polycefin», un prototype pour le transport et la distribution cellulaire d'oligonucléotides antisens ou d'autres médicaments [142]. Le PMLA est utilisé aussi comme un transporteur pour les médicaments anticancéreux comme le témozolomide [143] et le doxorubicin [144].

Ce polymère, avait été initialement synthétisé dans le but d'être utilisé comme un précurseur de médicament macromoléculaire. Cependant, ce polymère biodégradable est considéré actuellement comme un composé parent d'une grande famille de polymères fonctionnels, de copolymères et polystreoisomères [88] [145]. Le PMLA peut être produit naturellement par *Penicillium cyclopium*, *Physarumpolycephalum*, et *Aureobasidium*, et aussi par plusieurs méthodes industrielles représentatives qui sont décrites [146].

En 1975, Ringsdorf introduit l'idée de précurseurs macromoléculaires adaptés [10]. Le médicament peut être fixé à un squelette polymère soluble dans l'eau ou biodégradable par une liaison chimique biodégradable ou par l'intermédiaire d'un élément de liaison. Le modèle Ringsdorf était la base pour le développement de supports «transporteurs» de médicaments. Les polymères utilisés doivent être non toxiques, biocompatibles, non-immunogènes, et ne doivent en particulier pas avoir des sites de réactifs exposés et un faible indice de polydispersité (distribution étroite du poids moléculaire). Un grand nombre de polymères naturels et synthétiques portant des groupes fonctionnels multiples ont été exploités pour la conjugaison à des médicaments, y compris des polymères hydrosolubles synthétiques tels que le poly éthylène glycol, le poly glutamylglutamine et les polymères hydrosolubles naturels tels que l'acide hyaluronique, l'héparine et l'albumine. Le PMLA est un polyester biocompatible, non toxique, non immunogène et hydrosoluble. Il est dégradé en acide malique, qui est un intermédiaire du cycle de l'acide tricarboxylique, et il est complètement biodégradé en dioxyde de carbone [143].

Par conséquent, le poly(acide (*R,S*) -3,3-diméthylmalique) (PDMMLA) semble être un polyester aliphatique attrayant, soluble dans l'eau avec des groupes acide carboxylique latéraux le long de la chaîne. Le PDMMLA est biocompatible et se dégrade *in vivo* en donnant le L'acide (*R, S*) 3,3-diméthylmalique, qui est une molécule non toxique [147]. Ces nouveaux matériaux présentent des propriétés amphiphiles découlant de la présence conjointe de deux monomères qui sont le poly(acide (*R,S*) -3,3-diméthylmalique) hydrophile et le poly(hexyle (*R,S*) -3,3-diméthylmalique) hydrophobe [148]. La partie hydrophile des copolymères va permettre sa solubilisation dans les liquides physiologiques et la partie hydrophobe va permettre l'encapsulation du principe actif hydrophobe.

Par conséquent, deux types de copolymères dérivés du PDMMLA : des copolymères statistiques et des copolymères à blocs ont été obtenus par un procédé de polymérisation anionique par ouverture de cycle.

A partir de ces copolyesters biodégradables statistiques et à blocs, des nanoparticules amphiphiles et biodégradables conçues comme des vecteurs potentiels de médicaments ont été préparées. Ces nouveaux matériaux présentent des propriétés amphiphiles [149].

Dans d'autres études le PDMMLA a été utilisé pour vectoriser l'amphotéricine B et la clofazimine qui sont des médicaments puissants entravés par leurs faibles solubilités dans l'eau et leurs toxicités. Les vecteurs capables d'augmenter leurs solubilités dans l'eau, sont susceptibles d'améliorer les effets thérapeutiques de ces médicaments et d'autres molécules ayant des propriétés similaires. Les copolymères statistiques amphiphiles dérivés de poly(acide diméthylmalique) ont été obtenus en utilisant différents rapports d'hydrophobicité et des tailles différentes. La solubilité du pyrène, de la clofazimine, et d'amphotéricine B dans l'eau a été augmentée respectivement, jusqu'à 10 000, 20 000 et 1000 fois, dans des solutions aqueuses contenant ces polymères [150].

La préparation des α, α, β -lactones- β -trisubstituées a ouvert la voie à la polymérisation vivante anionique par ouverture de cycle de ces monomères. Par conséquent, les réactions de transfert dues à la présence d'hydrogène en α de la fonction carbonyle ont été limitées et il est maintenant possible de contrôler le poids moléculaire des polymères.

En outre, les groupes terminaux vivants conduisent à la préparation de séquences de copolymères à blocs avec des longueurs contrôlées. De la même manière, des copolymères statistiques avec des masses moléculaires élevées ont été synthétisés. La synthèse d' α, α, β -lactones- β -trisubstituées a ainsi ouvert la voie à l'obtention de nouveaux dérivés de la famille des polymères de l'acide malique. Plus important encore, le processus vivant de la polymérisation anionique permet l'adaptation des matériaux tels que les polyesters statistiques et multi blocs avec des masses moléculaires bien contrôlées et une polymolécularité étroite. Après la déprotection du groupement benzyle, ces nouveaux polymères amphiphiles pourraient former des auto-assemblages et des agrégats micellaires nanométriques de différentes morphologies en solution [151].

IV. La nanotechnologie

La nanotechnologie est la science de la manipulation de matériaux à l'échelle nanométrique [152]. La nanotechnologie, étant un domaine interdisciplinaire, a trois principaux domaines qui se chevauchent largement : nanoélectronique, nanomatériaux, et nanobiotechnologie, avec des applications dans le domaine médical [153].

La nanotechnologie est un domaine multidisciplinaire qui couvre un éventail vaste et diversifié de dispositifs issus du génie, la physique, la chimie et la biologie. Le nouveau domaine en plein essor de la nanotechnologie, ouvert par les progrès rapides de la science et de la technologie, crée de nouvelles possibilités pour faire avancer le traitement médical dans le domaine de la santé humaine [154]. Les applications de la nanotechnologie dans ce domaine impliquent des matériaux et des dispositifs conçus pour interagir avec le corps à l'échelle atomique et moléculaire avec un haut degré de spécificité [155] (**Figure 11**).

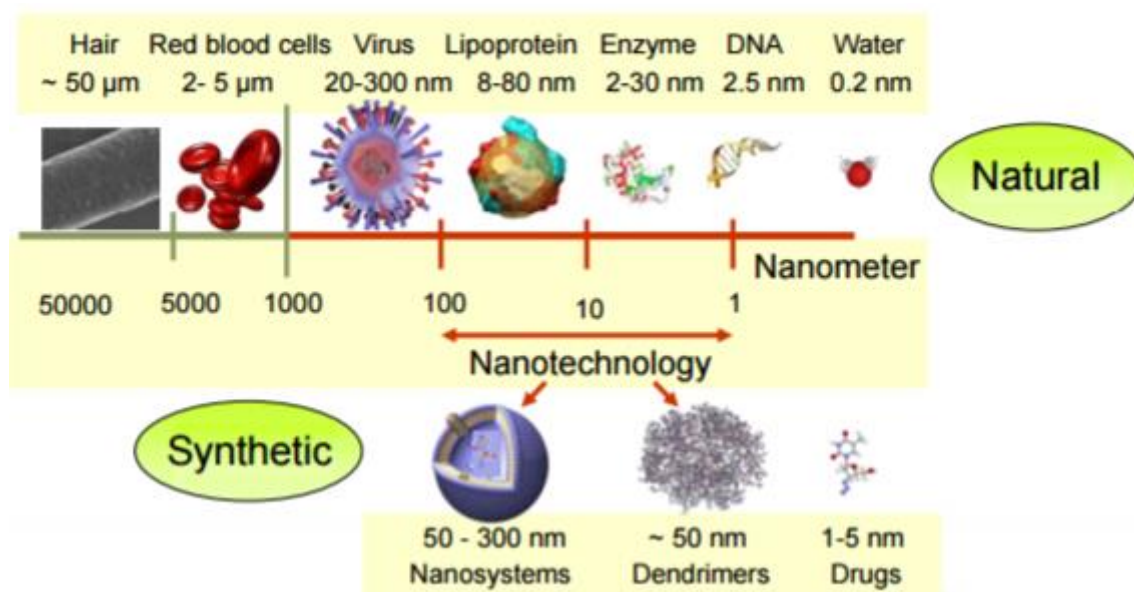


Figure 11: La nanotechnologie (Chauvierre et al.[156])

Par ailleurs, la nanotechnologie est une technologie transformative ayant le potentiel de stimuler l'innovation scientifique par le développement de nouvelles modalités thérapeutiques plus efficaces et plus sûres [157].

L'application de la nanotechnologie à la délivrance des principes actifs pourrait largement changer la physionomie de l'industrie pharmaceutique et biotechnologique dans un avenir proche [158]. En effet le développement continu des nouveaux systèmes de libération est déterminé par le besoin d'optimiser l'activité thérapeutique et minimiser les effets secondaires des principes actifs [159]. Ce développement est essentiel pour une thérapie efficace des futurs principes actifs ce qui implique des composés synthétiques plus variés et plus sophistiqués. Pour cette raison les nanoparticules sont devenues de plus en plus impliquées dans le développement de nouveaux matériaux pour l'innovation des applications d'imagerie

médicale et de systèmes de libération contrôlée telles que les nanoparticules polymériques biodégradables [160][161].

En fait la nanotechnologie a été introduite il y a plus d'un demi-siècle par Feynman (1960), basée sur l'idée d'avoir un médecin à l'intérieur du corps, une bonne métaphore pour l'utilisation des nanoparticules dans la médecine visant l'évaluation, le diagnostic et / ou le traitement. En conséquence, les progrès récents de la science et de la technologie des polymères a permis de concevoir et de synthétiser une large gamme de polymères avec des propriétés souhaitables [22]. Les nanoparticules polymériques sur mesure ont régulièrement acquis une importance en médecine grâce à leur longue demi-vie dans la circulation sanguine [23]. Leurs multiples possibilités de fonctionnalisation et l'incorporation de divers matériaux organiques et inorganiques [24], ainsi que leurs propriétés adaptables sont nécessaires pour des applications *in vivo* en raison de la diversité et de la complexité des environnements biologiques [25]. Par conséquent, des nouveaux polymères biodégradables qui représentent une classe de matériaux extrêmement utiles pour de nombreuses applications biomédicales et pharmaceutiques et avec des propriétés spécifiques sont désormais très demandés [25].

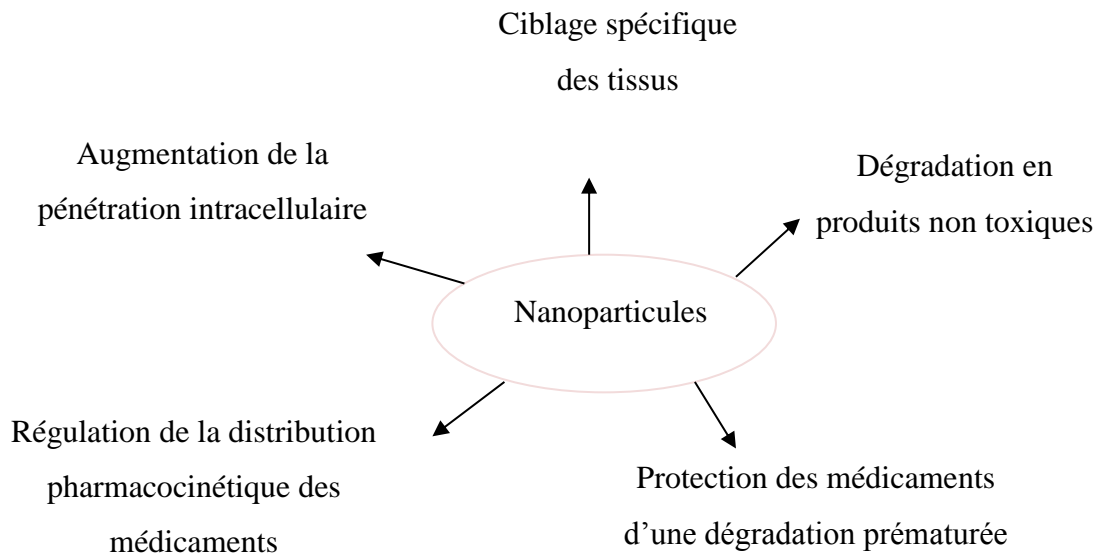
La polyvalence des copolymères rend possible le contrôle de la forme, de la taille, de la capacité d'encapsulation et de la fonction de ciblage des nanoparticules polymériques. Par conséquent les performances ne peuvent être obtenues qu'avec un haut niveau d'expertise de synthèse [32]. Ainsi, le concept de conjugaison médicament-polymère est principalement exploité pour :

- ✓ Améliorer la capacité du médicament à livrer plus précisément donc à minimiser les effets systémiques et ciblant uniquement les sites pathologiques [33]
- ✓ Masquer les propriétés intrinsèques physico-chimiques des substances [34]
- ✓ Augmenter la solubilité aqueuse et la biodisponibilité des médicaments moins solubles [35]

Pour toutes ces raisons, le succès d'un système de délivrance de médicaments repose sur une sélection appropriée du support polymère. Ces systèmes peuvent être administrés par des différentes voies : intraveineuse [36], orale [37], intra-péritonéale [40], cutanée ou sous-cutanée [41], sous forme de nanosphères [42], de nanocapsules [43], de nano-émulsions [44] et de liposomes, qui ont été les premiers supports introduits pour la délivrance de médicaments [34].[47].

Donc la conception d'un système basé sur des polymères fonctionnels dégradables pour la délivrance de médicament hydrophobe de manière spécifique au niveau d'un site pathologique bien déterminé reste toujours un défi à relever [48].

Ces systèmes, lorsqu'ils sont bien conçus, auront les avantages mentionnés ci-dessous [47] [49].



1. Nanoparticules et traitement des maladies cardiovasculaires :

Les nanoparticules sont définies comme des particules d'une taille comprise entre 1 et 100 nanomètres [162]. Leurs applications industrielles sont considérables et bien qu'il n'existe à l'heure actuelle que peu des applications pharmaceutiques proposées sous forme nanoparticulaire, on peut prévoir un développement spectaculaire de ces produits dans les années à venir. À court et moyen termes, l'utilisation majeure des médicaments nanoparticulaires sera la vectorisation des principes actifs. Elle correspond du reste aux quelques produits déjà commercialisés. On distingue à l'heure actuelle trois types de vecteurs:

- Les vecteurs de première génération : nanosphères et nanocapsules (les plus connues et les plus accessibles)
- Les vecteurs de seconde génération : nanoparticules recouvertes de polymères hydrophiles tels que le poly(éthylène glycol) (PEG) et les nanoparticules « peggyées »

- Les vecteurs de troisième génération, en cours de développement, associant un noyau biodégradable et une enveloppe de polymère (PEG) à un ligand de reconnaissance membranaire.

Il s'agit très généralement de systèmes colloïdaux où l'on peut distinguer trois classes :

- ✓ les nanoparticules biodégradables
- ✓ les nanoparticules solubles
- ✓ les nanoparticules non ou lentement solubles.

Les nanoparticules présentent des caractéristiques et des fonctionnalités multiples, présentant des différences dans les :

- ✓ Tailles : allant de quelques dizaines de nanomètres (exemple de dendrimères, nanoparticules d'or et d'oxyde de fer) à quelques centaines de nanomètres (des particules à base de lipide) à des particules de taille micronique.

- ✓ Formes : des particules sphériques classiques à discoïdales, hémisphériques, cylindriques et coniques.

- ✓ Fonctionnalisation de surface, avec une large gamme de charges électrostatiques et de conjugaisons de biomolécules.

L'utilisation de ces agents permet une administration locale ou dirigée, un effet prolongé du médicament, une délivrance facilitée dans les cellules cibles et une réduction des effets de cisaillement du flux sanguin.

Différents systèmes d'administration de médicaments à base de nanoparticules ont été et sont en cours de développement pour des applications dans le cancer, les maladies cardiovasculaires et d'autres maladies [163].

L'un des principales cibles de l'application de la nanotechnologie pour la recherche cardiovasculaire a été l'imagerie ciblée, thérapie de l'athérosclérose et de la resténose. Les agents de contraste à l'échelle nanométrique sont apparus comme des modalités à multiples facettes qui peuvent être utilisés pour identifier et caractériser les premiers stades de la maladie avant le développement de manifestations pathologiques. Les nanomatériaux générateurs de contraste pour l'imagerie cardiovasculaire comprennent des particules fluorescentes, radioactives, paramagnétiques, super paramagnétiques, électroniques et des particules diffusant la lumière [164].

2. Nanoparticules thérapeutiques et théranostiques :

Plusieurs applications de la nanotechnologie y compris les nanovecteurs pour l'administration de médicaments (**Figure 12**) et des dispositifs tels que les stents mécaniques, possédant des composants à l'échelle nanométrique, sont étudiés pour le traitement de l'athérosclérose et la resténose. Parmi les médicaments utilisés pour prévenir la resténose, citons les cytotoxiques qui inhibent la croissance des cellules musculaires lisses (par exemple, le paclitaxel, la cytarbine, les étoposides, la doxorubicine), les antagonistes des récepteurs du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (par exemple les tyrphostines), les inhibiteurs de la réponse inflammatoire / immunomodulateurs (par exemple stéroïdes, bisphosphonates, cyclosporine A) et les antibiotiques (fumagilline).

D'autres thérapies prometteuses affectent des cibles de gènes spécifiques responsables de la thrombose ou de l'hyperplasie de l'intima (par exemple la prostacycline synthase et la thymidine kinase).

Dans le cas des matériaux génétiques et autres biomolécules, leur encapsulation dans les nanoparticules assure une protection contre la dégradation enzymatique et permet des profils de libération prolongée. Les principales classes de nanovecteurs étudiées comme agents thérapeutiques et theranostiques (les particules intégrant l'imagerie diagnostique et les composants thérapeutiques) pour la resténose sont les liposomes avec différentes caractéristiques de surface, nanoparticules, micelles polymères, nano-émulsions et particules conjuguées à des molécules thérapeutiques [165][166][167][168][164].

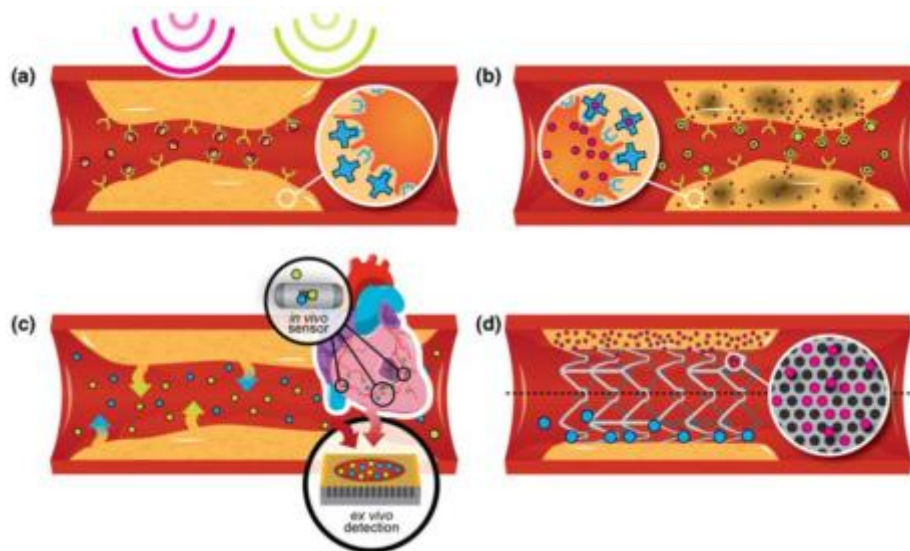


Figure 12: les approches de la nanotechnologie pour le diagnostique et le traitement des MCV : nanoparticules (a) contraste de l'image multimodale (b) traitement pour une plaque d'athérosclérose en ciblant les cellules immunes ou ligand spécifique dans l'endothélium lésé (c) sonde *in vivo* implantée dans la région péricardique ou dans l'un des principaux vaisseaux sanguins (d) stent contenant un principe actif/nanoparticules (Godin B et al [164])

D'un autre côté, des nanoparticules à base de polysaccharides ont été étudiées pour l'administration de médicaments fibrinolytiques dans le traitement de la thrombose. Les nanoparticules de poly(acide lactique-*co*-glycolique) chargées avec l'activateur tissulaire de plasminogène (t-PA) et recouvertes de chitosane ont été conçues pour la thrombolyse. Le système de délivrance pour le t-PA était basé sur l'interaction électrostatique du chitosane avec la fibrine [169]. La perméabilité et la façon de dissolution des caillots ont également été améliorées pour les nanoparticules de poly(acide lactique-*co*-acide glycolique) chargées de t-PA et recouvertes de chitosane, par rapport au t-PA en solution [170].

Donc pour préparer des nanoparticules chargées et non chargées de principe actif, la méthode la plus simple et la plus utilisée est la nanoprécipitation.

3. Principe de la nanoprécipitation :

Les nanoparticules sont utilisées pour administrer des principes actifs hydrophiles [171], hydrophobes [172], protéines [173], vaccins [157], macromolécules biologiques [174], etc. Elles peuvent être formulées pour une administration ciblée du système lymphatique [175], cerveau [176], parois des artères, poumons, foie, rate, ou faites pour la circulation systémique à long terme [177].

Les nanoparticules de PDMMLA sont formées selon la méthode décrite par Fessi et al (1989) : la nanoprécipitation [178].

Cette technique présente de nombreux avantages : c'est une technique simple, rapide et facile à réaliser. La formation des nanoparticules est instantanée et la totalité de la procédure est réalisée en une seule étape. La technique nécessite deux solvants miscibles. Idéalement à la fois le polymère et le médicament doivent se dissoudre dans le solvant, mais pas dans le second système (non-solvant). La nanoprécipitation se produit par une désolvation rapide du polymère lorsque la solution de polymère est ajoutée au non-solvant. En effet, dès que le solvant contenant le polymère diffuse dans le milieu de dispersion, le polymère se précipite, impliquant un piégeage immédiat de médicament. La formation rapide des nanoparticules est régie par l'effet de Marangoni [178], du à une turbulence qui a lieu à l'interface du solvant et du non solvant et résulte des phénomènes complexes et cumulés tels que le débit, la diffusion et les variations de la tension de surface [179].

La nanoprécipitation permet la production de petites nanoparticules (100-300 nm) avec une distribution monomodale étroite, et une large gamme de polymères préformés. Cette méthode ne nécessite pas de cisaillement / vitesses d'agitation prolongée, sonication ou des températures très élevées, est caractérisée par l'absence des interfaces huileuses aqueuses, et toutes conditions qui pourraient endommager la structure d'une protéine. En outre, les agents tensioactifs ne sont pas toujours nécessaires [180].

Compte tenu des exigences de base applicables pour l'administration intravasculaire, La nanoprécipitation d'abord décrite par Fessi et al, présente deux avantages:

1. Réduction de l'utilisation des composants potentiellement toxiques (y compris les solvants chlorés et les tensioactifs)
2. Production des nanoparticules à une taille définie ayant une distribution réduite sans avoir recours à une source d'énergie externe.

La principale limite de cette méthode est liée aux propriétés de solubilité des médicaments nécessaires pour une encapsulation efficace. Par exemple, la technique de nanoprécipitation est peu efficace pour le piégeage des molécules solubles dans l'eau, et par conséquent la plupart des études d'incorporation de molécules ont porté essentiellement sur des composés amphiphiles peu solubles dans l'eau et possédant une solubilité élevée dans les solvants organiques miscibles avec l'eau [181].

Pour les principes actifs hydrophiles plusieurs autres méthodes ont été utilisées pour leur encapsulation. Parmi ces méthodes on peut citer la technique d'émulsification [182], la technique d'évaporation du solvant [183], la technique de double émulsions sans solvant organique [171] et les liposomes [184].

4. Caractéristiques et avantages des nanoparticules :

La capacité théorique de construire des choses avec une précision à l'échelle de l'atome a été initialement envisagée par le physicien Richard Feynman le lauréat du Prix Nobel dans sa célèbre conférence de nanotechnologie à 1959 qui a déclaré que "Il y a beaucoup de place au fond" [185]. Les nanoparticules, dont la taille varie de 1 à 100 nm, sont des matériaux multifonctionnels attrayants en raison de leurs dimensions, leurs propriétés morphologiques, chimiques et physiques [186][187].

Les nanoparticules peuvent constituer un moyen pour modifier la distribution d'une substance active in vivo et d'accroître sa concentration dans le tissu cible, ce qui est susceptible d'améliorer l'efficacité et de réduire la toxicité des molécules encapsulées [188]. Pour ces applications, les nanoparticules ne doivent pas seulement être composées d'un polymère biodégradable et biocompatible, mais aussi avoir une forme et une taille bien déterminées, en particulier pour l'administration intraveineuse [188]. En effet le diamètre des transporteurs de principe actif est un paramètre crucial dans leur biodistribution et dans la détermination de l'étendue et de la vitesse à laquelle ces nanoparticules sont éliminées de la circulation. La taille des particules affecte également la concentration et la libération de la drogue [188].

Dans ce contexte, le concept de nanoparticules polymères injectables et dégradables a été particulièrement développé au cours de la dernière décennie en raison des nombreux avantages potentiels tels que :

- la protection contre la dégradation des principes actifs instables ;
- la réduction des effets toxiques de certains médicaments hautement actifs ;
- l'obtention d'un profil pharmacocinétique plus favorable ;
- l'amélioration du confort du patient par la diminution du nombre d'injections ;
- dans certaines conditions le ciblage de l'action thérapeutique vers des tissus ou des cellules spécifiques [189].

Ce concept devrait permettre non seulement de limiter les doses de médicaments administrés, mais aussi la distribution non spécifique de ces derniers pour les cibler dans un site déterminé (cellules, tissus, organes). Par conséquent plusieurs types de systèmes d'administration de médicaments [190][191] et de nombreux protocoles ont été élaborés pour la synthèse des nanoparticules basées sur le type de médicament utilisé et la voie de libération désirée. Une fois un protocole choisi, les paramètres doivent être adaptés afin de créer les meilleures caractéristiques possibles pour les nanoparticules. Quatre caractéristiques des nanoparticules sont très importantes à ce niveau : la taille, l'efficacité d'encapsulation, le potentiel zêta (charge de surface), et les caractéristiques de libération [192][193][194][195].

5. la libération contrôlée de principe actif :

L'incorporation de l'agent thérapeutique dans un polymère biodégradable est une méthode prometteuse pour parvenir à la libération contrôlée des principes actifs. Ce polymère va assurer la libération continue du principe actif au fur et à mesure qu'il se dégrade [196].

Donc les copolymères peuvent agir comme des systèmes efficaces pour la libération des principes actifs hydrophobes et hydrophiles. Les nanoparticules de copolymères amphiphiles peuvent encapsuler des principes hydrophobes dans leurs noyaux intérieurs alors qu'elle expose sa couche hydrophile à l'environnement extérieur [197] qui est le cas de notre copolymère amphiphile : le PDMMLA.

En effet, l'administration des médicaments et la conception de nanosystèmes qui sont en mesure de libérer les principes actifs au bon endroit, au bon moment et au bon dosage, constituent aujourd'hui une des zones les plus attractives de la recherche [2], par conséquent les outils pour former un conjugué polymère-médicament visant ces applications sont bien étudiés par les spécialistes de polymères artificiels [198] C'est pourquoi le domaine de nanotechnologie se concentre sur la formulation d'agents thérapeutiques dans des nanocomposites biocompatibles telles que les : nanoparticules, nanocapsules, systèmes micellaires, et éléments combinés [199].

La possibilité de la libération contrôlée au niveau de sites spécifiques dans un objectif d'optimisation de la pharmacothérapie a donné une nouvelle impulsion à un progrès significatif dans l'ingénierie pharmaceutique. Ceci a conduit à l'élaboration de ces nouvelles formes pharmaceutiques : les nanoparticules [195], capables de vectoriser une large gamme de principes actifs dans les différentes parties de l'organisme pendant des périodes de temps prolongées. Les nanoparticules ont un avantage supplémentaire par rapport aux

microparticules, qui possèdent des dimensions plus importantes, parce qu'elles sont mieux adaptées à l'administration intraveineuse : les plus petits capillaires dans l'organisme humain sont de l'ordre de 5-6 μm de diamètre, et donc la taille des particules réparties dans la circulation sanguine doit être nettement inférieure à 5 μm [200]. En outre, grâce à leurs petites dimensions, ces dernières peuvent diffuser dans les tissus à travers la paroi des capillaires, traversant la fenestration présente dans la muqueuse épithéliale (par exemple, le foie) et sont généralement reprises efficacement par les cellules. En outre grâce aux caractéristiques ajustables de polymère, la libération d'un agent thérapeutique à partir des nanoparticules dans le tissu cible ainsi que sa durée peut être contrôlée pour une efficacité thérapeutique optimale [201].

Enfin, il est aussi à noter que la libération des principes actifs dépend en grande partie des différents profils de dégradation des copolymères [202].

Dans ce travail, nous avons synthétisé et caractérisé des polyesters fonctionnels biodégradables appartenant à la famille des poly(acide (*R,S*)-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA). Celui-ci et ses dérivés amphiphiles peuvent être considérés comme des polymères prometteurs qui peuvent servir de matrice pour la warfarine, en tant que molécule hydrophobe

Chapitre II

Partie expérimentale

I. Matériels

Tous les solvants et les réactifs pour la synthèse de copolymères de PDMMLA ainsi que les réactifs pour préparer le tampon phosphate et le tampon de la thrombine sont fournis par Carlo Erba (France) et Sigma Aldrich (France). Le substrat chromogène de la thrombine (S2238) est fourni par Chromogenix (France). La thrombine et l'argatroban sont fournis par Sigma Aldrich (France).

Le tampon phosphate (C=0,01 M) de la phase mobile d'HPLC est préparé en mélangeant 1,42 g de sodium phosphate dibasique (Na_2HPO_4) avec 1,2 g de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4). Ainsi, une solution du tampon thrombine est préparée en mélangeant le trishydroxyméthylaminométhane hydrochloride: Tris HCl (C= 0,01M) avec l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) (C=0,01M), le chlorure de sodium NaCl (C=0,1M), et le polyéthylène glycol PEG (0,1% w/v), pH=7,4.

II. Méthodes :

II.1-Caractérisations structurales des copolymères :

II.1.1. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) :

Les spectres FTIR sont enregistrés grâce au spectromètre AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicoleten utilisant Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Les résultats sont affichés sous forme de bandes d'adsorption en cm^{-1} . Grâce à cette technique nous avons pu suivre la transformation des monoesters en lactones et des lactones en copolymères.

II.1.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

Les spectres RMN¹H et ¹³C sont enregistrés dans un spectromètre BRUKER AM-400 MHz avec le CD_3COCD_3 comme solvant et avec les signaux de solvant résiduels comme standard interne. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) et les constantes de couplage en Hz.

II.1.3. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC) :

Les masses moléculaires moyennes des copolymères sont déterminées grâce à l'association de la chromatographie d'exclusion stérique à haute performance (HPSEC) et le détecteur de la diffusion laser multi-angles (MALLS) à une température ambiante, un viscosimètre et un détecteur à indice de réfraction différentiel (dRI). Le solvant utilisé pour dissoudre les polymères est le tétrahydrofurane (THF). Ce dernier est filtré à travers un filtre de 0,1 μm (Millipore, Billerica, USA), dégazé (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan) et élué avec un débit de 1 mL/min (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). 100 μL d'une solution de 20 mg/mL de l'échantillon à tester est préalablement filtré et 0,2 μL est injecté grâce à un injecteur automatique (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). La colonne de séparation est constituée de gel de divinylbenzène-polystyrène. Le photomètre MALLS, un mini Dawn TREOS de Wyatt Technology Inc (Santa Barbara, CA, USA) est fourni avec la silice et le laser Ga-As ($\lambda = 665,8 \text{ nm}$). La totalité des données collectionnées par le détecteur de l'index réfractif différentiel (dRI) et la diffusion de la lumière (LS) sont analysées grâce au logiciel Astra v6.0.6. Les masses moléculaires sont données avec la méthode de Zimm d'ordre 1. La concentration de chaque fraction éluee est déterminée avec le dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japon) selon les valeurs mesurées de dn/dc (0,05 mL/g) [32].

II.1.4. Mesure de la température de la transition vitreuse (T_g):

Toutes les températures de transition vitreuse (T_g) des différents copolymères sont obtenues grâce à la Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC : Differential Scanning Calorimetry). La DSC est mesurée dans un analyseur SDT Q600 (TA instrument, Guyancourt, France). C'est un paramètre intrinsèque crucial qui influence les applications potentielles et les propriétés des polymères. En état de transition vitreuse, les propriétés physiques comme la densité, le volume et l'échauffement spécifique en plus des propriétés mécaniques comme la déformation des polymères vont changer. Deux facteurs principaux vont influencer directement le polymère une fois refroidi et revenu à son état vitreux : le premier est la mobilité des chaînes et le deuxième est le volume libre et ainsi plusieurs propriétés vont être affectées après cette transformation.

En démarrant une analyse, les copolymères sont refroidis à -60°C puis chauffés de -60°C à 200°C avec une vitesse de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. L'analyse est répétée une fois. La T_g est déterminée à partir du point d'inclinaison de la courbe du deuxième chauffage.

II.2- Caractérisations des nanoparticules :

1. Etude morphologique des nanoparticules par Microscopie Electronique à Transmission (MET) :

Après la formation des nanoparticules par la technique de la nanoprécipitation, la morphologie des nanoparticules a été étudiée au moyen de la MET. Les analyses par MET ont été faites par le JEOL-2010 microscope électronique avec une tension de 200 kV. Ce dernier est un microscope électronique à transmission à haute résolution qui peut être fonctionnel par une tension d'accélération entre 80 et 200 kV. Le JEM-2010 est configuré avec une haute luminosité LaB6 source de diffraction électronique de nano faisceau convergent. L'instrument est configuré avec plusieurs accessoires, y compris un Gatan Orius SC200 caméra digitale à une haute vitesse et un Oxford énergie dispersive spectromètre/4pi work station. Ensemble, ces systèmes permettent des études microstructurales et compositionnelles très avancées d'une large variété des matériaux organiques et inorganiques.

Une goutte de chaque nano suspension est prélevée et déposée sur une grille en carbone. Cette dernière est séchée à température ambiante.

2. Evaluation de la taille des nanoparticules par Zetasizer NanoZS Diffusion Dynamique de la Lumière :

La taille des nanoparticules est déterminée par la technique de la diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering). Cette technique nous a permis de déterminer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules dans une nanosuspension. La Diffusion Dynamique de la Lumière diffuse dans un angle de 90 degrés utilisé pour mesurer la taille de la particule. Cette technique mesure la distribution des particules soumises au mouvement Brownien et calcule la distribution de la taille de la particule en utilisant la relation généralisée de Stokes-Einstein ayant une équation générale : $D = \mu K_B T$ avec :

D : constante de diffusion

K_B : constante de Boltzmann

μ : mobilité ou rapport de la vitesse de mouvement finale de la particule à une force appliquée

T : température absolue

Deux formes importantes et fréquemment utilisées de la relation sont :

$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta r}$: «Equation de Stokes-Einstein», pour la diffusion de particules sphériques à travers un liquide à faible nombre de Reynolds.

$D = \frac{\mu_q K_B T}{q}$: «Equation de mobilité électrique», pour la diffusion de particules chargées avec :

q : charge électrique de la particule

μ_q : mobilité électrique de la particule chargée

η : viscosité du milieu

r : rayon de la particule sphérique

Chaque analyse est répétée trois fois dans une solution de NaCl (0,001M) et à température ambiante.

3. Evaluation de la charge de la surface des nanoparticules : mesure du Potentiel Zêta par Zetasizer NanoZS (DLS) :

La charge de surface des nanoparticules est déterminée en mesurant le potentiel zêta grâce à la diffusion dynamique de la lumière aussi dans une solution d'NaCl (C= 1mM).

L'Electrophorèse Laser Doppler est utilisée pour mesurer le potentiel zêta. Un champ électrique est appliqué à la suspension de molécules, lesquelles vont donc bouger à une vitesse relative à leur potentiel zêta. Cette vitesse est mesurée grâce à une méthode nommée: laser interferometry patented M3-PALS (Phase Analysis Light Scattering). Ce dernier permet le calcul de la mobilité électrophorétique et donc le potentiel zêta pour une mesure précise d'une large gamme d'échantillons et de milieux de dispersion y compris des dispersants non aqueux et à fortes concentrations salines. Chaque analyse est répétée trois fois.

4. Lavage des nanoparticules par ultracentrifugation:

Les suspensions nanoparticulaires ont été lavées 2 fois avec 8 mL d'une solution d'NaCl afin d'éliminer toute la warfarine liée à la surface des nanoparticules et une fois avec l'eau ultrapure, avec l'ultracentrifugeuse à 45000 t/min pendant 30 min. Le surnagent est récupéré à chaque fois afin de calculer le pourcentage d'encapsulation et le culot est récupéré pour la libération contrôlée de la warfarine.

5. Optimisation des conditions d'élution du principe actif encapsulé : la warfarine et de standard utilisé : la phénylbutazone :

Cinq dilutions de la warfarine et de la solution standard utilisée (phénylbutazone), ont été analysées par RP-HPLC pour déterminer:

1. Le pH de la phase mobile.
2. La proportion de la phase mobile en acétonitrile (ACN) et en tampon phosphate.
3. Le débit d'élution optimal de la molécule.
4. Le temps de rétention de dérivé coumarinique.

Détermination de pH de la phase mobile.

Quatre pH (pH=6, pH=6,5, pH=7 et pH=7,5) ont été testés afin de déterminer la meilleure séparation et le meilleur temps d'élution des principes actifs.

Quatre solutions de tampon phosphate (C = 0,01 M) ont été préparées. Pour chaque solution le pH à tester a été ajusté. Les solutions sont filtrées et trois échantillons de chaque solution ont été prélevés, filtrés et testés par RP-HPLC.

Détermination de la proportion de la phase mobile en ACN et en tampon phosphate:

Différentes proportions d'ACN/tampon phosphate (50%/50%, 60%/40%, et 70%/30%) de la phase mobile ont été testées afin de déterminer le bon pourcentage qui va donner la meilleure séparation et le temps d'élution le plus court. Dans cet objectif, une solution d'acétonitrile et une solution du tampon phosphate (C = 0,01M) sont filtrées. A partir de ces deux solutions, trois solvants pour l'HPLC ont été préparés. Les solvants sont utilisés pour déterminer le temps d'élution de la warfarine et de phénylbutazone

Détermination de débit optimal pour l'analyse de la warfarine :

Deux débits ont été testés pour déterminer le meilleur temps d'élution de la warfarine: 0,5mL/min et 1mL/min.

Toutefois avec le débit de 1 mL/min, la pression a considérablement augmenté pour atteindre 200 bars, et par la suite notre choix s'est porté sur le débit de 0,5 min/mL pour éviter la montée excessive de la pression à l'intérieur de la colonne.

Détermination de la longueur d'onde de la warfarine et de phénylbutazone:

La détermination de la longueur d'onde d'absorption de la warfarine et de la phénylbutazone a été effectuée à partir d'une solution mère de concentration égale à 1 mg/mL pour la warfarine et 0,1 mg/mL pour la phénylbutazone. A partir de ces solutions mères, des dilutions respectives de 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} dans un mélange de tampon phosphate et d'acétonitrile ont été effectuées, contre un blanc constitué du mélange des deux solvants.

La longueur d'onde est déterminée à partir des courbes données par la spectrophotométrie (**Figures 13 et 14**), donc selon les résultats obtenus, 280 nm est choisie comme longueur d'onde intermédiaire entre la warfarine et la phénylbutazone.

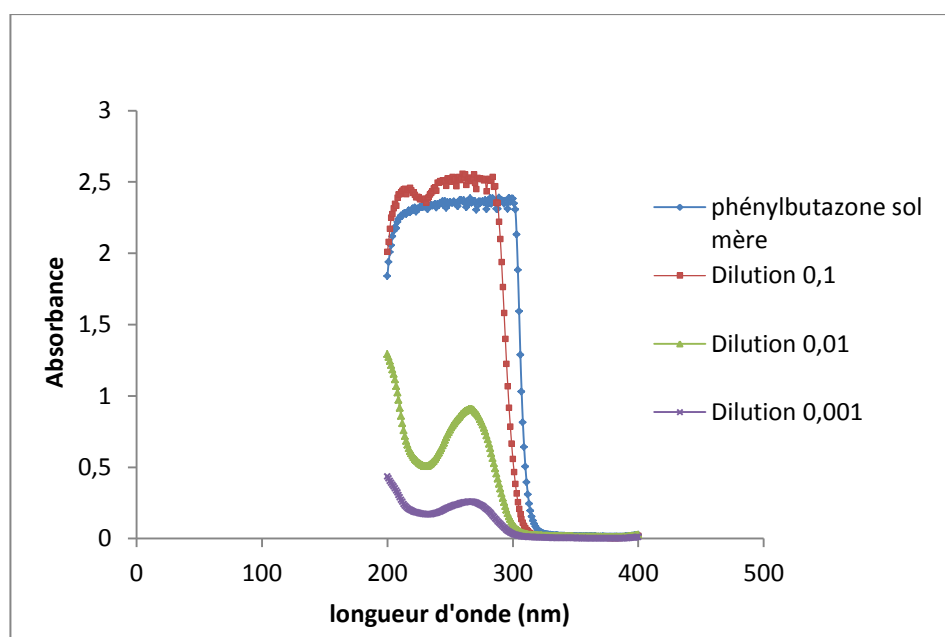


Figure 13 : Spectre UV-Visible de la longueur d'onde d'absorbance de standard utilisé : phénylbutazone

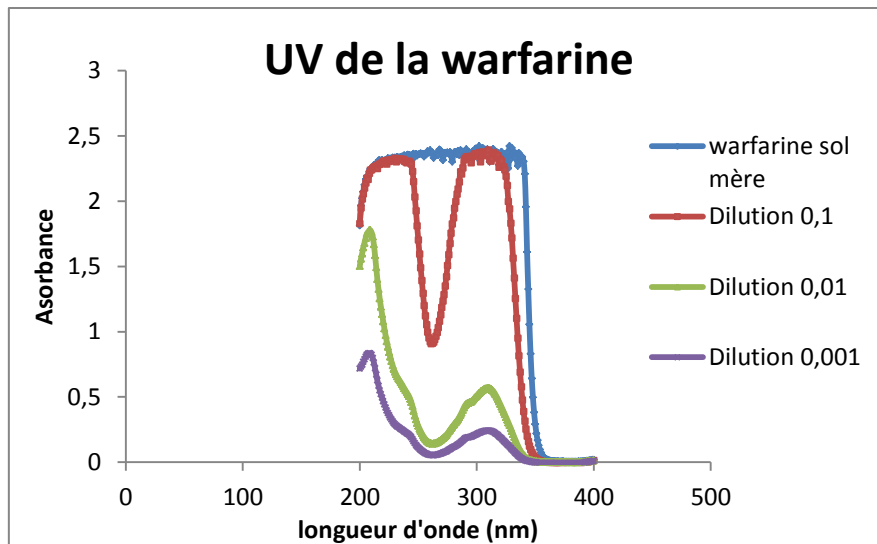


Figure 14 : UV-Visible de la longueur d'onde d'absorbance de la warfarine

Donc les conditions de dosage de la warfarine ont été fixées :

-pH du tampon phosphate = 7

- Phase mobile constituée de 60% tampon phosphate et 40% acétonitrile avec un débit de 0,5 mL/min

- Détection : absorbance de la warfarine et de la phénylbutazone à 280 nm

Ces résultats ont donné les temps les plus appropriés pour l'élution de la warfarine et de la phénylbutazone (5 min pour la phénylbutazone et 7 min pour la warfarine), et une bonne séparation entre les pics de ces deux molécules (**Figure 15**).

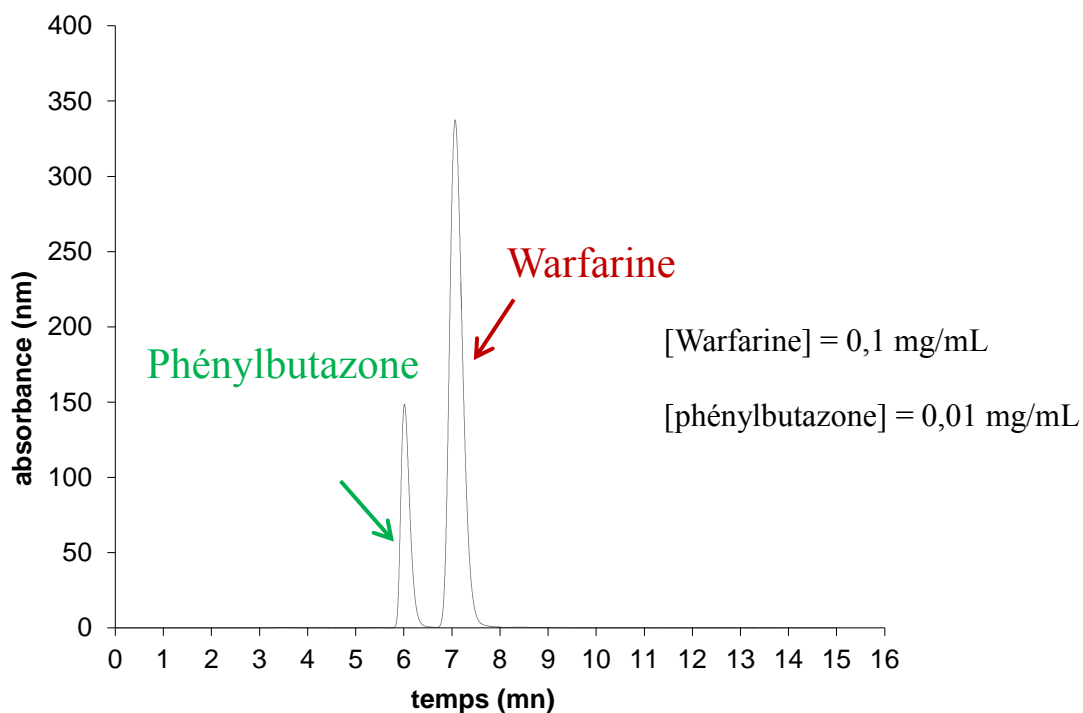


Figure 15 : Chromatogramme de la warfarine et de la phénylbutazone

Par conséquent, ces résultats d'optimisation de conditions d'éluion de la warfarine confirment éventuellement en grande partie les résultats obtenus par Chua et al.[99]

6. Libération contrôlée de la warfarine :

Le profil de la libération de la warfarine est un caractère très important pour évaluer le potentiel des nanoparticules dérivées du PDMMLA à assurer une libération et une action prolongée de la warfarine.

La libération de la warfarine est suivie par la Chromatographie à Haute Performance à Phase Inverse (RP-HPLC). Cette technique est constituée d'un système Waters 2695 HPLC (Milford, MA, USA) intégrée à une colonne, un auto-échantillonneur et une pompe. Le détecteur est Waters 2996 PDA (Milford, MA, USA). Empower Pro®5.0 contrôle l'équipement ainsi que l'intégration des pics dans le chromatogramme. La colonne analytique est une Purospher® STAR (250 × 4.6 mm i.d, 5 µm) endcapped RP-18 column (Merck, Darmstadt, Germany). L'acétonitrile (ACN) est un solvant d'HPLC. L'eau déionisée est purifiée en utilisant le Millipore Milli-Q®Integral System (Molsheim, France).

Les études de la libération *in vitro* de la warfarine nécessitent une quantification parfois de très faibles quantités. La méthode la plus sensible utilisée est la RP-HPLC en mode isocratique dont les propriétés sont mentionnées ci-après :

- Phase stationnaire : Hibar® RT 250-4,6 Purospher® STAR RP-18 (5 µm) maintenue à température ambiante.
- Phase mobile 60% du tampon phosphate + 40% d'acétonitrile avec un débit de 0,5 mL/min
- Volume injecté : 100 µL
- Détection : absorbance de la warfarine + phénylbutazone à 280 nm.

La gamme d'étalonnage de la warfarine a été réalisée à partir d'une solution mère avec une concentration $C = 1 \text{ mg/mL}$.

II.3- Caractérisation du dérivé coumarinique : le 2,5-dichlorophenyl 6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (DCBC):

1. Détermination de l'absorbance de dérivé coumarinique : (DCBC):

Pour déterminer la longueur d'onde de dérivé coumarinique par une spectrophotométrie, une solution mère avec une concentration de 10 mg/ml est préparée, à partir de cette solution, cinq dilutions qui correspondent aux solutions filles ont été préparées pour avoir des différentes concentrations: 0,1, 0, 2, 0, 04, 0,02 et 0,01 mg/ml.

2. Evaluation de l'activité anticoagulante de DCBC :

Afin de pouvoir effectuer les tests coagulométriques et comparer l'activité antithrombique directe de DCBC et de l'argatroban, deux solutions mères de l'argatroban (1200 nM) et de DCBC (600 nM) ont été préparées. A partir de ces dernières, nous avons effectué deux dilutions dans un plasma pauvre en plaquette (PPP) fraîchement recueilli pour obtenir les différentes concentrations finales souhaitées : 80, 160, 240, 320, et 400 nM pour l'argatroban et 40, 80, 120, 160 et 200 nM pour le DCBC.

Le PPP est obtenu à partir du sang fraîchement prélevé après sa centrifugation pendant 15 min à 2000 t/min. Le surnageant obtenu est le PPP qui sera décanté pour pouvoir effectuer les différentes analyses.

Pour réduire l'effet de DMSO sur les différents tests coagulométriques avec le DCBC et l'argatroban, nous avons choisi de préparer des solutions mères ayant des concentrations multipliées par trois par rapport aux concentrations nécessaires pour effectuer les tests. Ces concentrations seront diluées deux fois successives dans le PPP.

Généralement les médicaments anticoagulants ont pour effet l'inhibition de la formation de caillots sanguins (thrombus) dans les veines, les artères ou le cœur. Leur action consiste en un «ralentissement» de la coagulation et donc un allongement du temps de coagulation.

L'effet anticoagulant des deux principes actifs est ici mesuré au moyen de tests coagulométriques : le temps de Quick(TQ), le temps de céphaline activé (TCA) et le temps de thrombine (TT) :

- Le temps de Quick (TQ) permet de mesurer la vitesse de coagulation du sang dans certaines conditions. C'est l'un des tests de laboratoire les plus réalisés : il permet d'évaluer plus précisément l'efficacité de la coagulation faisant intervenir plusieurs facteurs (facteurs VII, V, X et prothrombine). Il est surtout utilisé pour le suivi des personnes sous traitement anticoagulant oral (antivitamines K).

- Le temps de céphaline activé (TCA) a pour but la mesure du temps de coagulation d'un plasma sanguin recalcifié en présence de céphaline (substitut plaquettaire) et d'un activateur particulière (silice, kaolin, acide ellagique...). Il explore la voie intrinsèque de la coagulation (facteur VIII, facteur IX, facteur XI, facteur XII), la prékallicroïne, le kininogène de haut poids moléculaire, et dans une moindre mesure le fibrinogène, facteur II, facteur V et facteur X.

- Le temps de thrombine (TT) est le temps de coagulation d'un plasma sanguin citraté lors de l'ajout d'une quantité connue de thrombine et de calcium. Cet examen teste la transformation du fibrinogène en fibrine; il est utile en cas de syndrome hémorragique ou de traitement par l'héparine ou par un thrombolytique.

Pour les trois tests coagulométriques, deux témoins avec et sans DMSO sont préparés en ajoutant respectivement 50 μL de PPP (sans DCBC) contenant du DMSO (pour déterminer l'effet du solvant) et 50 μL de PPP seul (témoin négatif).

Temps de Quick (TQ) :

- 50 μL de plasma pauvre en plaquette (PPP) contenant ou non le dérivé coumarinique ou l'argatroban (ou DMSO).
- Incubation 60 secondes
- 100 μL de Néoplastine

Temps de céphaline activé (TCA):

- 50 μL de PPP contenant ou non le dérivé coumarinique ou l'argatroban
- 50 μL céphaline
- Incubation 180 secondes
- 50 μL CaCl_2

Temps de Thrombine(TT):

- 100 μL PPP contenant le dérivé coumarinique ou l'argatroban
- Incubation 60 secondes
- 100 μL de thrombine $C=46,5$ nM.

Pour déterminer le Temps de Thrombine, une optimisation a été effectuée au préalable pour déterminer la concentration de la thrombine appropriée pour l'obtention d'un temps de thrombine normal (18-25 secondes).

III. Synthèse et caractérisation des dérivés du PDMMLA

I. Synthèse des β -lactones α,α,β -trisubstituées

La synthèse des β -lactones α,α,β -trisubstituées est réalisée en cinq étapes à partir du 2-oxalpropionate de diéthyle commercial. La première étape est une méthylation en α de la fonction cétone pour former le 2-méthyl-2-oxalpropionate de diéthyle. Ensuite, une réaction

de réduction de la fonction cétone va conduire à la formation du 3,3-diméthylmalate de diéthyle. Ce produit va à son tour se transformer en acide 3,3-diméthylmalique après une réaction d'hydrolyse basique. L'acide formé génère le monoester hexylique et le monoester benzylique après une monoestérification. A partir de ces derniers, les deux lactones seront formées selon la réaction de Mitsunobu [203].

1.Méthylation:

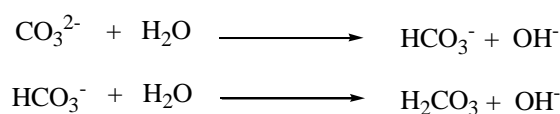
La méthylation est la première étape de synthèse, à partir du 2-oxalpropionate de diéthyle racémique commercial (49,2 g, 243 mM, 1 éq) à température ambiante [27]. Son principe consiste à déprotoner en α de la fonction cétone grâce au tertibutylate de potassium (31g, 267 mM, 1,1 éq) comme base dans du toluène anhydre (1,5 l) et en présence d'éther couronne 18-crown-6 (5,1 g, 19,4 mM, 0,08 éq) comme agent de complexation des cations potassium. Un carbanion intermédiaire très réactif se formera et réagira avec l'iodure de méthyle (45 mL, 0,72 M, 3 éq) pour former le 2-méthyl-2-oxalpropionate de diéthyle (**1**).

2. Réduction

C'est la deuxième étape de synthèse. Elle consiste à réduire d'une façon sélective la fonction cétone du 2-méthyl-2-oxalpropionate de diéthyle par le borohydrure de sodium (NaBH_4) (3,87g, 102,45 mM, 0,5 éq) dans l'éthanol absolu (280 mL). Cette réaction démarre par une attaque du carbonyle par l'hydrure pour produire un alcoolate intermédiaire qui arrache le proton de l'éthanol pour obtenir une fonction alcool [28], et par la suite le 3,3-diméthylmalate de diéthyle (**2**) est obtenu.

3.Hydrolyse basique

La troisième étape de synthèse aura comme but la transformation des fonctions esters en fonctions acide carboxylique impliquant une solution aqueuse de carbonate de potassium (K_2CO_3) (97,8 g, 0,708 M, 6 éq) au reflux [29]. Ce dernier va réagir avec l'eau (550 mL) pour produire deux ions hydroxydes selon les réactions suivantes :



Ces ions hydroxydes attaquent les deux fonctions ester pour obtenir l'acide 3,3-diméthylmalique (**3**).

4. Monoestérification:

En travaillant sur 10 g de diacide, la monoestérification consiste à ajouter l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) (28,8 mL, 203,55 mM, 3,3 éq) sous azote et à 0°C. Le mélange réactionnel est mis sous agitation à 0°C environ 30 minutes puis 2h30 min à température ambiante.

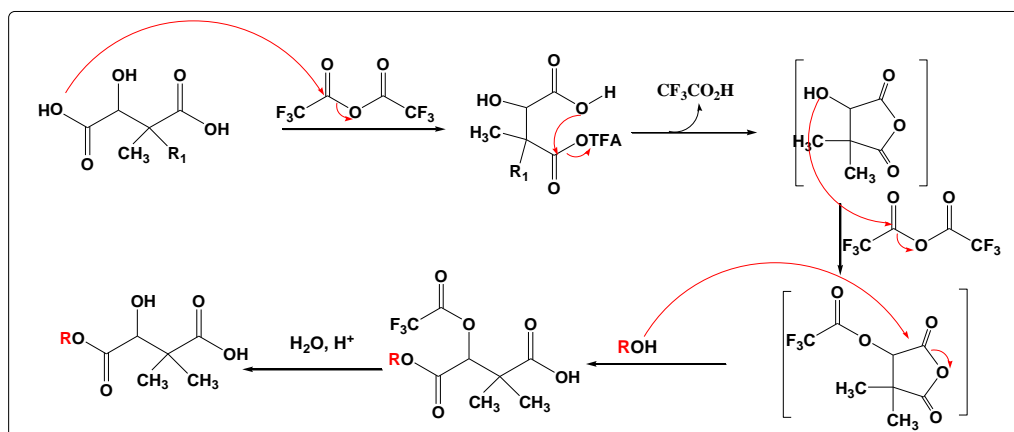


Schéma 5: Mécanisme de la monoestérification

L'ajout de l'alcool benzylique ou hexylique est effectué après l'évaporation du TFAA en excès et du TFA libéré et la réaction est mise sous agitation toute une nuit (**Schéma 5**) pour former le monoester benzylique (**4**) et le monoester hexylique (**5**).

5. Lactonisation:

La lactonisation des monoesters a été effectuée en présence de la triphénylphosphine (PPh_3) et de diisopropylazodicarboxylate (DIAD) en solution dans le THF anhydre d'après la réaction de Mitsunobu [31],[32].

Le mécanisme de cette réaction se déroule en 3 étapes. Au cours de la première étape la triphénylphosphine associée avec le DIAD génèrent un zwitterion qui se protone en présence d'un monoester pour former un sel de phosphonium. Ce dernier se lie à l'oxygène de l'alcool et l'active en tant que groupement partant en formant un sel d'oxyphosphonium et l'hydrazine réduite (**Schéma 6**). De plus, une inversion de la configuration du carbone asymétrique est induite par cette réaction.

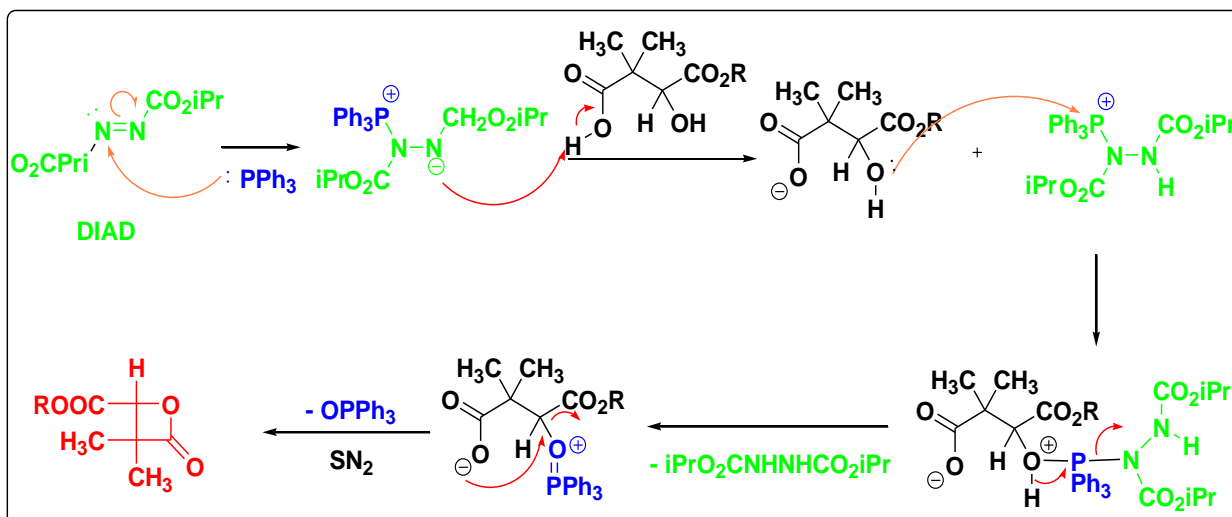


Schéma 6 : Mécanisme de formation des lactones : réaction de Mitsunobu.

La réaction a été suivie grâce à la chromatographie sur couche mince (CCM). Le produit de départ a été totalement consommé au bout de 2 heures et les deux lactones : le 4-benzyloxycarbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (**6**) et le 3,3-diméthyl-4-hexyloxycarbonyl-2-oxétanone (**7**) sont formées.

II. Polymérisation anionique des β -lactones α,α,β -trisubstituées

1. Synthèse de copolymères:

L'efficacité des systèmes d'amorçage avec des sels d'ammonium $R_4N^+ X^-$ (le benzoate de tétraéthylammonium $Et_4N^+ PhCO_2^-$) pour la polymérisation anionique par ouverture de cycle de β -lactones α,α,β -trisubstituées a été déjà démontrée par plusieurs travaux de recherche [204]. Ces systèmes conduisent à une polymérisation à caractère vivant en condition totalement anhydre. Ainsi le mécanisme proposé met en jeu une substitution nucléophile d'ordre 2 de l'anion benzoate de tétraéthylammonium sur le carbone en position β du carbonyle de la lactone, provoquant une inversion de configuration de ce dernier (**Schéma 7**). Cette attaque est favorisée par la présence du groupement ester électro-attracteur et la structure tendue du cycle à quatre chaînons.

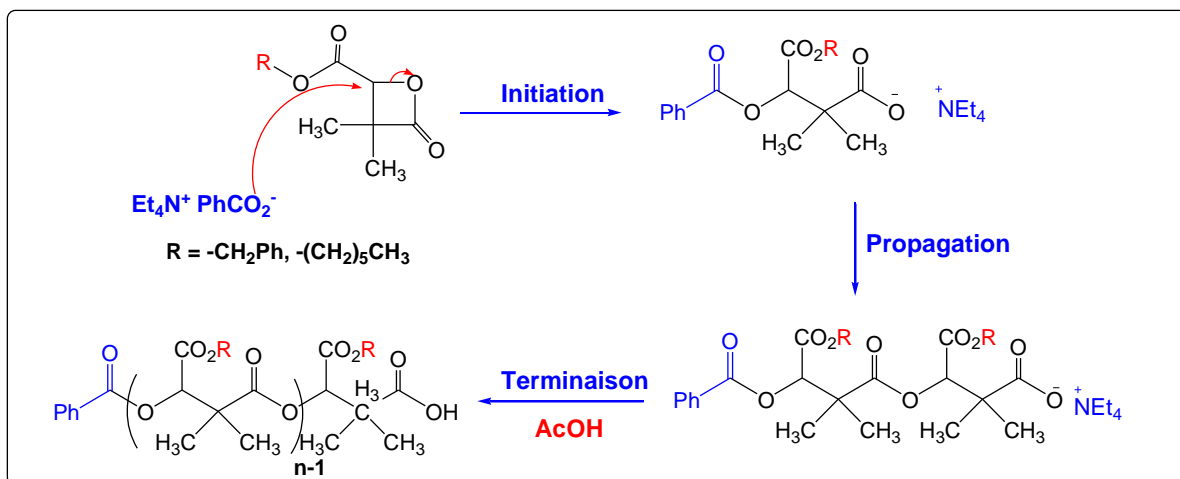


Schéma 7 : Mécanisme de la polymérisation anionique

Des espèces anioniques carboxylates sont alors générées après chaque ouverture de la lactone. La fonction carboxylate formée va permettre la croissance du polymère par un mécanisme d'ouverture de cycle de type anionique vivant favorisant la propagation de la polymérisation par attaque nucléophile des autres lactones présentes dans le milieu réactionnel [205].

Ainsi, six copolymères ont été synthétisés : trois copolymères statistiques avec un ratio amorceur / monomère = 10^{-3} et trois copolymères à blocs avec un ratio amorceur / monomère = 10^{-2} . Ces copolymères ont été préparés avec des proportions différentes en lactones benzylique et hexylique : 30/70, 50/50 et 70/30.

2. Synthèse des copolymères statistiques :

Les copolymères statistiques Poly(benzyl (*R,S*)-3,3-diméthylmalate-*co*-hexyl (*R,S*)-3,3-diméthylmalate) (PDMMLAB_n-*co*-Hex_{100-x}), ayant une structure générale présentée dans le **Schéma 8**, avec x et 100-x les taux de lactone benzylique et hexylique respectivement, ont été obtenus par copolymérisation du mélange des deux lactones **6** et **7** en présence du benzoate de tétraéthylammonium à 37°C en masse.

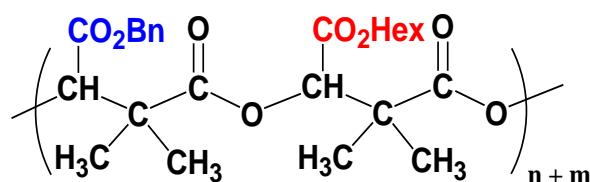


Schéma 8 : Structure générale de copolymère statistique: PDMMLAB_n.*co*.Hex

A partir des deux lactones benzylique et hexylique, trois copolymères statistiques protégés par le groupement benzylique ont été synthétisés : P1, P2, et P3. Ils comportent respectivement :

P1 : 70% d'unité benzyle / 30% d'unité hexyle

P2 : 50% d'unité benzyle / 50% d'unité hexyle

P3 : 30% d'unité benzyle / 70% d'unité hexyle

Les masses théoriques et les masses expérimentales prélevées de P1, P2 et P3 sont représentées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Masses théoriques et expérimentales des lactones benzylique et hexylique pour former les trois copolymères statistiques : P1, P2 et P3.

<i>Copolymères statistiques</i>		<i>Lactone benzylique</i>	<i>Lactone hexylique</i>
P1 (70/30)	<i>M (mol/L)</i>	234,25	228,28
	<i>Masse théorique(g)</i>	0,700	0,300
	<i>Masse expérimentale(g)</i>	0,712	0,295
	<i>N (moles *10⁻³)</i>	3,03	1,298
P2 (50/50)	<i>M (mol/L)</i>	234,25	228,28
	<i>Masse théorique(g)</i>	0,500	0,500
	<i>Masse expérimentale(g)</i>	0,504	0,494
	<i>N (moles *10⁻³)</i>	2,150	2,150
P3 (30/70)	<i>M (mol/L)</i>	234,25	228,28
	<i>Masse théorique(g)</i>	0,300	0,700
	<i>Masse expérimentale(g)</i>	0,306	0,696
	<i>N (moles *10⁻³)</i>	1,3	3,03

En effet la polymérisation consiste à ajouter des volumes bien déterminés (**Tableau 2**) d'amorceur (le benzoate de tétraéthylammonium $\text{Et}_4\text{N}^+ \text{PhCO}_2^-$) dissout dans l'éthanol anhydre avec une concentration $C = 36 \text{ mg/mL}$ et sous azote dans le ballon de la réaction pour chaque polymère.

Tableau 2: Volume d'amorceur ajouté pour chaque copolymère

Copolymère	Amorceur $\text{Et}_4\text{N}^+ \text{PhCO}_2^-$ (μL)
P1	30,18
P2	30
P3	30
P4	301,7
P5	299
P6	301

La solution d'amorceur est maintenue sous agitation sous azote et sous vide jusqu'à l'évaporation totale de l'éthanol (~ 30 min). Les lactones benzylique et hexylique déjà dégazées et solubilisées dans le THF anhydre sont transvasées dans les ballons de polymérisation et sous azote. Les réactions sont agitées durant trois jours et la polymérisation est suivie par IR en suivant la disparition de la bande lactonique à 1835 cm^{-1} . Une fois terminées, les réactions sont arrêtées par l'ajout d'une goutte d'acide acétique.

3. Synthèse de copolymères à blocs :

Les copolymères à blocs : les Poly(benzyl (*R,S*)-3,3-diméthylmalate-*b*-hexyl (*R,S*)-3,3-diméthylmalate) ($\text{PDMMLABn}_x\text{-}b\text{-Hex}_{100-x}$), dont la structure générale présentée dans le **schéma 9**, ont été obtenus par polymérisation anionique par ouverture de cycle en présence du benzoate de tétraéthylammonium en deux étapes : l'ajout du deuxième monomère ne s'effectue que si la polymérisation du premier monomère est achevée.

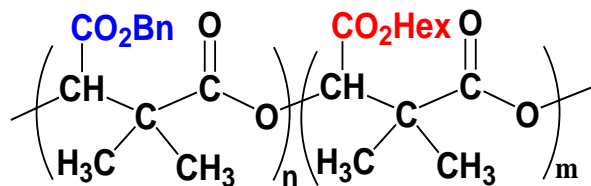


Schéma 9: Structure générale des copolymères à blocs PDMMLABn.b.Hex

A partir des deux lactones benzylique et hexylique, trois copolymères à blocs ont été synthétisés : P4, P5, et P6, ils comportent respectivement :

P4 : 70% d'unité benzyle / 30% d'unité hexyle

P5 : 50% d'unité benzyle / 50% d'unité hexyle

P6 : 30% d'unité benzyle / 70% d'unité hexyle

Les masses théoriques et expérimentales utilisées de chaque lactone pour chaque polymère P4, P5 et P6 sont résumées dans le **Tableau 3** ci-dessous.

Tableau 3 : Masses théoriques et expérimentales des lactones benzylique et hexylique pour former les trois copolymères à bloc : P4, P5, et P6.

Copolymères à blocs		Lactone benzylique	Lactone hexylique
P4 (70/30)	<i>M (mol/L)</i>	234,25	228,28
	<i>Masse théorique(g)</i>	0,700	0,300
	<i>Masse expérimentale(g)</i>	0,712	0,296
	<i>N (moles *10⁻³)</i>	3,030	1,298
P5 (50/50)	<i>M (mol/L)</i>	234,25	228,28
	<i>Masse théorique(g)</i>	0,500	0,500
	<i>Masse expérimentale(g)</i>	0,504	0,491
	<i>N (moles *10⁻³)</i>	2,150	2,150
P6 (30/70)	<i>M (mol/L)</i>	234,25	228,28
	<i>Masse théorique(g)</i>	0,300	0,700
	<i>Masse expérimentale(g)</i>	0,279	0,634
	<i>N (moles *10⁻³)</i>	1,019	2,78

Dans une première étape, nous avons préparé le (poly(*R,S*)-3,3-diméthylmalate de benzyle) par polymérisation anionique par ouverture de cycle de la lactone benzylique **6** en solution dans le THF anhydre à température ambiante en utilisant le benzoate de tétraéthylammonium comme amorceur. La masse molaire du premier bloc (prépolymère) est contrôlée par le rapport monomère/amorceur = 10². Les polymérisations sont effectuées par l'ajout des volumes bien déterminés d'amorceur Et₄N⁺ PhCO₂⁻ (**Tableau 2**) dissout dans l'éthanol anhydre avec une concentration C = 36 mg/mL et sous azote dans le ballon de polymérisation pour chaque polymère.

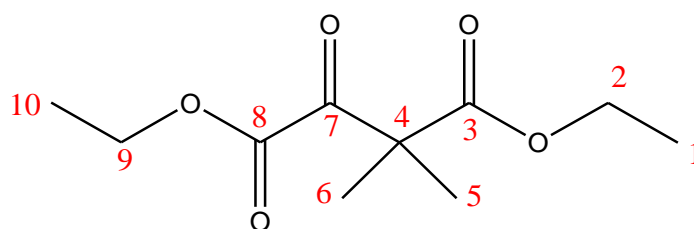
Les solutions sont maintenues sous agitation, sous azote et sous vide jusqu'à l'évaporation totale de l'éthanol (~ 30 min). Les lactones benzyliques déjà dégazées et solubilisées dans le THF anhydre sont transvasées dans les ballons de polymérisation. Les solutions sont maintenues sous agitation jusqu'à la formation du premier bloc: le poly[*R,S*]-3,3-diméthylmalate de benzyle.

Une fois le premier bloc : poly([*R,S*]-3,3-diméthylmalate de benzyle) formé, la deuxième lactone est ajoutée. Cette étape permet d'obtenir le deuxième bloc : poly((*R,S*)-3,3-diméthylmalate d'hexyle). Les extrémités carboxylates du pré-polymère permettent de poursuivre la polymérisation lorsque le deuxième monomère (lactone hexylique **7**) est additionné au milieu réactionnel formant ainsi le bloc hydrophobe. Le rapport monomère/prépolymère permet de contrôler la masse du deuxième bloc. La formation de ce dernier est suivie par FT-IR par la disparition progressive de la bande caractéristique de la lactone ($\nu_{C=O} = 1850 \text{ cm}^{-1}$) au cours de la polymérisation

Généralement les réactions durent entre 2 et 8 jours et la conversion est presque totale. Les polymérisations sont arrêtées par l'ajout d'une goutte d'acide acétique.

Etude RMN:

Au cours de la synthèse, la méthylation est confirmée par le spectre RMN ^1H qui montre un singulet à 1,39 ppm qui intègre pour six protons.

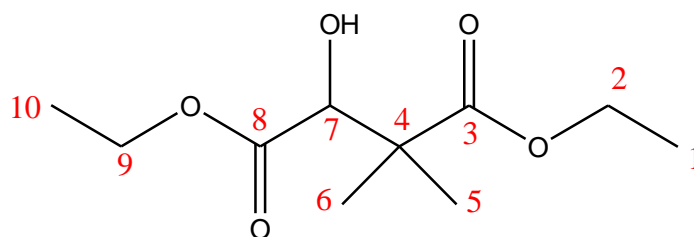


2-méthyl-2-oxal-propionate de diéthyle

RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 400 MHz) δ (ppm) : 1,23 (t, 3H, $J_{\text{H}_1-\text{H}_2}=7,1$ Hz, H_1), 1,35 (t, 3H, $J_{\text{H}_{10}-\text{H}_9} = 7,1\text{Hz}$, H_{10}), 1,43 (s, 6H, H_5 et H_6), 4,18 (q, 2H, $J_{\text{H}_2-\text{H}_1} = 7,1$, H_2), 4,32 (q, 2H, $J_{\text{H}_9-\text{H}_{10}} = 7,1$, H_9).

RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 100 MHz) δ (ppm) : 13,28 (C1), 21,23 (C10), 28,95 (C6 et C5), 52,35 (C4), 61,05 (C2), 62,15 (C9), 171,9 (C3), 172 (C8).

Pour la réduction, le spectre RMN ^1H a montré un doublet à 4,35 ppm caractéristique du CHOH , ce qui confirme la réduction de la cétone en alcool.

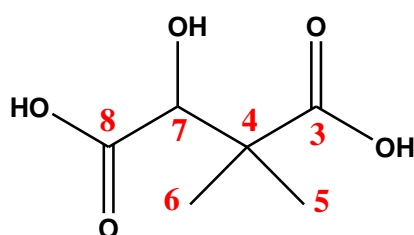


3,3-diméthylmalate de diéthyle

RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 400 MHz) δ (ppm) : 1,16 (s, 3H, H_5), 1,25 (s, 3H, H_6), 1,27 (t, 6H, $J_{\text{H}_1\text{H}_2}=7,1$ et $J_{\text{H}_{10}\text{H}-\text{H}_9} = 6,6$ Hz), 4,2 (q, 2H, $J_{\text{H}_2-\text{H}_1}=7,12$ Hz, H_2), 4,15 (d, 1H, H_2), 4,3 (q, 2H, $J_{\text{H}_9-\text{H}_{10}} = 6,6$ Hz, H_9).

RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 100 MHz) δ (ppm) : 13,50 et 13,55 (C1 ET C $_{10}$), 19,73 et 21,91 (C $_5$ et C $_6$), 46,73 (C $_4$), 60,57 (C $_2$), 61,18 (C $_9$), 75,42 (C $_7$), 172,72 (C $_3$), 175,18 (C $_8$).

Pour l'hydrolyse basique, les résultats obtenus par la RMN ^1H montrent bien la disparition complète des quadruplets et des triplets correspondant respectivement aux CH_2 et aux CH_3 de deux groupements esters éthyliques.

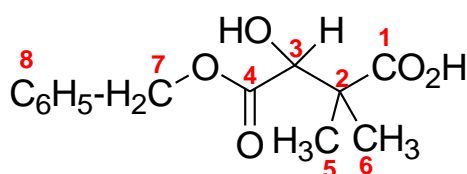


Acide 3,3-diméthylmalique

RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 400 MHz) δ (ppm) : 1,24 (s, 3H, H_5), 1,28 (s, 3H, H_6), 4,45 (s, 1H, H_7).

RMN¹³C (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ (ppm) : 20,12 et 21,64 (C₅ et C₆), 46,06 (C₄), 74,93 (C₇), 173,34 et 176,42 (C₃ et C₈).

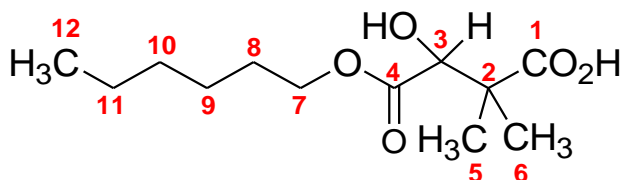
La structure du monoester benzylique est confirmée par l'analyse RMN ¹H par la présence d'un singulet à 5,18 ppm correspondant au –CH₂ benzylique et d'un multiplet à 7,39 ppm correspondant aux cinq protons aromatiques. L'analyse RMN ¹H du monoester hexylique a révélé un triplet à 0,91 ppm correspondant au –CH₃ hexylique, deux multiplets à 1,24 et 1,65 ppm correspondant aux quatre groupements CH₂ de l'hexyle et un triplet à 4,10 ppm qui correspondant au CH₂O.



Acide 3-benzyloxycarbonyl-2,2-diméthyl-3-hydroxypropanoïque

RMN¹H (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ (ppm): 5, 18 (s, H7), 7, 39 (m, 5Ph).

RMN¹³C (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ (ppm) 20,64 et 21,69 (C5 et C6), 29,55 (C2), 66,97 (C7), 75,80 (C3), 128,69, 128,85 et 128,98 (Ph), 172,82 et 176,81 (C4 et C1).

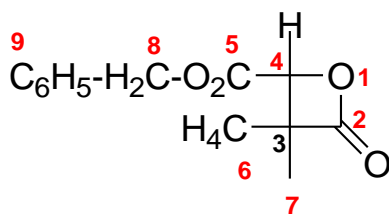


Acide 2,2-diméthyl-3-hexyloxycarbonyl-3-hydroxypropanoïque

RMN¹H (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ (ppm) : 0,91 (t, 3H, JH12-H11 = 7,0 Hz, H12), 1,24 (m, 6H, H9, H10 et H11), 1,65 (m, 2H, H8), 4,10 (t, 2H, JH7-H8 = 7,0 Hz, H7).

RMN¹³C (CD₃COCD₃, 100MHz) : δ 13,88 (C12), 20,41 et 21,70 (C5 et C6), 22,77 (C10 et C11), 25,86 (C9), 31,73 (C8), 46,44 (C2), 65,35 (C7), 75,64 (C3), 172,93 et 176,57 (C1 et C4).

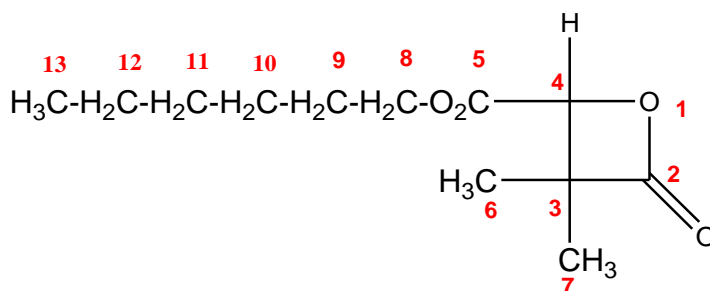
De la même façon, les structures de deux lactones pures ont été analysées par Infra-Rouge (FT-IR) et par RMN.



4-benzyloxycarbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone

RMN¹H (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ (ppm): 1, 18 (s, 3H, H6), 1, 51 (s, 3H, H7), 4, 96 (s, 1H, H4), 5.29 (s, 2H, H8), 7, 39 (m, 5H, Ph).

RMN¹³C (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ (ppm) : 17,73 et 21,84 (C6 et C7), 58,43 (C3), 67,83 (C8), 77,64 (C4), 129,41, 129,60 et 136,31 (Ph), 168,09 et 173,76 (C2 et C5).



3,3-diméthyl-4-hexyloxycarbonyl-2-oxétanone

RMN¹H (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ (ppm): 0.88 (t, 3H, H13), 1.28 (s, 3H, H6), 1, 29 (m, 6H, H10, H11 et H12), 1.41 (s, 3H, H7), 1, 68 (m, 2H, H9), 4.23 (t, 2H, H8), 4, 91 (s, 1H, H4).

RMN¹³C (CD₃COCD₃, 100 MHz) δ (ppm) : 14,34 (C13), 17,91 et 21,94 (C6 et C7), 23,25 (C11), 26,26 (C10), 32,16 (C9), 58,30 (C8), 66,37 (C3), 77,82 (C4), 168,28 et 173,92 (C2 et C5).

4. Déprotection des copolymères par hydrogénolyse catalytique :

Expérimentalement l'hydrogénolyse catalytique consiste à diluer le polymère dans l'acétone de synthèse, puis à ajouter une masse de palladium sur charbon qui correspond à 20% de la masse du polymère. Le ballon de la réaction est recouvert par une couche de papier d'aluminium afin de garantir l'obscurité. Le mélange réactionnel est mis deux ou trois fois de façon alternative sous vide et sous hydrogène (H₂) afin d'éliminer au maximum l'oxygène puis le mélange est maintenu sous hydrogène toute une nuit en prenant soin de noter le niveau

initial d'hydrogène afin de déterminer la quantité qui a été consommée au cours de la réaction.

Le **Tableau 4** ci-dessous nous indique les masses utilisées de chaque polymère ainsi que les masses de palladium.

Tableau 4 : Masses des polymères et palladium utilisées pour l'hydrogénolyse catalytique.

Copolymères	Masse des copolymères (g)	Masse de Palladium.. (g)
P1'	0,863	0,172
P2'	0,788	0,157
P3'	0,853	0,170
P4'	0,988	0,197
P5'	0,967	0,193
P6'	0,742	0,148

Traitement des copolymères déprotégés :

Une fois déprotégés, les copolymères sont filtrés pour éliminer le palladium sur charbon et évaporés pour éliminer l'acétone.

5. Précipitation des copolymères :

Les copolymères synthétisés sont solubilisés dans l'acétone et sont purifiés par précipitation dans l'éthanol. Les structures chimiques des copolymères sont vérifiées par RMN ^1H et RMN ^{13}C .

IV. Développement des nanoparticules dérivées du PDMMLA

I. Formulation et caractérisation des nanoparticules dérivées du PDMMLA:

L'objectif principal de l'étude est d'obtenir des nanoparticules à partir des copolymères statistiques et à blocs dérivés du PDMMLA. Les nanoparticules recherchées doivent :

- Etre monodisperses (avec une distribution granulométrique étroite)
- Avoir une taille proche de 100 nm,
- Avoir une charge de surface inférieure à 30mV
- Avoir des rendements importants d'encapsulation en warfarine
- Posséder un contrôle efficace de libération prolongée de la warfarine, améliorant la stabilité et minimisant les effets secondaires de cette dernière.

Après l'optimisation de la formulation de nanoparticules, la warfarine a été encapsulée, les nanoparticules sont caractérisées et une étude de libération contrôlée de la warfarine est entamée.

1-Optimisation de la formulation des nanoparticules dérivées du PDMMLA:

Les nanoparticules sont formées grâce à la technique de la nanoprécipitation (**Figure 16**).

Principe de la nanoprécipitation :

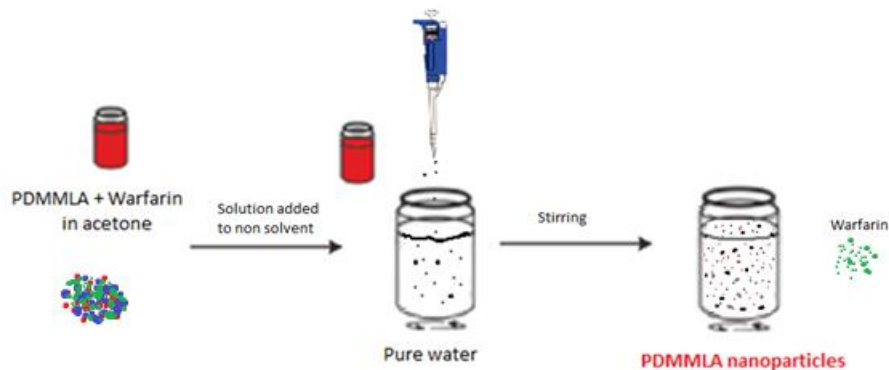


Figure 16: Principe de la nanoprécipitation

L'ensemble des optimisations a consisté à:

- Travailler avec une masse bien déterminée (100 mg) de chaque copolymère (P1', P2', P3', P4', P5' et P6') dissous dans un premier temps dans un volume minimal d'acétone (1mL pour le 100 mg)
- Ajouter 1mL d'acétone pour chaque 1 mg de copolymère dans un deuxième temps.

A chaque fois le mélange est ajouté goutte à goutte à un volume d'eau ultrapure. Les volumes d'eau testés étaient comme suit : 5 ml, 10 et finalement 20 mL.

Avec les copolymères statistiques et les copolymères à blocs (P1', P2', P3', P4', P5' et P6'), la nanoprécipitation a été réalisée suivant la première optimisation, en l'absence de la warfarine, sans aboutir à la formation des nanoparticules sphériques souhaitées. Un autre essai de nanoprécipitation a donc été effectué selon la deuxième optimisation en augmentant le volume d'acétone à 10 mL et avec un volume d'eau égal à 20 mL.

2. Optimisation des pourcentages d'encapsulation de la warfarine :

Afin de choisir les meilleurs copolymères et le pourcentage approprié de warfarine, plusieurs études ont été réalisées.

L'ultracentrifugation est une technique très efficace pour la séparation de nanoparticules, en effet elle permet la séparation de la warfarine non encapsulée et la séparation de la warfarine liée à la surface de nanoparticules.

Les nanoparticules sont séparées de la warfarine libre non encapsulée par ultracentrifugation. Cette dernière est dosée par RP-HPLC dans les conditions décrites et déterminée par rapport à une droite d'étalonnage établie avec des concentrations croissantes de warfarine en présence de phénylbutazone utilisée comme standard.

À partir de la masse de la warfarine libre non encapsulée, la masse de la warfarine encapsulée à l'intérieur des nanoparticules est déterminée de façon indirecte. L'efficacité d'encapsulation est déterminée par la formule suivante :

$$EE = \frac{\text{masse totale de la warfarine introduite} - \text{masse libre de la warfarine dans la suspension}}{\text{masse totale de la warfarine introduite}} \times 100$$

V. La libération contrôlée de la warfarine :

Le profil de la libération de la warfarine est un caractère très important pour évaluer le potentiel des nanoparticules dérivées du PDMMLA à assurer une libération et une action prolongée de la warfarine.

La libération contrôlée de la warfarine (**Figure 17**) consiste à incuber les suspensions nanoparticulaires (nanoparticules dans le tampon phosphate) dans un bain marie à 37°C et sous agitation modérée, les échantillons prélevés chaque 2 jours vont être centrifugés pendant 15 min à 5000 t/min. De chaque échantillon 1 mL de surnageant est prélevé (contenant la masse de la warfarine libérée), et 1 mL de tampon phosphate est ajouté en contre partie dans le reste des suspensions afin de garder un volume stable pour la libération du principe actif.

Les échantillons prélevés des surnageants ont été conservés à -80°C et lyophilisés avant de les analyser par RP-HPLC (sous les conditions déjà optimisées) afin de déterminer la quantité de warfarine libérée. Pour les restes des suspensions nanoparticulaires, ils sont incubés de nouveau dans le bain marie à 37°C après l'avoir bien mélangé pour continuer l'étude de la libération contrôlée dans les mêmes conditions.

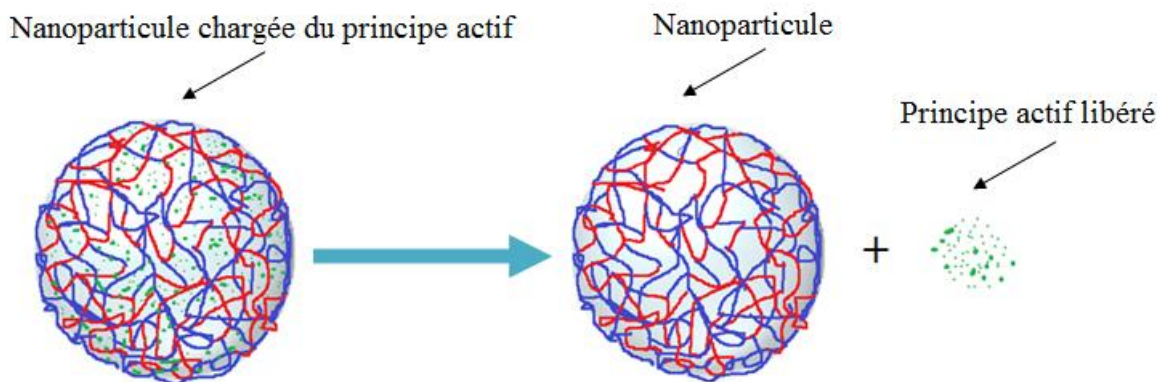


Figure 17 : Principe de la libération contrôlée

1. Dosage de la warfarine:

Une droite d'étalonnage est préparée à partir de la solution mère de la warfarine (1mg/mL). A partir de cette solution, une série de dilutions a été effectuée : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} .

A partir des résultats obtenus, une droite d'étalonnage de la warfarine est établie entre 0,1 mg/mL et 1 µg/mL avec l'équation $y=0,8488x+3,0713$ et le coefficient de corrélation $R^2 = 0,9993$ (Figure 18).

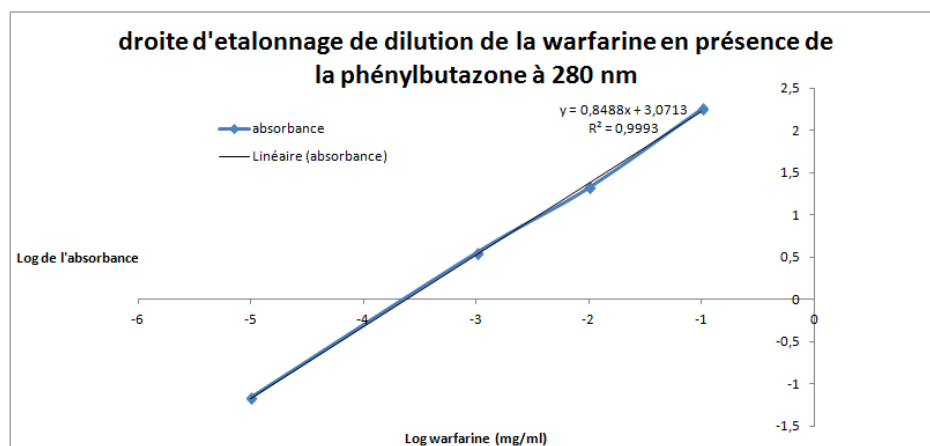


Figure 18 : Droite d'étalonnage de la warfarine en présence de standard (phénylbutazone)

La quantité de la warfarine dans les nanoparticules est déterminée par Chromatographie Liquide à Haute Performance en Phase Inverse (RP-HPLC) sur colonne C18 à température ambiante. La phase mobile utilisée est un mélange d'acétonitrile ACN et d'eau ultrapure, avec une proportion ACN/eau et un pH optimisés ainsi que le débit et la longueur d'onde de détection de la warfarine et de la phénylbutazone utilisée comme standard.

2 Evaluation de l'activité anticoagulante du 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (DCBC) par inhibition directe de la thrombine:

Le dérivé coumarinique a été synthétisé par notre collègue chimiste selon la méthode décrite dans les travaux de Pochet et al. publiés en 1996 et en 2000 (Schéma 10).

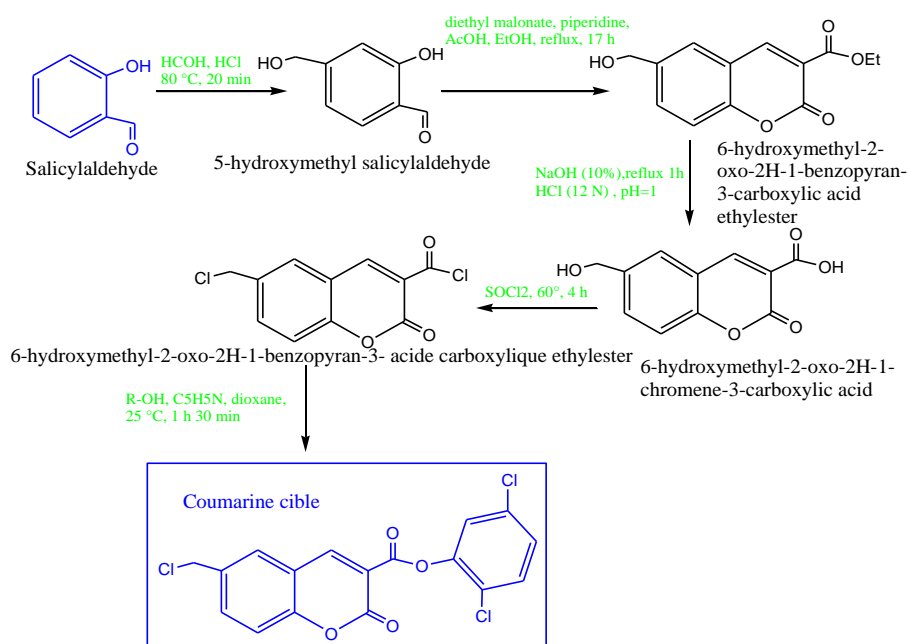


Schéma 10 : Etapes de synthèse du 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate(DCBC)

L'activité anticoagulante de DCBC est évaluée dans un premier temps par la mesure de son activité antithrombique en système purifié puis au moyen des tests coagulométriques globaux, le temps de Quick (TQ), le temps de céphaline activé (TCA) et le temps de thrombine (TT) en comparaison avec l'argatroban, pris comme référence.

Donc pour évaluer l'activité antithrombique (anti FIIa) de DCBC dans un système purifié, une droite d'étalonnage de la THR est réalisée à partir d'une gamme de concentrations de 23,2-18,56- 13,92- 9,28- 4,64 nM (**Figure 19**) dans une solution du tampon THR contenant : 0,01 M tris HCl, 0,01 M HEPES, 0,1 M NaCl, et 0,1% de PEG 6000 à pH7. Cette activité sera comparée à l'activité d'un inhibiteur direct de la thrombine «l'argatroban» dans un système purifié.

Donc 160 μ L du tampon THR sont incubés avec 20 μ L de la thrombine aux différentes concentrations indiquées et 20 μ L de substrat chromogène de la thrombine (S2238), le mélange est incubé pendant 5 min à une température ambiante. ensuite 20 μ L d'acide acétique glacial à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction. La lecture de la DO est réalisée à 405 nm.

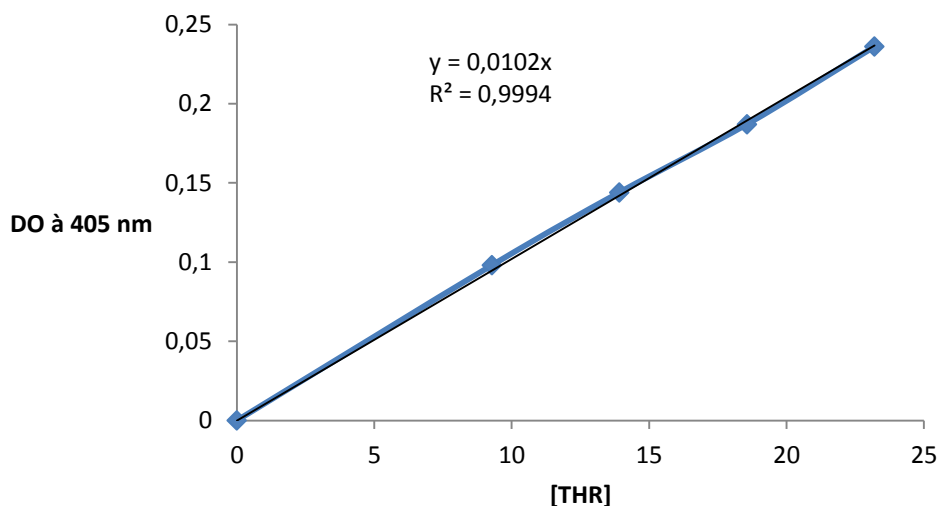


Figure 19: Droite d'étalonnage de la thrombine.

D'autre part, pour déterminer la concentration inhibitrice IC_{50} de dérivé coumarinique (DCBC) et de l'argatroban, deux gammes de concentrations respectives de dérivé coumarinique et d'argatroban ont été choisies en fonction des données de la littérature [66][206].

En effet les deux gammes de concentrations de DCBC (40, 80, 120, 160 et 200 nM) à partir d'une solution mère de 2607,5 nM et de l'argatroban (80, 160, 240, 320, et 400 nM) à partir d'une solution mère de $9,256 \cdot 10^{-3}$ mM ont été préparées. La solution de la thrombine ($C = 23,2$ nM) est préparée à partir d'une solution mère de 1870 nM.

La méthode de détermination de l' IC_{50} consiste à incuber dans une plaque ELISA, 20 μ L de dérivé coumarinique ou de l'argatroban à des différentes concentrations avec 20 μ L de la thrombine ($C = 23,2$ nM) dans 140 μ L du tampon de la thrombine pendant 20 min à température ambiante. 20 μ L de substrat chromogène de la thrombine S-2238 sont ajoutés par la suite et le mélange est incubé pendant 5 min. L'arrêt de la réaction se fait par l'ajout de 20 μ L d'acide acétique glacial à 10%. La lecture de la densité optique (DO) est réalisée à une longueur d'onde de 405 nm.

Le background est mesuré en rajoutant 20 μ L de DCBC à 180 μ L du tampon thrombine et 20 μ L d'acide acétique glaciale à 10%.

Chapitre III

Résultats et Discussion

I. Synthèse et caractérisations des copolymères de PDMMLA:

Six copolymères dérivés de PDMMLA ont été synthétisés grâce à la polymérisation anionique par ouverture de cycle. Ce type de polymérisation est simple et rapide permettant d'avoir des homopolymères ou des copolymères ayant des structures et des groupes latéraux bien définis, avec des architectures différentes (blocs, statistiques...). La réaction par ouverture de cycle peut être réalisée en masse, en solution, émulsion ou en dispersion. En effet le polymère se forme quand les esters cycliques réagissent avec l'amorceur conduisant à la formation d'un polyester versatile, biocompatible et biodégradable possédant des bonnes propriétés mécaniques[204][139]. Donc pour synthétiser les différents copolymères il faut d'abord synthétiser les unités constitutives de ces copolymères : les monomères. Ces derniers ont été synthétisés en cinq étapes avec des rendements satisfaisants :

La méthylation de 2-oxal-propionate de diéthyle est effectuée avec un rendement de 90% (**Schéma 11**). Dans cette étape le produit final n'a pas besoin d'être purifié. La formation de ce produit est suivie par une CCM après son traitement ainsi que par RMN ^1H et RMN ^{13}C .

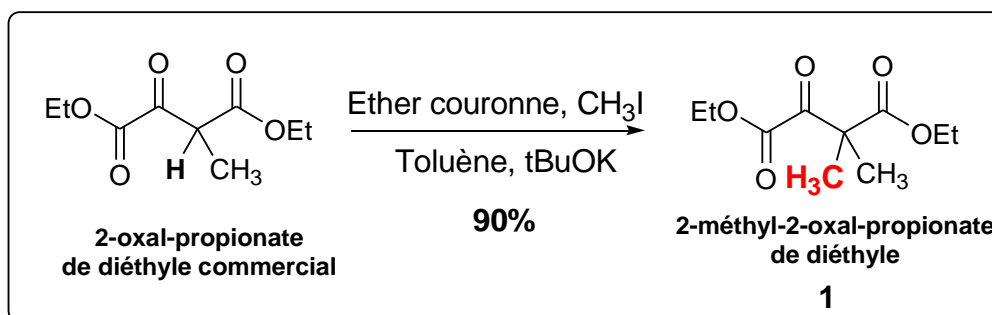


Schéma 11: Synthèse du 2-méthyl-2-oxalpropionate de diéthyle (1)

Une fois le 2-méthyl-2-oxal-propionate de diéthyle est formé, ce dernier est réduit pour former le 3,3-diméthylmalate de diéthyle (**2**) avec un rendement de 66%. (**Schéma 12**)

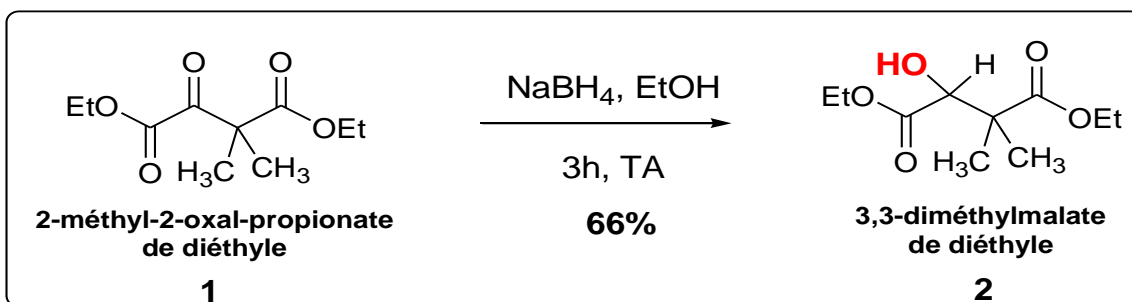


Schéma 12: Synthèse du 3,3-diméthylmalate de diéthyle (2)

Le 3,3-diméthylmalate de diéthyle formé subit une hydrolyse basique avec un rendement de 74% après recristallisation (**Schéma 13**).

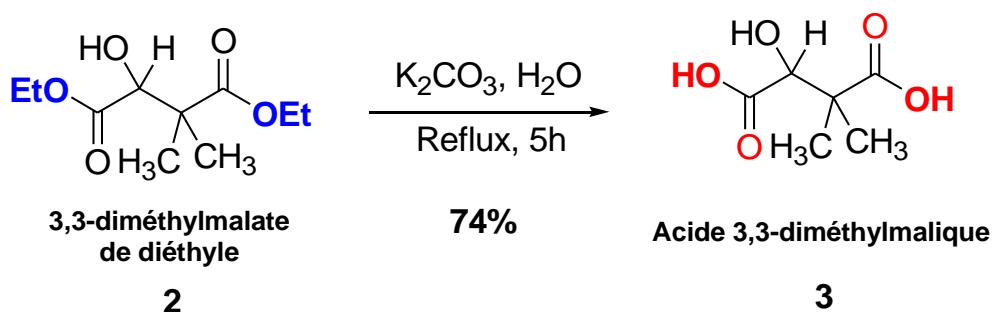


Schéma 13 : Synthèse de l'acide 3,3-diméthylmalique (3)

Avec le diacide formé, deux monoesters (benzylique et hexylique) ont été synthétisés. L'anhydride intermédiaire qui s'est formé [207] va réagir de façon régiospécifique avec l'alcool selon le mécanisme ci-dessous (**Schéma 14**).

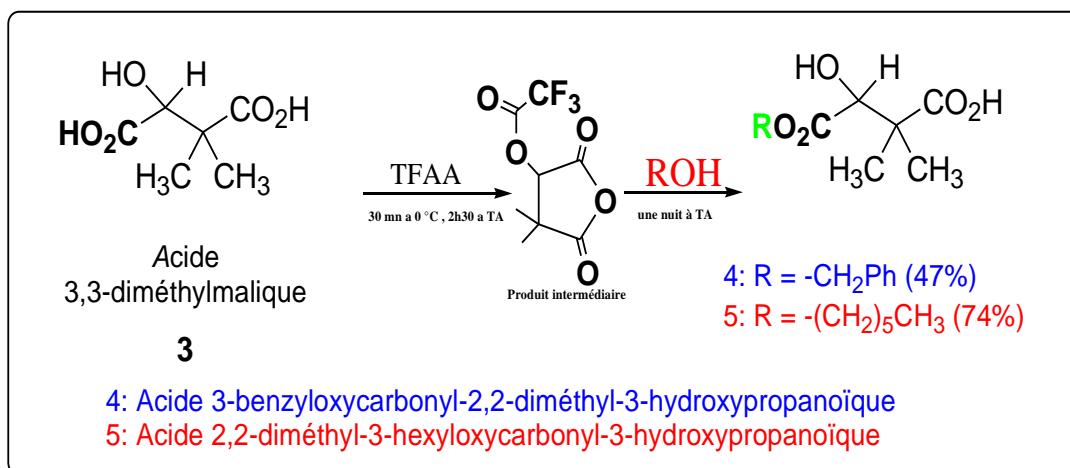


Schéma 14: Synthèse des monoesters benzylique et hexylique 4 et 5.

La réaction de l'anhydride avec l'alcool benzylique génère le monoester benzylique (**4**) avec un rendement de 47% alors que la réaction de l'anhydride avec l'alcool hexylique donne le monoester hexylique (**5**) avec un rendement de 74%. (**Schéma 14**)

Les structures de deux monoesters purs ont été analysées par RMN (**Figure 20**)

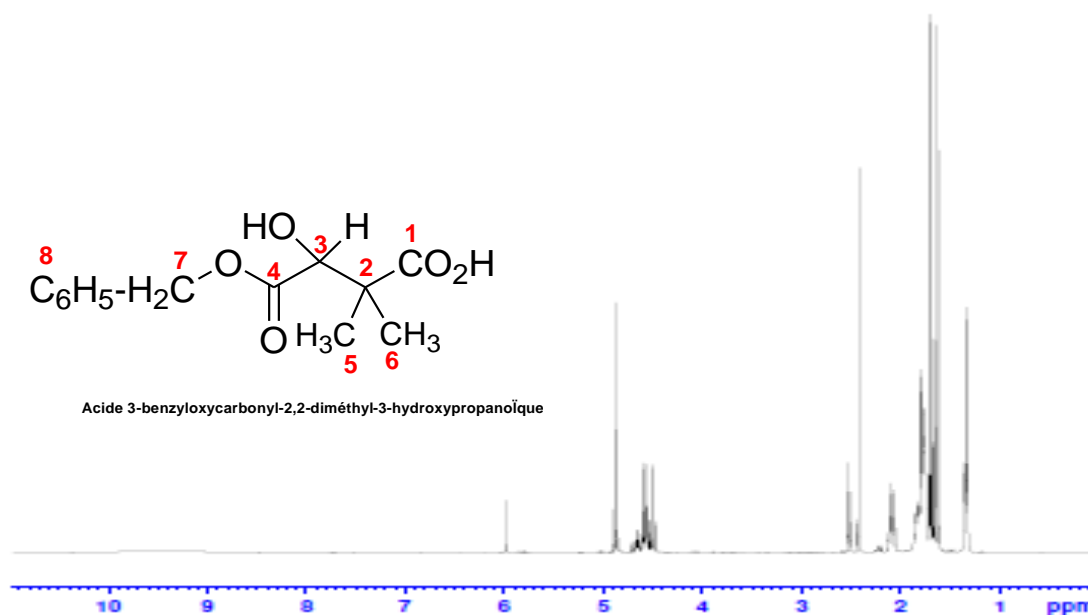


Figure 20 : Structure H¹ RMN de monoester benzylique

A partir de deux monoesters synthétisés la lactone benzylique (4-benzyloxy carbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone) et la lactone hexylique (3,3-diméthyl-4-hexyloxycarbonyl-2-oxétanone) ont été synthétisées (**schéma 15**).

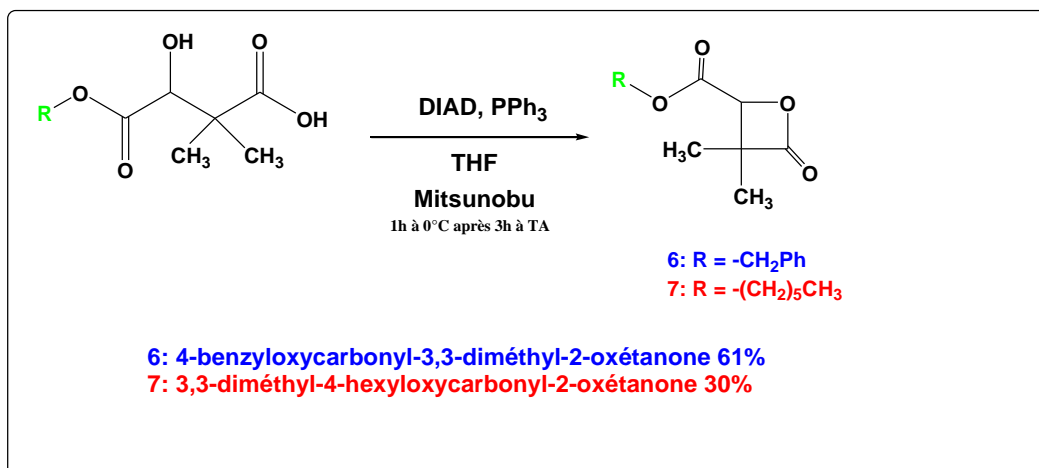


Schéma 15: Synthèse des β -lactones α,α,β -trisubstituées 6 et 7.

Les deux lactones obtenues 6 et 7 ont été purifiées par chromatographie sur colonne de gel de silice et les rendements finaux de la lactone benzylique et hexylique étaient respectivement de 61% et 30%.

Les structures de deux lactones pures ont été analysées par Infra-Rouge (FT-IR) et par RMN. Le spectre FT-IR a montré une bande d'absorption caractéristique du carbonyle de la fonction lactone à 1835 cm^{-1} en plus de la bande d'absorption attribuée au carbonyle de la fonction ester qui existait déjà à 1754 cm^{-1} (**Figure 21**).

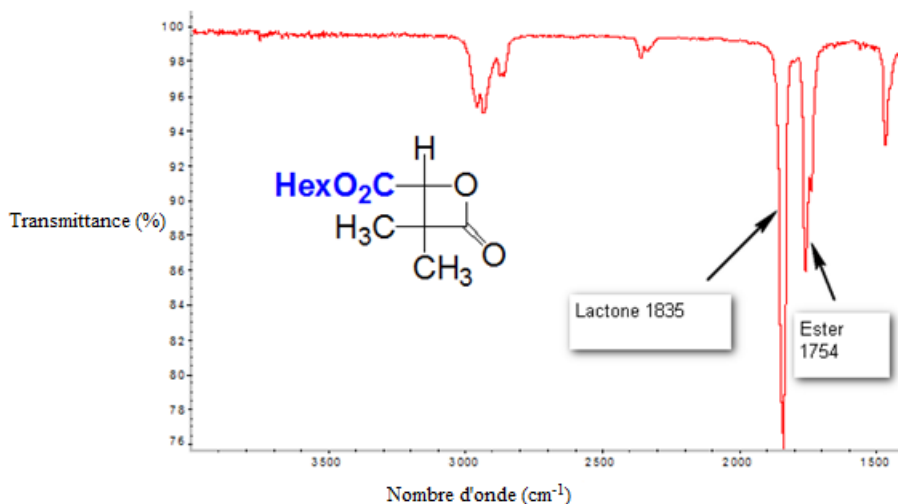


Figure 21: spectre IR de la lactone hexylique

Le spectre RMN ^1H (**Figure 22**) des deux lactones montre un écart de déplacement chimique entre les deux singulets à 1,16 ppm et 1,22 ppm lesquels correspondent aux deux méthyles en position α du carbonyle ce qui potentiellement prouve la formation du cycle à 4 chaînons qui empêche la rotation libre des deux méthyles.

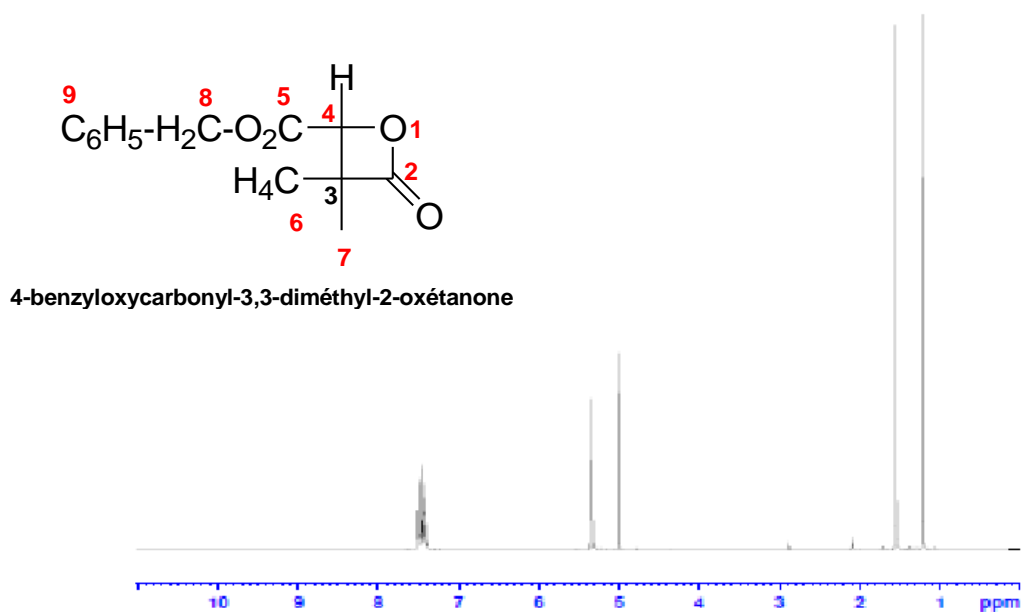


Figure 22 : Spectre RMN ^1H de la lactone benzylique

Les lactones formées vont être les unités constitutives de nos copolymères. En effet, en jouant sur le pourcentage de chacune de ces lactones, le caractère dominant de la balance hydrophyle/hydrophobe de futur copolymère sera choisi.

Le passage de l'ester à la lactone et de la lactone au polymère est vérifié par FT-IR. En effet l'apparition de la bande lactonique à 1835 cm^{-1} à côté de la bande d'ester préalablement existante à 1754 cm^{-1} confirme la formation de la lactone benzylique et de la lactone hexylique.

Par contre lors de la polymérisation la disparition de cette bande confirme la disparition de cycles et par la suite la formation de copolymères (**Figure 23**).

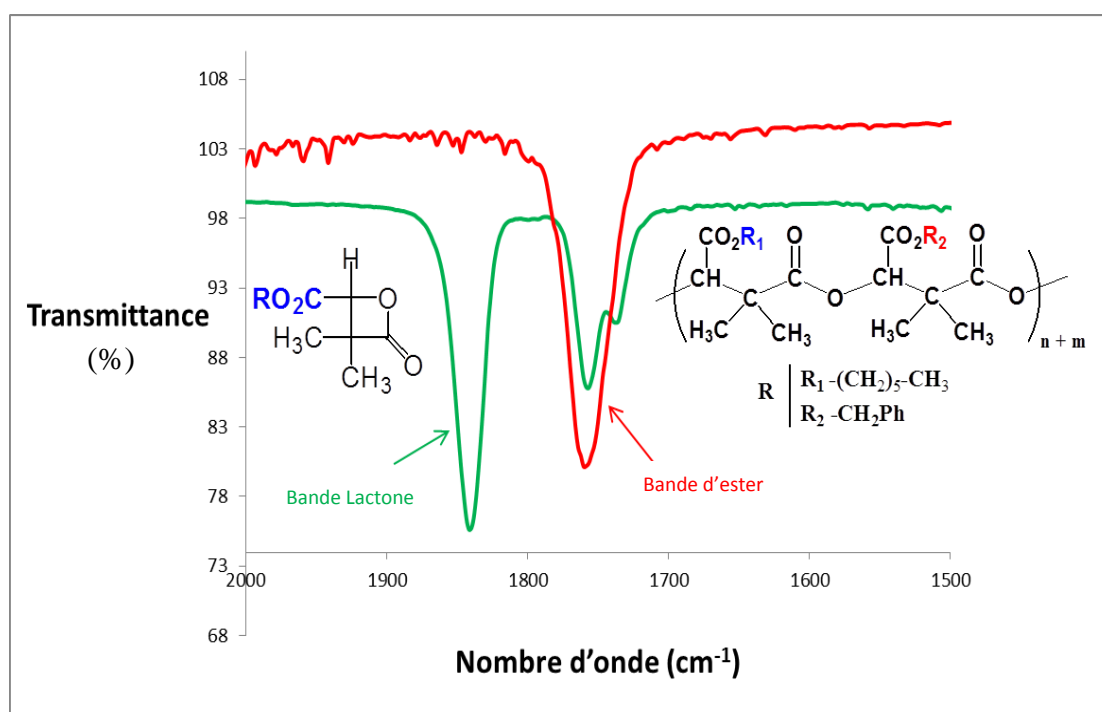


Figure 23: Evolution du spectre IR au cours de la polymérisation

Donc à partir des deux lactones benzylique et hexylique, trois copolymères statistiques protégés par le groupement benzylique ont été synthétisés : P1, P2, et P3, (**Schéma 16**). Ils comportent respectivement 70%, 50%, 30% d'unité benzyle et 30%, 50% et 70% d'unité hexyle :

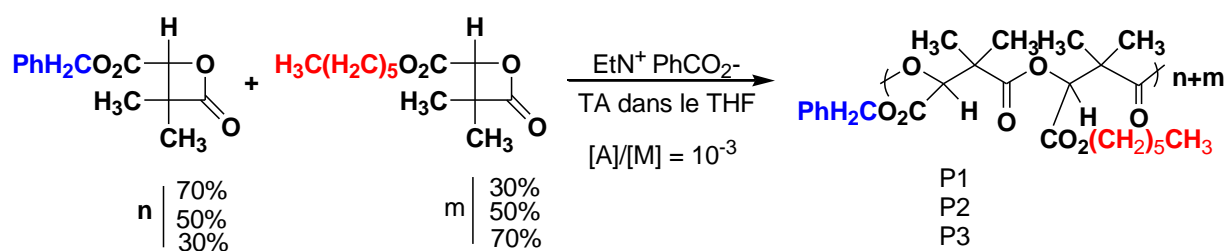


Schéma 16: Synthèse de trois copolymères statistiques

La formation du (poly[*R,S*]-3,3-diméthylmalate de benzyle) a été suivie par FT-IR.

Pour les copolymères à blocs, la synthèse est effectuée en deux étapes. La première consiste à la synthèse du premier bloc puis la deuxième lactone est ajoutée pour synthétiser le deuxième bloc (**Schéma 17**).

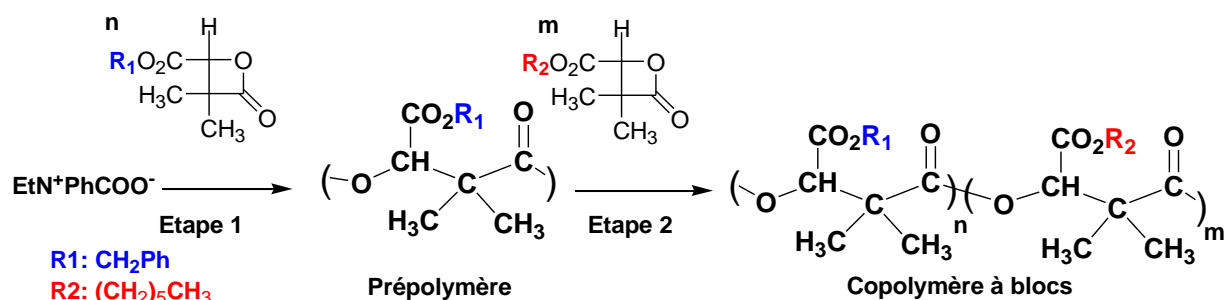
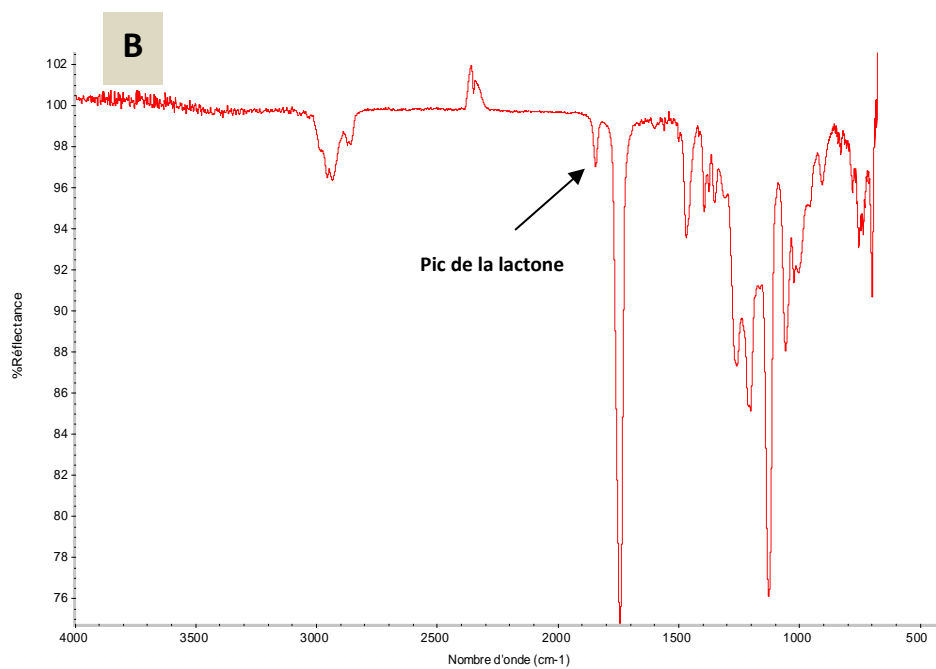
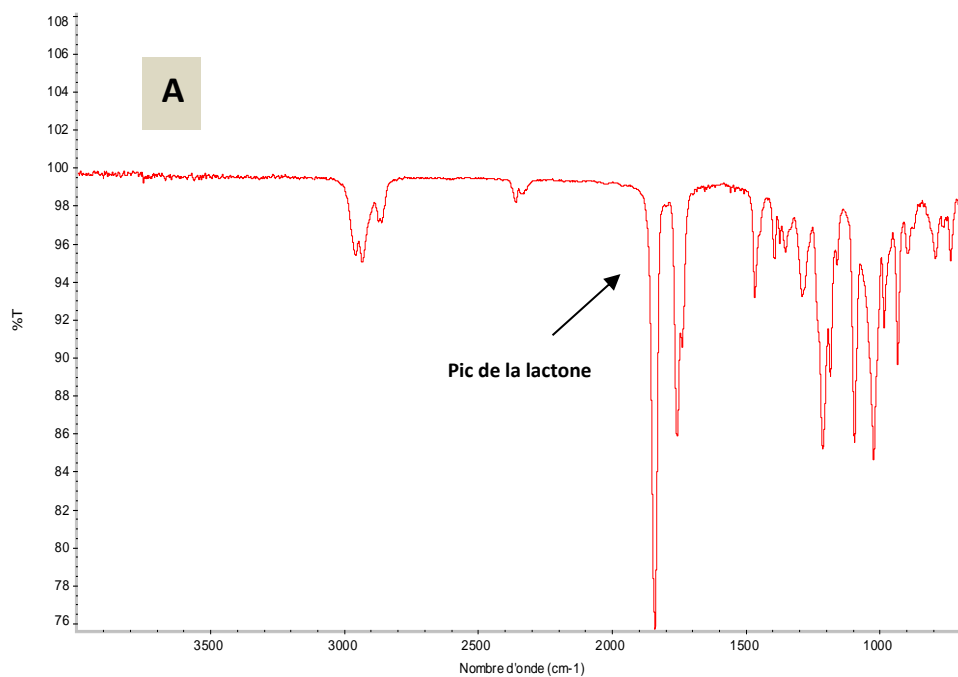


Schéma 17: Synthèse des copolymères à blocs

La polymérisation est suivie par FT-IR en suivant la disparition progressive de la bande lactonique de chaque lactone.

Dans la **figure 23** (partie A) et au début de la polymérisation, il est bien remarquable l'existence d'un pic bien intense pour la fonction lactone et un autre pic pour la fonction ester, au fur et à mesure que la polymérisation poursuit, la diminution de pic lactone sera bien remarquable au même temps que l'accentuation de la fonction ester (partie B après 48h),

jusqu'à la disparition complète de la fonction lactone (partie C après 72h). Donc à la fin de la polymérisation seulement la fonction ester apparaît avec un pic bien intense c'est qui confirme la formation d'un nouveau copolymère (**Figure 23 C**).



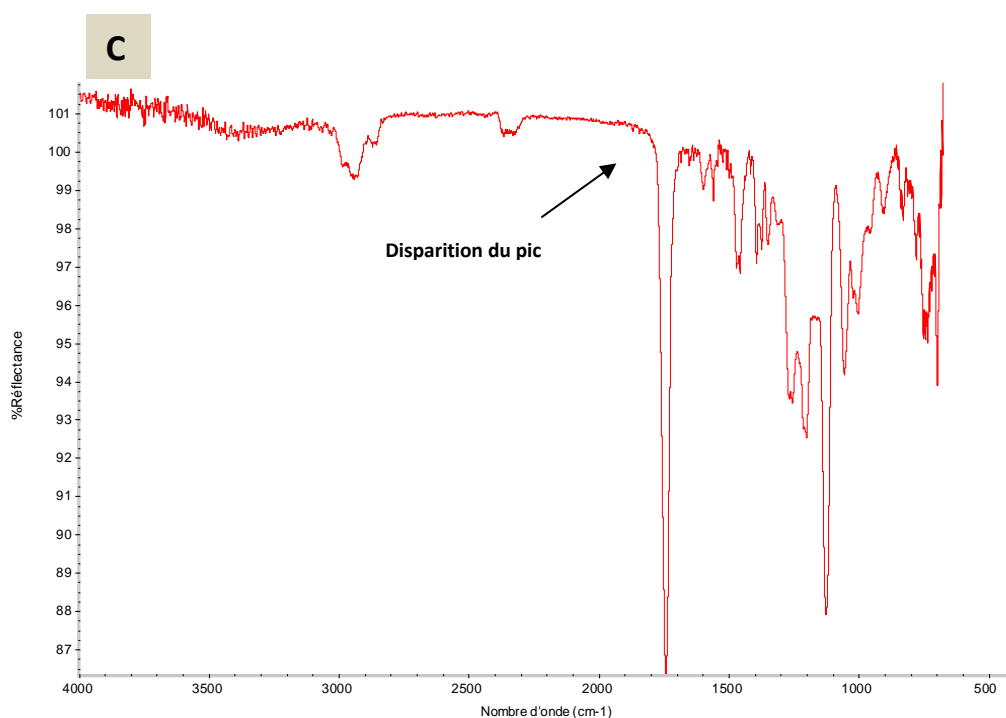


Figure 24: Evolution du spectre IR de P4' au cours de la polymérisation: A (début de polymérisation), B (après 48 heures), et C (Après 72 heures, fin de polymérisation)

La structure des copolymères est déterminée par RMN ^1H , dans la figure ci-dessous (**Figure 25**) qui présente un exemple de copolymère statistique : le PDMMLAH $_{30}$ -*co*-Hex $_{70}$.

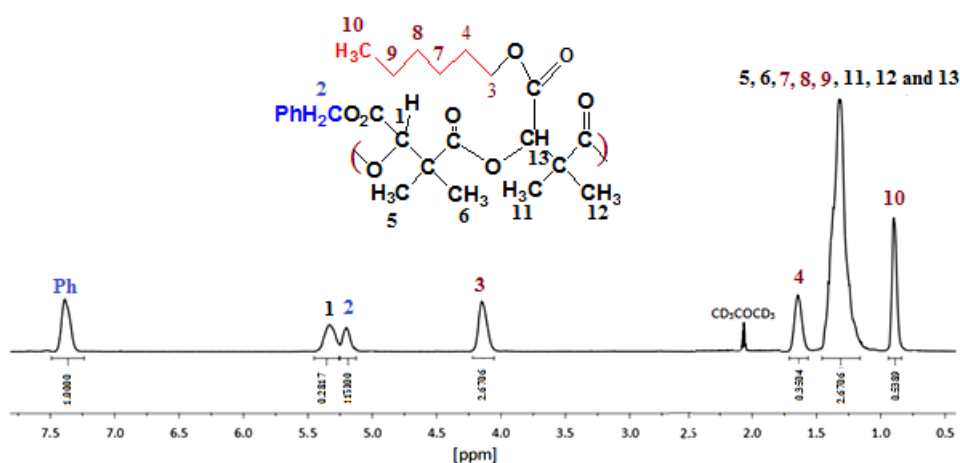


Figure 25 : Spectre RMN ^1H du PDMMLAH $_{30}$ -*co*-Hex $_{70}$

Une fois les copolymères sont formés, les pourcentages de chaque monomère sont déterminés à partir des spectres RMN ^1H par le calcul de rapport d'intégration de «CH₂-O-Bn» de l'ester benzylique (pic à 5.20 ppm) par rapport à l'intégration de «CH₂-O-Hex» le plus déblindé de la fonction ester hexylique (pic à 4.20 ppm) (**Figure 26**).

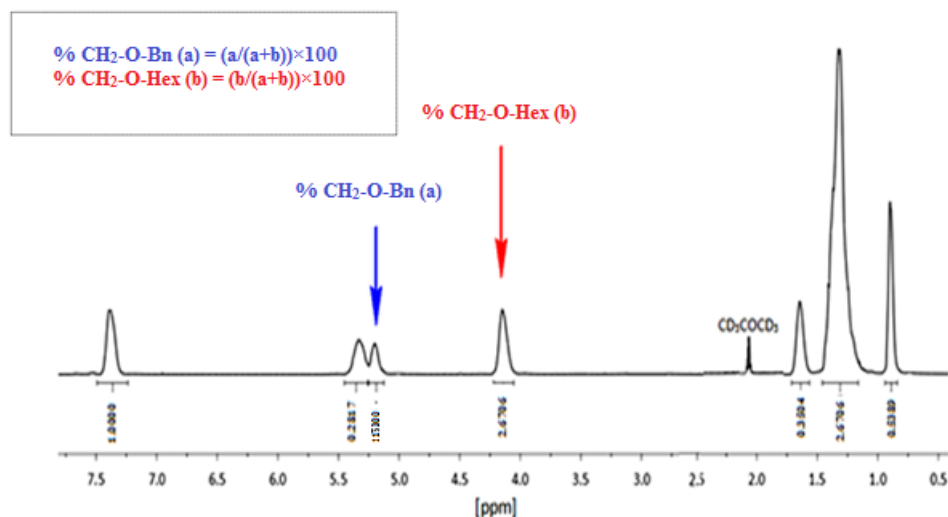


Figure 26: Calcul du pourcentage des monomères benzylique et hexylique de chacun des copolymères statistique et à bloc à partir du spectre RMN ^1H : % CH₂-O-Bn (a) = (a/ (a+b)) ×100, % CH₂-O-Hex (b) = (b/ (a+b)) ×100.

Les pourcentages obtenus de chaque monomère sont donnés dans le **Tableau 5** ci-dessous :

Tableau 5: les pourcentages expérimentaux de monomères obtenus pour chaque copolymère : P1, P2, P3, P4, P5, et P6

Copolymère	CH ₂ -O-Bn (%)	CH ₂ -O-Hex (%)
P1	71	29
P2	52	48
P3	31	69
P4	70	30
P5	49	51
P6	28	72

Selon les résultats obtenus dans le tableau, on peut confirmer qu'on est très proche des pourcentages souhaités pour chaque monomère.

Ces copolymères vont subir une hydrogénolyse catalytique pour enlever le groupement benzylique qui protège la fonction acide carboxylique pour donner les différents copolymères statistiques : P1' : PDMMLAH_{30-co}-Hex₇₀, P2' : PDMMLAH_{50-co}-Hex₅₀ et le P3' : PDMMLAH_{70-co}-Hex₃₀ et les copolymères à blocs : P4' : PDMMLAH_{30-b}-Hex₇₀, P5' : PDMMLAH_{50-b}-Hex₅₀ et P6' : PDMMLAH_{70-b}-Hex₃₀.

La déprotection totale est confirmée par la disparition de pic de CH₂ benzylique à 5,2 ppm et le pic de groupement phényle à 7,4 ppm sur le spectre RMN ¹H (**Figure 27**).

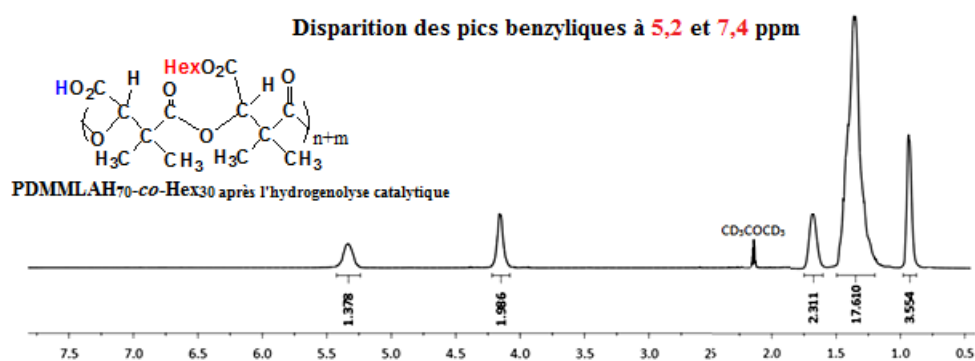


Figure 27 : Profil de spectre RMN ¹H de PDMMLAH_{70-co}-Hex₃₀ après l'hydrogénolyse catalytique

Une fois synthétisés, les copolymères sont caractérisés à température ambiante par une chromatographie d'exclusion stérique (SEC) dans l'acétone pour les copolymères protégés et dans le THF pour les copolymères déprotégés pour déterminer les masses moléculaires et l'indice de polydispersité de chaque copolymère. La température de transition vitreuse mesurée par la Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC). Les différents résultats sont donnés dans le **Tableau 6** ci-dessous .

Tableau 6: Caractérisations physicochimiques des copolymères statistiques et à blocs avant et après hydrogénéolyse catalytique

	Copolymères	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	D	Tg (°C)
Copolymères protégés	P1	18990	17800	1,07	5,6
	P2	39000	18800	2,00	19,3
	P3	23900	13700	1,74	31,7
	P4	34800	29900	1,16	-6,2/63,0
	P5	28100	28000	1,00	-1,3/72,5
	P6	22600	22600	1,00	-9,7/56,2
Copolymères déprotégés	P1'	141200	128500	1,10	13,4
	P2'	85400	79600	1,08	11,2
	P3'	35900	33600	1,07	51,7
	P4'	109200	44500	2,45	-9,8/56,2
	P5'	139600	123200	1,13	-9,0/57,2
	P6'	53700	30700	1,74	-9,1/60,3

Comme les propriétés mécaniques des copolymères dépendent de la température, les températures de transition vitreuse (T_g) (**Figure 28**) sont déterminées. La T_g est un paramètre intrinsèque essentiel qui influence les applications potentielles de chaque polymère. Cette température est essentiellement déterminée par une diminution de la température accompagnée d'une réduction des mouvements de chaînes de copolymères. A l'état de la transition vitreuse, les propriétés mécaniques et physiques tels que : la déformation, le volume, la densité et les mouvements des chaînes de polymères changent. En effet il y a deux

facteurs qui vont directement influencer le polymère lors de la congélation et sa transformation en son état vitreux : le volume libre et la mobilité des chaînes [208].

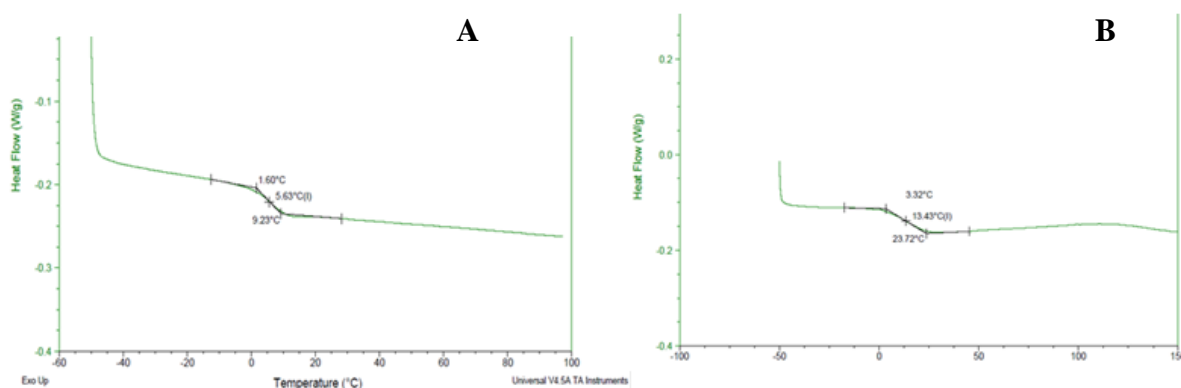


Figure 28 : Exemple de T_g de copolymère statistique P1 (A) et P1'(B)

D'après le **Tableau 6** et selon les résultats obtenus, une seule T_g est observée avec les copolymères statistiques avant et après l'hydrogénolyse, ce que confirme la distribution aléatoire de différents monomères donnant le caractère statistique aux copolymères. En effet avant la déprotection les T_g de P1, P2 et P3 étaient respectivement égales à 5,6, 19,3 et 31,7 °C. Par conséquent une hausse proportionnelle de la température est bien remarquée avec l'augmentation du pourcentage de la lactone benzylique. En ce qui concerne les copolymères à bloc, deux températures ont été observées pour chaque copolymère : une négative (-6,2, -1,3, et -9,7 °C) correspondant au groupement hexylique et l'autre positive (63, 72,5, et 56,2 °C) qui correspond au groupement benzylique. La présence de deux T_g est une preuve de la présence de deux blocs dans chaque copolymère.

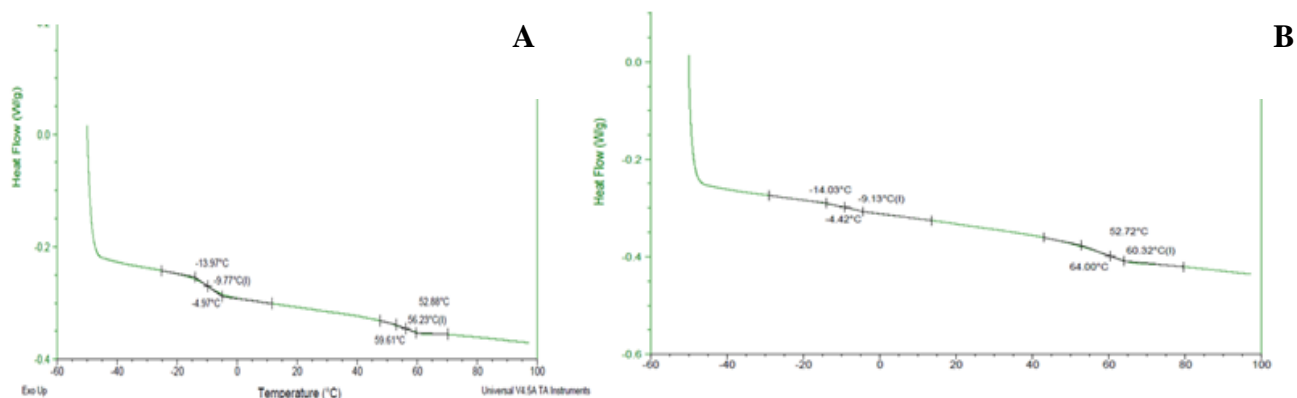


Figure 29 : Exemple de T_g de copolymère à bloc P6 (A) et P6'(B)

Après hydrogénéolyse, la plupart des copolymères statistiques ont montré une hausse des T_g par rapport aux copolymères statistiques non déprotégés due probablement à la formation des liaisons hydrogènes intermoléculaires qui s'établissent entre les groupements carboxyliques de copolymères statistiques. Les liaisons hydrogène empêchent les mouvements de chaînes [151]. Pour les copolymères à blocs une légère diminution de la T_g est observée.

D'autre part, selon les résultats obtenus des masses (**Figures 30 et 31**), la plupart des masses moléculaires des copolymères a augmenté après l'hydrogénéolyse catalytique. Cette augmentation est due à la formation des liaisons hydrogène intermoléculaires entre les groupements carboxyliques empêchant les mouvements des chaînes de copolymères [209]. D'un autre côté, l'indice de polydispersité « $D = M_w/M_n$ » pour les copolymères protégés était compris entre 1 et 2 et entre 1,07 et 2,45 pour les copolymères déprotégés, reflétant une bonne homogénéité des chaînes pour les copolymères protégés et aussi pour les copolymères déprotégés.

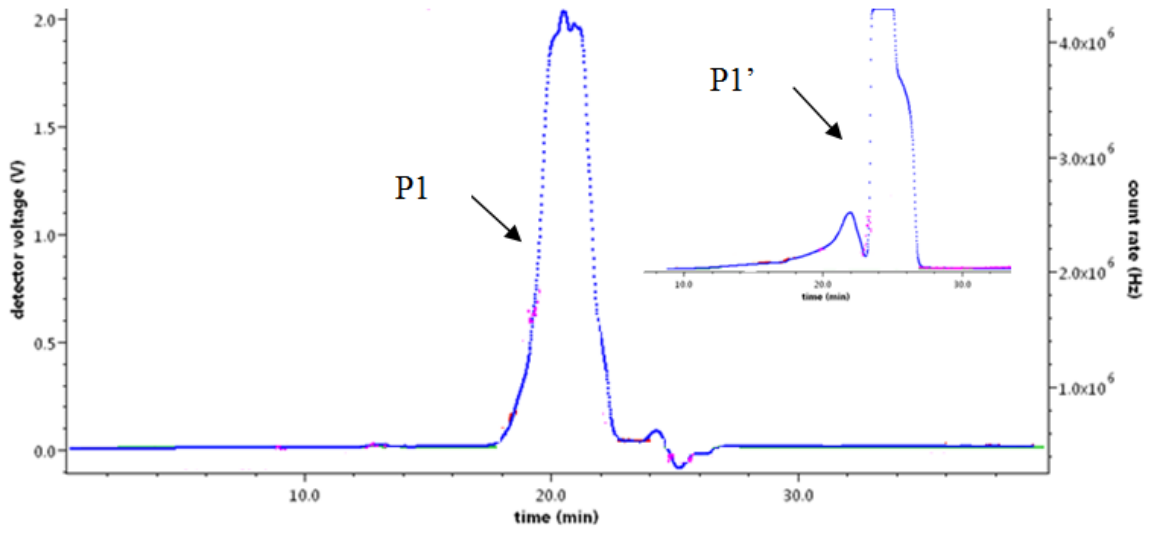


Figure 30 : Spectre de masse moléculaire pour P1 et P1'

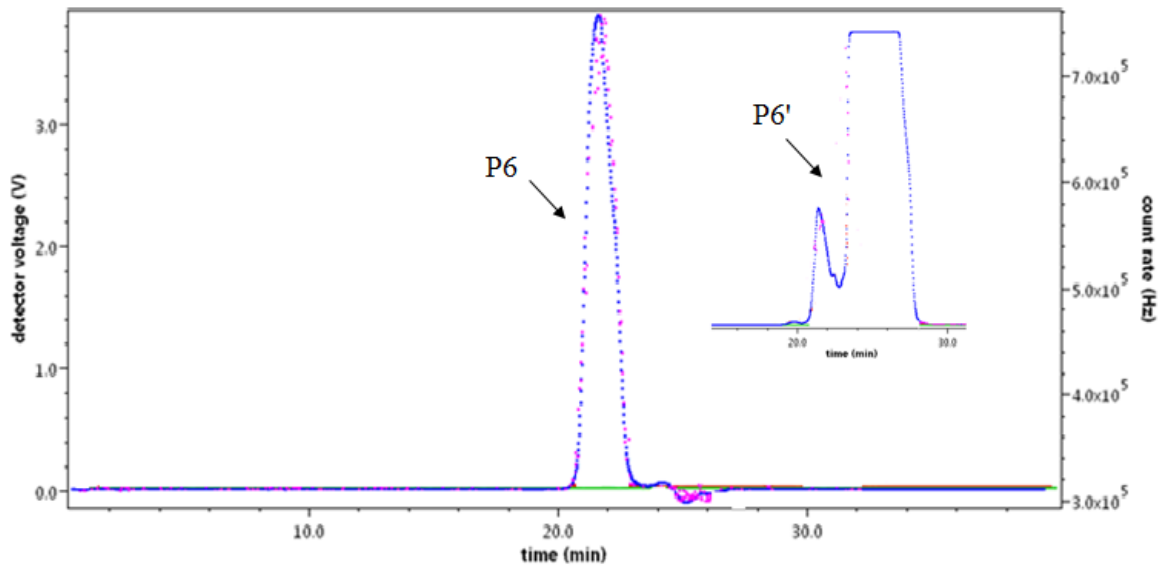


Figure 31 : Spectre de masse moléculaire pour P6 et P6'

II. Développement des nanoparticules dérivées du PDMMLA:

1. Formulation et caractérisation des nanoparticules dérivées du PDMMLA:

Une fois les copolymères sont synthétisés et caractérisés, une optimisation de formulation de nanoparticules a été réalisée en vue de former des nanosphères avec les copolymères statistiques et des micelles avec les copolymères à blocs (**Figure 32**).

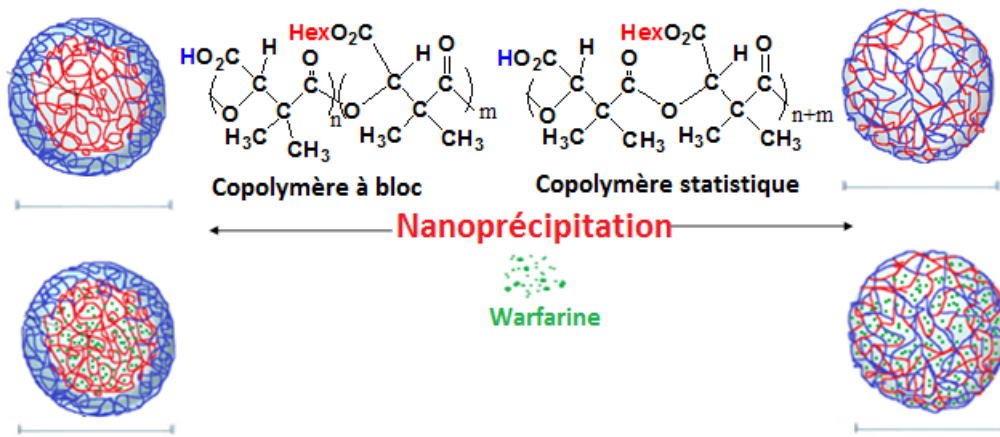


Figure 32: Nanoparticules de PDMMLA formées par nanoprecipitation

En premier lieu, un volume minimal d'acétone est ajouté pour chaque copolymère. La solution obtenue est ajoutée goutte à goutte à une solution d'eau ultrapure sous agitation.

Cette formule a conduit à la formation des nanoparticules ayant un aspect allongé et en forme de tige (**Figure 33**).

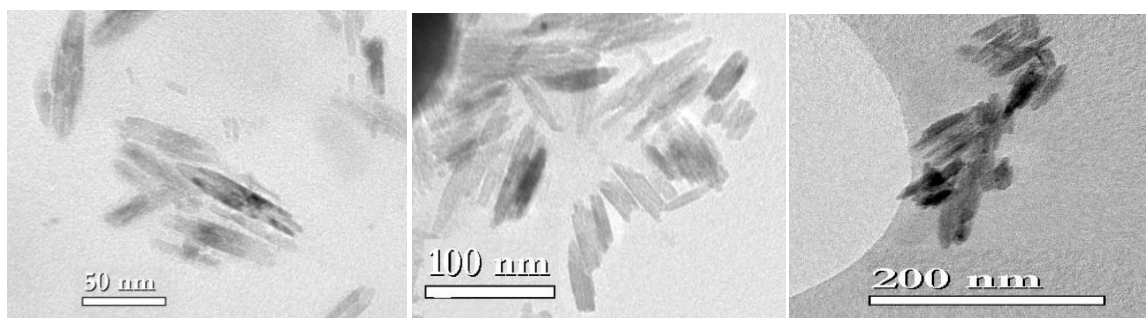


Figure 33: nanoparticules en forme de tige obtenues avec 1 ml d'acétone

Par conséquent, nous avons augmenté le volume d'acétone afin d'obtenir des nanoparticules sphériques. La nouvelle optimisation a consisté à ajouter 1 mL d'acétone pour chaque 1 mg du copolymère. De cette manière, des nanoparticules sphériques ont été obtenues, qu'il s'agisse de nanoparticules sans principe actif ou de nanoparticules chargées en warfarine.

2. Etude des caractéristiques des nanoparticules vides:

2.1. La forme des nanoparticules : par Microscopie Electronique à Transmission (MET):

Des nanoparticules vides et chargées avec le principe actif ont été formées avec les copolymères statistiques : P1', P2', et P3' et avec les copolymères à blocs : P4', P5' et P6'.

Dans un premier temps, on a mis en évidence les nanoparticules vides pour étudier ses différentes caractéristiques.

La **figure 34** ci-dessous montre l'aspect microscopique en MET des nanoparticules de PDMMLA statistiques vides. Les nanoparticules obtenues ont un aspect sphérique avec une taille de 50 nm environ et sont caractérisées par une dispersion relativement homogène essentiellement pour P1' et P2'.

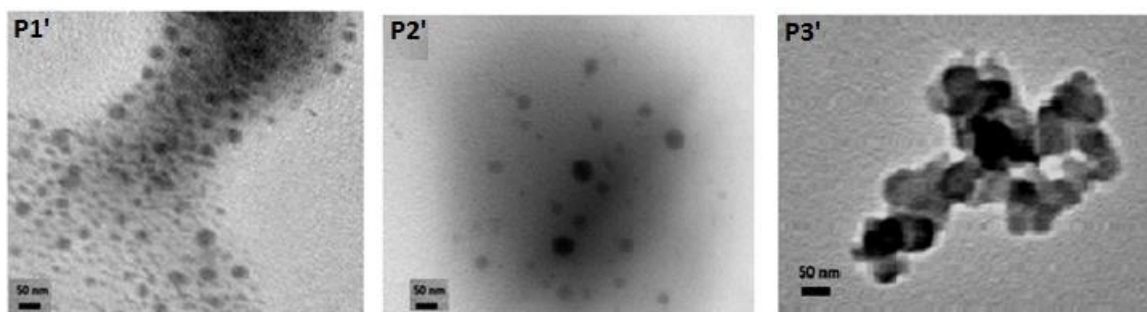


Figure 34: Images des nanoparticules de PDMMLA statistiques respectivement pour **P1'**, **P2'** et **P3'** données par la microscopie électronique à transmission MET

Concernant les copolymères à blocs, la microscopie électronique a montré des nanoparticules de forme sphériques et dispersées sur une grande surface pour P4' ou relativement entassées pour P5' et P6' (**Figure 35**), la taille de celles-ci étant de l'ordre de 50 nm.

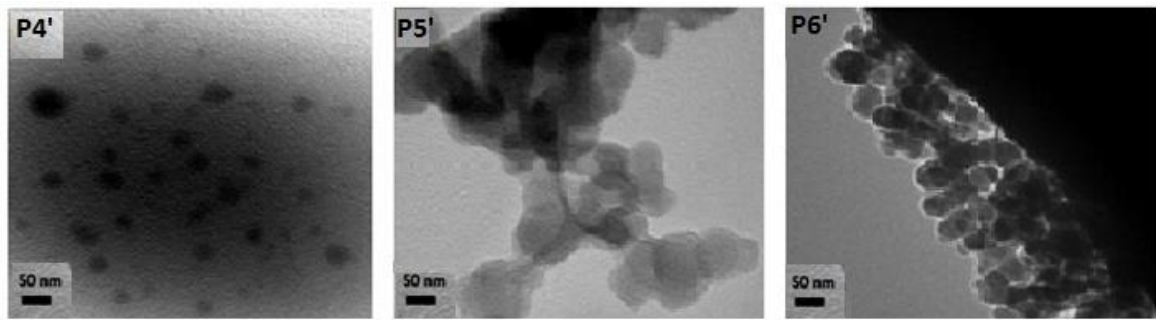


Figure 35: les nanoparticules des PDMMLA à blocs déterminées par MET : respectivement de **P4'**, **P5'** et **P6'**

La forme des nanoparticules est un paramètre crucial qui influence significativement leur fonction. Toutefois auparavant, le large potentiel de la forme n'a pas été étudié de manière approfondie à cause de la difficulté de la création des nanoparticules de polymère avec des formes bien contrôlées.

Par conséquent, ce n'est que récemment que les chercheurs ont commencé à étudier l'énorme impact de la forme qui peut jouer un rôle important dans l'internalisation cellulaire, la demi-vie de circulation et la biodistribution des nanoparticules.

L'acheminement des particules dans le corps, indépendamment du mode d'administration, est affecté par la forme des particules. Les mouvements des nanoparticules sphériques sont plus faciles à deviner grâce à leur symétrie inhérente. Dans son étude Moghimi et al. ont montré que l'extravasation des particules à travers les fenestrations entre les cellules endothéliales prédominantes dans les vaisseaux sanguins de tumeur [210], vont aussi dépendre des propriétés de flux des particules, en particulier l'orientation et le contact avec les parois des vaisseaux qui devrait significativement être affectés par la forme.

Par ailleurs, la géométrie des particules détermine la longévité de l'attachement avec la cible ou le site actif mais aussi l'internalisation de ces dernières par les cellules ainsi que leur destination et leur circulation une fois qu'elles sont à l'intérieur des cellules [211].

Dans le même thème, Decuzzi et al. ont démontré à travers un modèle mathématique que la forme des nano-vecteurs traversant les vaisseaux sanguins joue un rôle crucial dans leur accolement dans les parois vasculaires [212]. Par ce modèle aussi, ils ont démontré que les particules discoïdes peuvent circuler à travers les vaisseaux sanguins et donc peuvent adhérer

aux parois vasculaires sous flux plus fortement que les particules sphériques [213]. Dans le même contexte, la même équipe a montré que les particules non sphériques présentaient des mouvements plus complexes ce qui pouvait être exploité pour contrôler son accolement dynamique à la paroi vasculaire (margination) sans aucun besoin de forces latérales externes pour le faire bouger [213]. En effet les forces longitudinales et latérales ainsi que la force exercée par le flux sanguin dépendent de la taille, la forme et l'orientation des particules sous le flux sanguin et changent en fonction du temps au cours de l'acheminement de la particule.

Plus récemment et dans le même contexte en confirmant les résultats trouvés par Decuzzi et al. les expériences *in vitro* effectuées sur des particules sphériques, discoïdes, et quasi-hémisphériques ayant le même poids et qui sont injectées dans des chambres de puits de flux parallèles sous des conditions hydrodynamiques bien contrôlées, ont montré que les particules discoïdes possèdent une tendance de s'accoler à la paroi plus que celles quasi-hémisphériques et aussi plus que les particules sphériques dans le même champ gravitationnel [214].

Ces résultats fournissent un modèle pour l'analyse de la phagocytose des cibles naturelles qui possèdent une anisotropie géométrique.

2.2. La taille des nanoparticules:

La caractérisation des nanoparticules par cette technique a donné les résultats consignés dans le **Tableau 7** (toutes les mesures ont été effectuées à une température ambiante).

Tableau 7: Caractérisations de nanoparticules de PDMMLA statistiques et à blocs par le DLS : détermination de la taille et du potentiel zêta dans une solution de NaCl (1mM)

	Nanoparticules	Taille (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
Copolymères statistiques	P1'	80	0,08	-70
	P2'	85	0,14	-78
	P3'	93	0,10	-63
Copolymères à blocs	P4'	60	0,09	-72
	P5'	85	0,11	-60
	P6'	62	0,25	-80

Les tailles des nanoparticules étaient situées entre 80 et 93 nm pour les nanoparticules de copolymères statistiques et entre 60 et 85 pour celles des copolymères à blocs. D'autre part, l'indice de polydispersité (PDI) a été trouvé toujours inférieur ou égale à 0,25 : entre 0,08 et 0,14 pour les copolymères statistiques et entre 0,09 et 0,25 pour les copolymères à blocs. En ce qui concerne le potentiel zêta, qui détermine la charge de la surface des nanoparticules, il est compris entre -78 mV et -63 mV pour les nanoparticules de copolymères statistiques et entre -60 et -80 mV pour celles de copolymères à blocs. Cette charge négative est due à la présence des groupements carboxylates «COO⁻» présents à la surface des nanoparticules. Ces groupes carboxylates sont à l'origine de forces de répulsion qui empêchent l'agrégation des nanoparticules et assurent la stabilité des suspensions nanoparticulaires.

En effet, la taille des nanoparticules est un paramètre important pour désigner un système approprié de suivi cellulaire et de vectorisation du principe actif parce qu'elle détermine le mécanisme et le taux de leur absorption cellulaire et leur capacité de diffuser à travers les tissus. La mise en évidence des effets de la taille des nanoparticules va influencer toutes les applications de nanoparticules en biomédecine [215][216]. Selon la littérature, bien que la taille minimale d'une particule susceptible d'être phagocytée par les macrophages soit de l'ordre de 0,5 µm, cette donnée est généralement utilisée pour souligner la tolérance potentielle des macrophages : «les macrophages peuvent phagocyter des molécules ayant une taille plus importante que la sienne» par rapport à d'autres modes d'endocytose [217].

Pour un modèle de polystyrène, les particules de l'ordre de 250 nm à 3 µm ont montré un taux maximal de phagocytose proportionnel en fonction de la taille des particules, alors que les nanoparticules ayant une taille inférieure à 250 nm étaient internalisées moins efficacement [218].

Dans le même contexte, il a été démontré par Pratten et al. [219] que l'absorption cellulaire dépend de la taille des nanoparticules, à travers une étude *in vitro* de l'absorption des particules ayant une taille de 30 nm à 1100 nm par des macrophages péritonéaux de rat. Les nanoparticules de Percoll (composé de particules de silicates colloïdales de 15-30 nm de diamètre (23 % m/m dans de l'eau) qui sont recouvertes de polyvinylpyrrolidone) ayant un diamètre de 30 nm et les nanoparticules de polystyrène ayant des différents diamètres variant de 100 à 1100 nm étaient absorbées par les macrophages. Il a été remarqué que l'absorption augmentait régulièrement avec la durée d'incubation et qu'elle était inhibée par les faibles températures ou les inhibiteurs métaboliques. Le taux de la clairance augmente avec l'augmentation du diamètre de la particule. En effet, le taux d'absorption de Percoll était de dix fois plus importantes et celui de 100 nm des billes de polystyrène était de cent fois plus importante le taux de la phase fluide de pinocytose. Les billes de polystyrène ayant un diamètre de 1100 nm étaient capturées à 700 fois ce taux [219].

2.3. La charge de surface des nanoparticules :

Outre la géométrie et la taille des nanoparticules, la charge de la surface représente particulièrement la stabilité, la biodistribution et l'interaction des nanoparticules avec les environnements biologiques d'un côté et l'absorption cellulaire et le taux de clairance de nanoparticules par le système immunitaire de l'hôte de l'autre. En effet la charge de la surface des nanoparticules polymériques constitue un des facteurs les plus importants qui affectent la performance et le destin des nano-vecteurs et constituent un paramètre additionnel fondamental pour les caractéristiques des nanoparticules [220].

La charge des nanoparticules est déterminée par le potentiel zêta. En fait, les nanosuspensions avec un potentiel zêta supérieur à ± 30 mV sont physiquement stables, et les nanoparticules ayant un potentiel zêta supérieur à ± 60 mV ont montré une excellente stabilité. Toutefois les nanosuspensions ayant un potentiel zêta inférieur à ± 20 mV ont montré une stabilité limitée et celles de moins de ± 5 mV subissent une agrégation importante [221].

Les nanoparticules cationiques provoquent des perturbations plus marquées de l'intégrité de la membrane plasmique, des dommages mitochondriaux et lysosomaux plus importants et un nombre plus important d'autophagosomes que les nanoparticules anioniques. Généralement les cellules non phagocytaires ingèrent les nanoparticules cationiques d'une façon importante, mais l'hydrophobie et la densité de la charge sont toutes les deux importantes. Les cellules phagocytaires absorbent préférentiellement les nanoparticules anioniques. Les différentes préférences d'absorption des cellules phagocytaires et non phagocytaires pour les nanoparticules cationiques et anioniques peuvent influencer l'efficacité et la sélectivité des nanoparticules pour la délivrance des principes actifs et pour l'imagerie [222].

Mura et al.[223] ont étudié l'effet de la charge de surface des nanoparticules sur leur internalisation cellulaire. Dans ce but, 3 types de nanoparticules ayant une charge positive, négative et neutre (chitosane, poloxamer ou le poly (vinyl alcool) respectivement) ont été synthétisés pour un recouvrement de surface. Les trois types de nanoparticules ont été internalisés par les cellules pulmonaires. La cytotoxicité des nanoparticules était limitée avec une absence de réponse inflammatoire indépendamment de la propriété de surface des nanoparticules de PLGA [223].

En plus, les nanoparticules chargées positivement sont éliminées plus rapidement de la circulation sanguine mais sont néanmoins à l'origine de plusieurs complications comme l'hémolyse et l'agrégation plaquettaire. Les demi-vies inégales des différentes charges sont le résultat de l'interaction des nanoparticules avec les protéines sériques comme l'immunoglobuline, les lipoprotéines le complément et les facteurs de coagulation, les protéines de phase aigue ainsi que les glycoprotéines [224]. Ces nanomatériaux une fois administrés dans la circulation sanguine sont éliminés dans les minutes ou dans les heures qui suivent par les cellules phagocytaires. Cette élimination rapide peut être évitée par une addition d'un revêtement de PEG à la surface des certains nanomatériaux. L'introduction des chaînes de polymère hydrophile biocompatible comme les PEG créent un revêtement hydrophile qui améliore la solubilité des nanoparticules. Par la suite Le PEG augmente d'une façon considérable la demi-vie de tous les nanomatériaux indépendamment de la charge de surface [225].

La charge de surface des nanoparticules peut affecter la liaison des protéines sériques et l'adhésion non spécifique aux cellules. Dans une autre étude, il a été démontré que les

nanoparticules chargées positivement ont montré une activité hémolytique dépendante de la dose et une cytotoxicité contre les cellules RAW 264,7 proportionnelle à la densité de la charge de surface positive, alors que les nanoparticules chargées négativement n'ont pas montré une activité hémolytique et des propriétés cytotoxiques évidentes [226].

III. Formation et caractérisation des nanoparticules de PDMMLAH_{30-co-Hex}₇₀ (P1') et PDMMLAH_{30-b-Hex}₇₀ (P4'):

L'analyse des images obtenues en microscopie électronique à transmission (MET), a montré des formes bien sphériques avec une distribution homogène pour le P1' et le P4', en plus, leur caractère hydrophobe dominant (30% acide et 70% hexyl) peuvent garantir une meilleure encapsulation et un temps de libération contrôlée plus important ou alors une vitesse ou cinétique de libération plus lente. Par conséquent ces deux copolymères ont été choisis pour une étude comparative.

1. Optimisation du pourcentage d'encapsulation avec le (P1') en déterminant l'efficacité d'encapsulation (EE):

Il a été démontré que plusieurs facteurs déterminent l'efficacité d'encapsulation d'un principe actif, comme la polarité et la structure chimique du principe actif. Dans ce sens, les principes actifs hydrophobes ont montré une efficacité d'encapsulation plus élevée (supérieure à 70%) [227][228].

Donc quatre pourcentages de la warfarine par rapport à la masse de copolymère (P1') ont été testées afin de déterminer le pourcentage donnant l'efficacité d'encapsulation (EE) la plus importante.

Les résultats donnés par RP-HPLC sont donnés ci-dessous:

EE (1%)= 87%

EE (3%)=95%

EE (6%)=91%

EE (10%)=84%

Le pourcentage de 3 % a donc permis d'obtenir le meilleur pourcentage d'encapsulation de la warfarine et par conséquent a été choisi pour la suite de l'étude.

2. Détermination de la forme des nanoparticules de P1' et P4' avec 3% de la warfarine par MET:

Une nanoprécipitation de P1' et P4' a été effectuée avec 3% de la warfarine pour former des nanoparticules de P1' (W-NP1') et de P4' (W-NP4') avec des EE assez importantes: EE. W-NP1' (3%) = 94% et EE. W-NP4' (3%) = 92%.

La forme des W-NP1' et de W-NP4' a été déterminée par une MET (**Figure 36**).

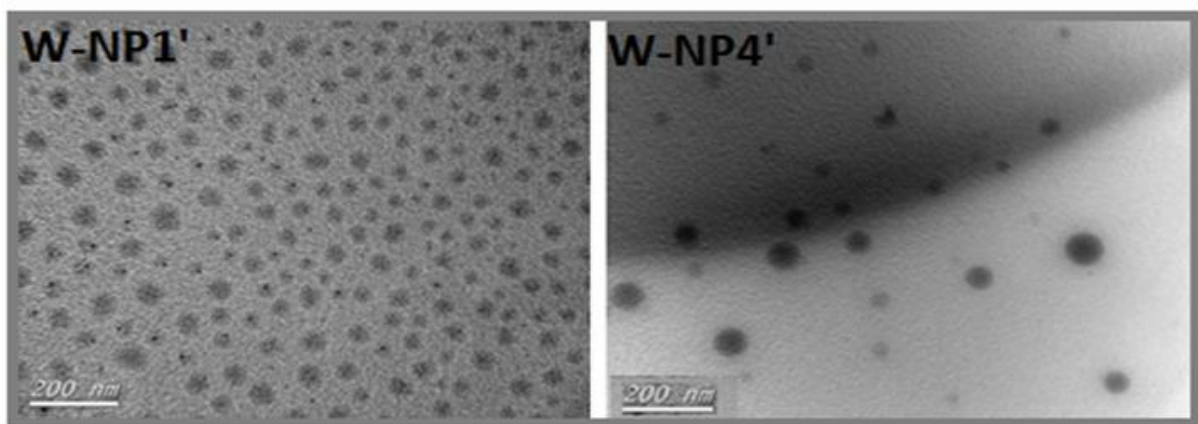


Figure 36 : Aspect des nanoparticules de copolymère statistique P1' (A) et copolymère à bloc P4' (B) chargées avec 3% de la warfarine en MET

Donc d'après les résultats obtenus, des distributions homogènes sont observées en microscopie électronique à transmission (MET) pour les nanoparticules de W-NP1' et de W-NP4', outre la géométrie sphérique bien définie et régulière pour les deux types de nanoparticules de PDMMLA avec une taille de 50 à 60 nm.

D'autre côté, le **Tableau 8** récapitule les résultats obtenus par DLS pour les nanoparticules des deux copolymères vides et chargés avec le principe actif par rapport à la taille et la charge de surface ainsi que le PDI. En effet, une légère différence est observée pour la taille des nanoparticules vides de P1' (80 nm) par rapport à celles de P4' (111 nm) alors qu'avec la charge de surface il n'y a pas de différence significative observée: -62 mV pour les nanoparticules vides de P1' et -60 mV pour celles de P4' dans les mêmes conditions.

Tableau 8: Tableau comparatif entre les nanoparticules vides (NP1 et NP4) et avec un pourcentage de warfarine (W-NP1' et W-NP4') : en taille, charge de surface (potentiel zêta) et l'indice de polydispersité (PDI) dans une solution d'NaCl (1 mM).

Nanoparticules	Taille (nm)	PDI	Potentiel Zeta (mV)
NP1' vides	80	0,2	-62
NP4' vides	111	0,3	-60
W-NP1'	77	0,1	-50
W-NP4'	93	0,1	-65

Pour les nanoparticules des deux polymères P1' et P4' contenant 3% de warfarine, nous avons trouvé des tailles de 77 nm et de 93 nm ainsi que des charges de surface respectives de -50 mV et -65 mV. Les valeurs ainsi obtenues sont en faveur d'une stabilité satisfaisante des suspensions nanoparticulaires obtenues pour P1' et P4'. L'ajout de surfactants pour stabiliser ces suspensions nanoparticulaires pour éviter la formation des agrégats nanoparticulaires n'est donc pas nécessaire dans ces conditions.

Toutes les valeurs de PDI étaient inférieurs à 0,3 ce qui reflète une distribution relativement monodisperse de chacune des suspensions nanoparticulaires que nous pouvons aussi observer dans la **Figure 37** qui montre des courbes de distribution de taille et de potentiel zêta bien régulières et bien homogènes. Les mêmes observations étaient constatées en comparant les nanoparticules vides et avec 3% de la warfarine entre-elles pour chaque copolymère.

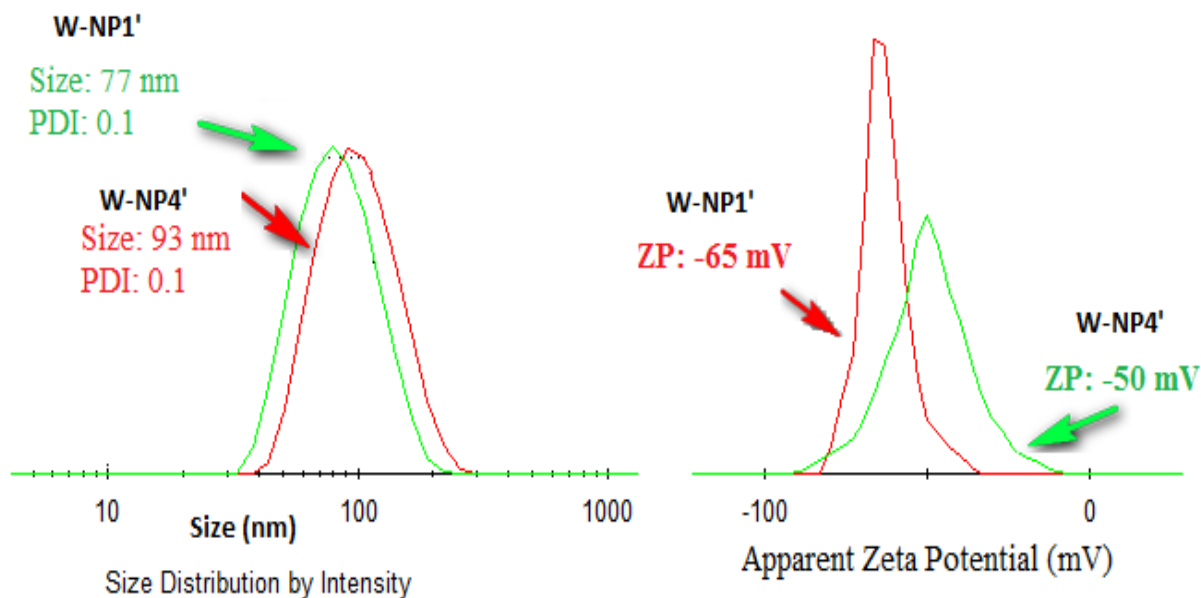


Figure 37 : Comparaison de la taille (A) et du potentiel zêta (B) des nanoparticules de P1' et P4'

IV. La libération contrôlée de la warfarine de P1' et P4':

Rappelons que pour étudier le profil de libération de la warfarine, à des intervalles réguliers, un volume précis d'échantillon (1 mL) est prélevé après centrifugation des suspensions de nanoparticules. Ce volume prélevé est remplacé par le même volume du tampon. La cinétique a été effectuée sur 28 jours. Un prélèvement des échantillons est effectué tous les 2 ou 3 jours et ces échantillons prélevés sont conditionnés avec le solvant d'HPLC après une filtration.

Donc, les nanoparticules chargées en principe actif (W-NP1' et W-NP4') sont incubées à 37 °C dans du tampon phosphate (pH 7,4) afin de pouvoir contrôler leur libération en fonction du temps.

La libération contrôlée *in vitro* de la warfarine est déterminée grâce au calcul de la masse libérée de cette dernière durant une période de temps bien déterminée (4 semaines).

Par conséquent, la libération contrôlée nous a permis de doser la quantité de principe actif libérée dans le surnageant au cours de processus de la dégradation de nanoparticules par RP-HPLC

Nous avons pu ainsi déterminer la quantité de la warfarine libérée pendant 28 jours, qui est égale à 1,12 mg pour W-NP1' (courbe B) et 0,83 mg pour W-NP4' (courbe A) ce qui correspond respectivement à 47% et 38% de la masse totale introduite de la warfarine.

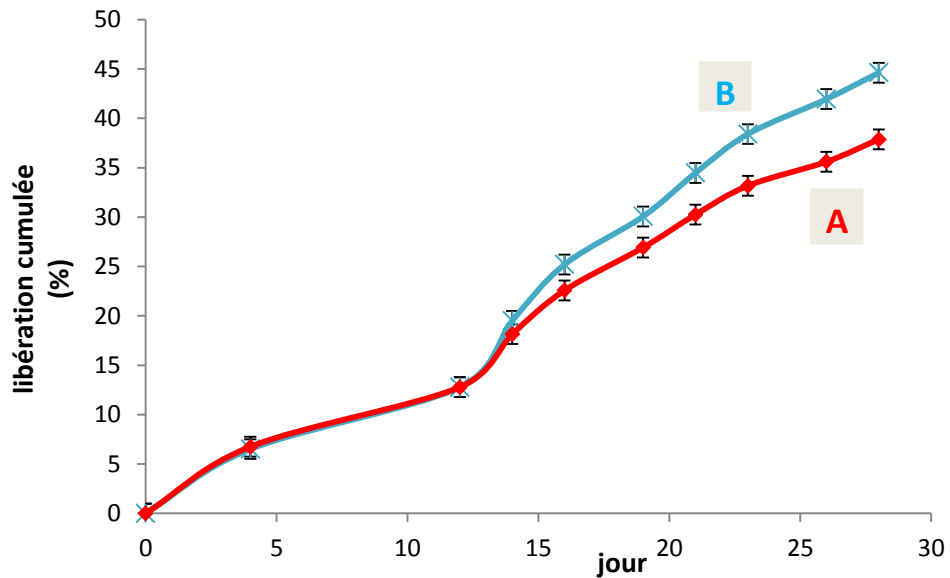


Figure 38: Profils de la libération contrôlée de la warfarine pour le W-NP1'(B) et le W-NP4'(A) sur 4 semaines

Les résultats de la libération contrôlée sont donnés dans la **Figure 38** ci-dessus, représentant le pourcentage cumulé de la warfarine pour chaque copolymère.

La **figure 38** permet d'observer un profil de libération similaire pour chacun des copolymères, ce profil est marqué par une absence de la libération brutale du principe actif, communément appelé le "burst release". Ce phénomène de burst release est expliqué par la fixation du principe actif à la surface des nanoparticules et non à l'intérieur de cette dernière, ce qui engendrerait sa libération rapide sous forme de burst. Dans notre cas le «burst release» n'est pas observé, par contre une libération lente et croissante est observée au cours du temps. Cette courbe de libération est expliquée par la bonne voie d'encapsulation : le principe actif est fort probablement encapsulé à l'intérieur des nanoparticules. Ce profil est très avantageux pour une libération lente et à moyen terme d'un principe actif quelconque.

En se basant sur la littérature et sur les base de travaux antérieurs, la libération des agents thérapeutiques est effectuée sur des jours voire des mois de manière dépendante de la structure du polymère et de sa cinétique de dégradation [211].

Le maintien de la concentration du principe actif à des niveaux thérapeutiques dans le plasma pour une période prolongée est actuellement un défi. Ce défi a comme but de réduire ainsi la fréquence d'administration des vecteurs polymériques portant les principes actifs [211].

En effet la cinétique de libération du principe actif du système de libération est contrôlée par les mécanismes d'érosion et/ou de diffusion, qui sont tous les deux dépendants des caractéristiques du polymère. Ces mécanismes de libération sont affectés par la vitesse de dégradation du polymère [229][230]. En effet la stabilité des principes actifs encapsulés dépend ainsi de la vitesse de transfert par diffusion dans le milieu aqueux. Ce phénomène est éventuellement dépendant de coefficient de partage du principe actif entre la particule et le milieu aqueux [231].

Une autre étude a démontré que les petites particules ont révélé une absorption intracellulaire plus élevée que celles ayant une taille plus importante dans un modèle de culture cellulaire *in vitro* à côté de sa vitesse de dégradation assez importante.

Ce phénomène est expliqué par Panyam et al. Lorsque la taille de la particule diminue, la surface disponible pour une pénétration du tampon dans les particules augmente facilitant ainsi, l'évasion des produits de dégradation du polymère de plus petites nanoparticules. Cependant *in vitro* des résultats contradictoires sont rapportés : une surface large des nanoparticules conduit à une libération plus importante de principes actifs encapsulés. Cette observation est confirmée déjà par Dunne et al qui ont démontré la vitesse élevée de dégradation des polymères ayant une taille importante par rapport aux plus petites.

Pour rappel, une augmentation de la taille ainsi que de la charge de surface a été observée tout au long de l'étude.

Cette augmentation de la taille a continué jusqu'à la fin de l'étude pour obtenir finalement des nanoparticules avec des tailles plus importantes : 120 nm pour P1' et 145 nm pour P4' ainsi que des charges de surface respectives plus élevées : -21 mV et -28 mV.

Ce profil d'évolution est supposé dû à l'agrégation des nanoparticules. En effet les nanoparticules s'agglomèrent et la charge de surface augmente parce que les groupements carboxylates -COO- qui offrent la charge négative aux nanoparticules deviennent pour une grande partie dissimulés à l'intérieur des agrégats. Nous pourrions aussi penser que la dégradation progressive des polymères libérant de l'acide diméthylmalique conduit à une

acidification progressive du milieu et donc à la production de groupements carboxyliques sous forme protonée -COOH et au masquage des charges négatives.

De plus, et pour une analyse plus précise de la cinétique de libération, le profil lent et stable de la libération de la warfarine se fait pendant les deux premières semaines avec une accentuation du phénomène observable à partir du 12^{ème} jour. Il s'agit toutefois dans l'ensemble, rappelons-le, d'une libération lente et progressive tout au long de la période d'étude.

Selon les données de la littérature, PLGA et PLA sont les polymères les plus utilisés.

Toutefois ces polymères présentent quelques inconvénients. L'inconvénient majeur du PLGA est essentiellement la stabilité des principes actifs pendant les étapes de la préparation et le stockage dû à la nature de catalyseurs acides de ses produits de dégradation, ce qui affecte la stabilité des principes actifs conduisant à son incomplète libération [232].

En plus le profil de libération des principes actifs via le PLGA se fait en 3 phases (triphase) : une libération brutale élevée (burst release) au début, une phase de latence et finalement une phase de libération imposée par l'érosion du polymère [233] [234].

Par ailleurs, le PLA, le poly (D, L-lactide) nécessite 12 à 16 mois pour être complètement dégradé et le poly (L-lactide) qui est moins hydrophile et plus cristallin peut être trouvé in vivo même au bout de 1,5 à 2 ans. Les polymères du PLA sont actuellement utilisés pour des implants contraceptifs, des vis, des sutures résorbables et les implants osseux. Ils peuvent être utilisés aussi comme des matériaux implantables pour des organes artificiels et plus récemment comme supports de biomatériaux en ingénierie tissulaire [235].

V. Evaluation de l'effet biologique de 2,5-dichlorophényl-6-(chlorométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (DCBC):

1. Caractérisations de dérivé coumarinique:

Les résultats observés par la spectrophotométrie, ont montré que le dérivé coumarinique absorbe à une longueur d'onde égale à 290 nm, valeur choisie pour une étude ultérieure de sa cinétique de libération contrôlée à partir de systèmes nanoparticulaires semblables à ceux de la warfarine (**Figure 39**).

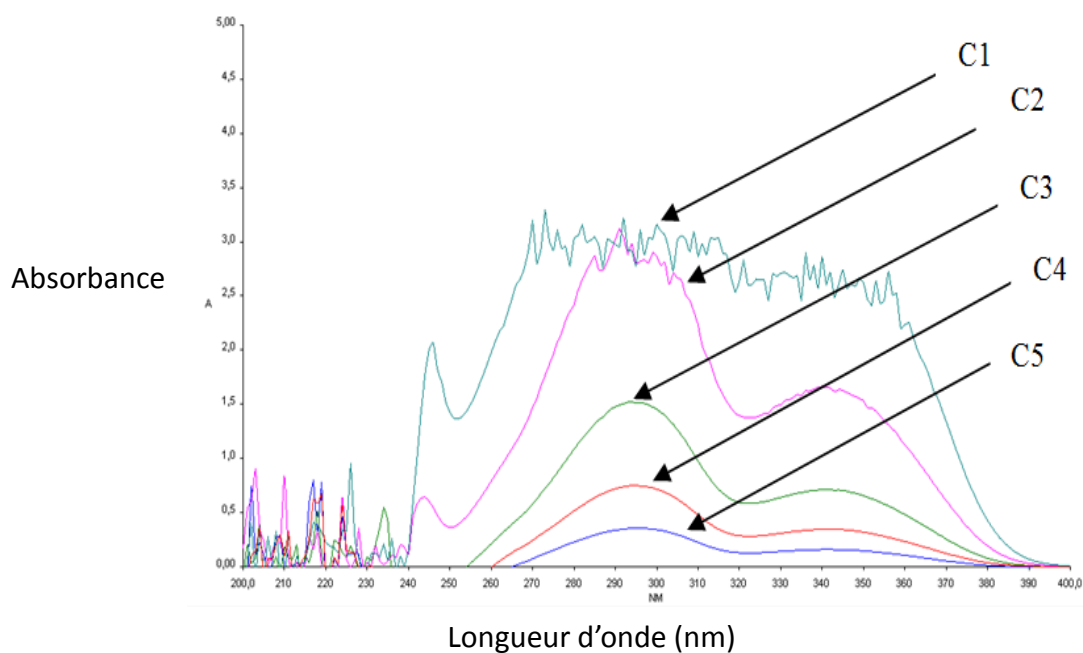


Figure 39: Détermination de la longueur d'onde de dérivé coumarinique : C1= 1g/mL, C2=0,1mg/ml, C3=0, 2 mg/ml, C4=0, 04 mg/mL, C4=0,02 mg/ml et C5=0,01mg/ml

D'autre part, la phase mobile contenant 80% ACN et 20% eau a été choisi pour doser le dérivé coumarinique. En effet cette phase a donné le meilleur pic et la meilleure séparation de dérivé coumarinique par rapport a celles constituées de 50/50, 60/40, et 70/30. Le temps d'éluion de dérivé coumarinique était 8,6 min avec le débit de 1 mL/min et de 4,3 min pour celui de 0,5 mL/min (**Figure 40**)

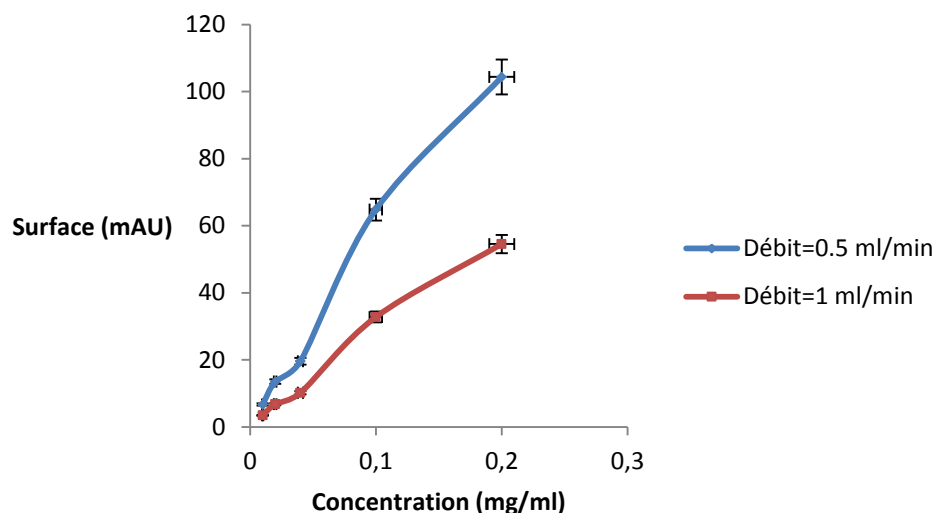


Figure 40: Comparaison de la surface de pic de dérivé coumarinique en fonction de la concentration et avec un débit de 0,5 et 1 mL/min

A partir de toutes ces données, une droite d'étalonnage avec les concentrations de dérivé coumarinique est élaborée (**Figure 41**)

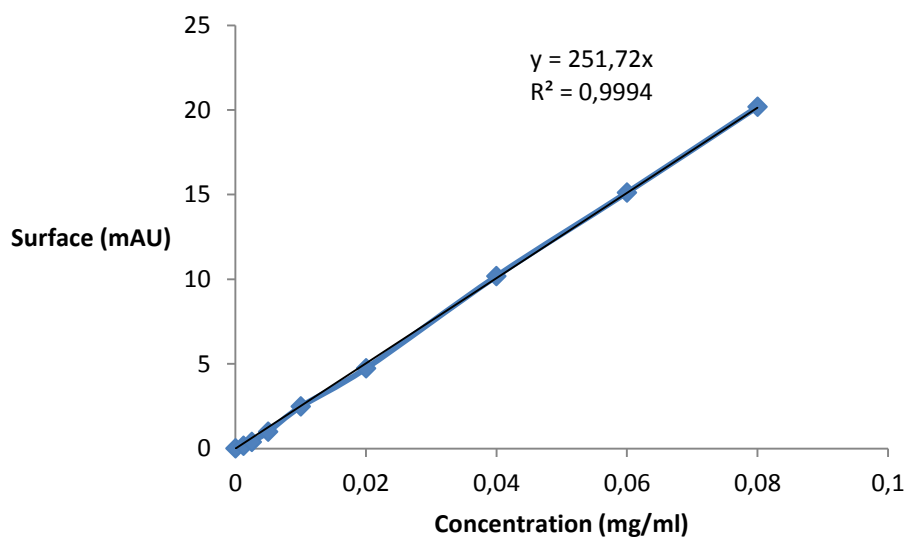


Figure 41: Droite d'étalonnage de dérivé coumarinique

Donc à partir de cette droite on peut pouvoir déterminer la concentration de dérivé coumarinique libérée à une étape ultérieure.

2. Evaluation de l'activité antithrombine en système purifié :

L'activité anticoagulante du DCBC a été évaluée au moyen de la mesure de son activité anticoagulante en système purifié puis au moyen de trois tests coagulométriques, le temps de Quick (TQ), le temps de céphaline activé (TCA) et le temps de thrombine (TT) en comparaison avec l'argatroban.

Le mécanisme d'action mis en jeu par le DCBC et l'argatroban vis-à-vis de la thrombine n'est pas le même. En effet pour le DCBC, le carbonyle de la lactone est attaqué par la Ser195 nucléophile. L'ouverture subséquente du cycle de la lactone conduit à une augmentation des propriétés de départ de l'atome de chlore et à la formation d'une quinone méthide électrophile dans le site actif. (Figure 42 DCBC voie a). Ce dernier composé peut alors former une liaison covalente avec un résidu nucléophile dans le site actif. Parallèlement la désacylation par l'eau de l'enzyme acyle peut restaurer l'activité enzymatique (Figure 42 DCBC voie b). Pour l'argatroban, le groupement arginine se fixe réversiblement sur le site actif de la thrombine ce qui inhibe par la suite son activation (Figure 42).

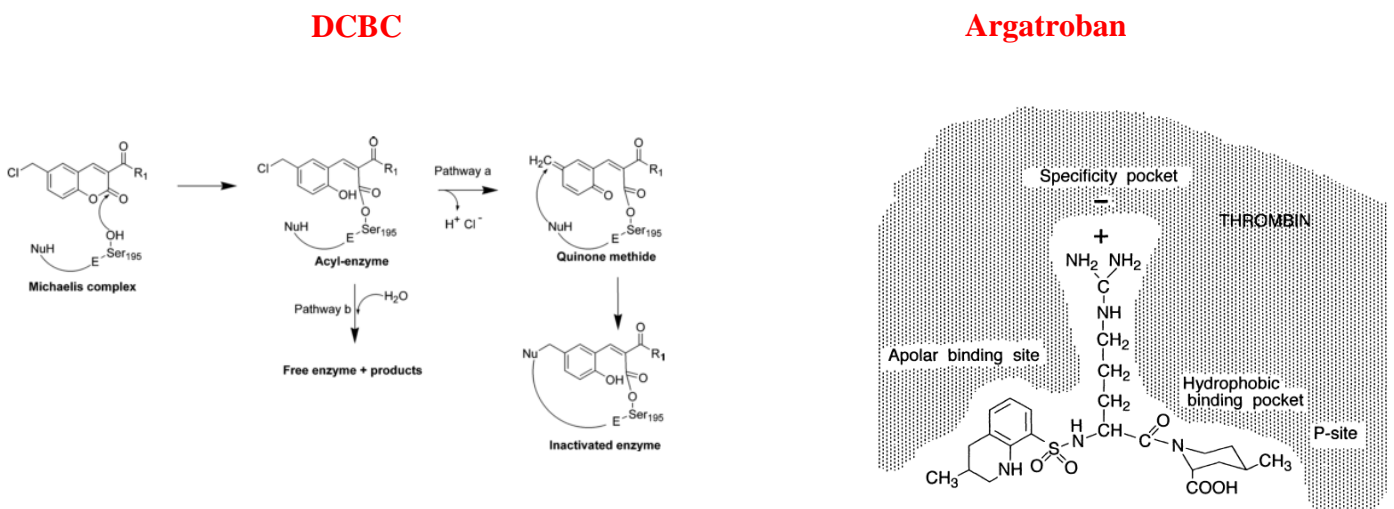


Figure 42: Mécanisme d'action de DCBC et de l'argatroban (Frédéric R [66])

Donc à partir des résultats de l'IC₅₀ (concentration inhibant la moitié de la thrombine ajoutée) déterminées dans un système purifié, les figures 43 et 44 montrent une diminution du

pourcentage de thrombine résiduelle de manière linéaire concentration-dépendante est observée.

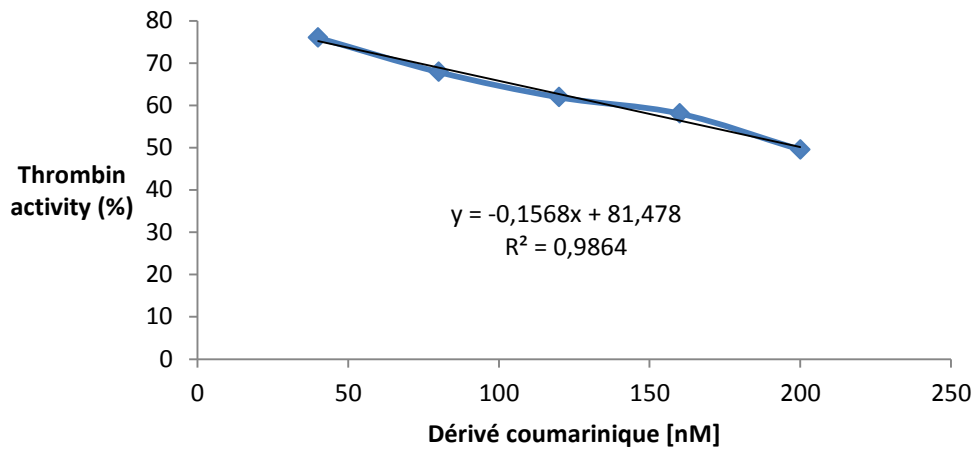


Figure 43: Thrombine résiduelle en fonction de la concentration de dérivé coumarinique.

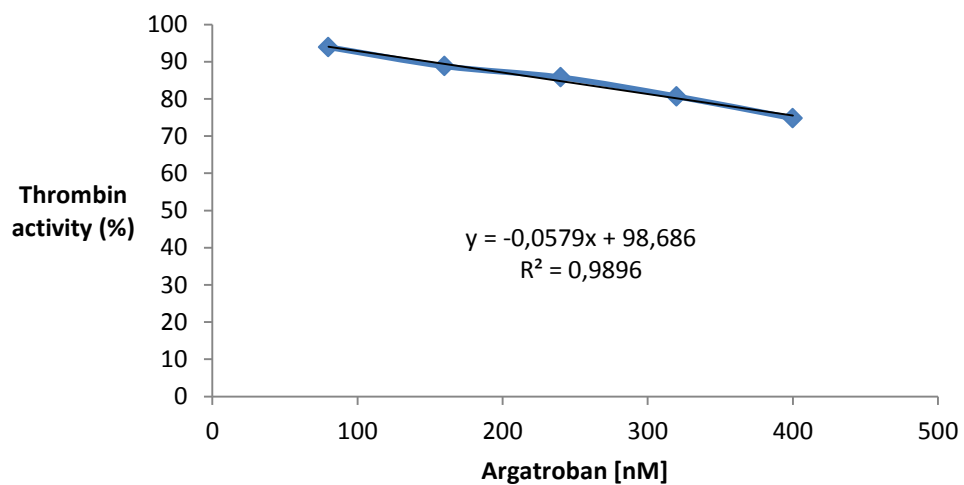


Figure 44: Thrombine résiduelle en fonction de la concentration de l'argatroban

Cette diminution, est toutefois beaucoup plus marquée pour le DCBC par rapport à l'argatroban, pour lequel la valeur de l' IC_{50} est égale à 200 nM (**Figure 43**). En revanche, en ce qui concerne l'argatroban, il n'est pas possible de déterminer directement l' IC_{50} à partir des résultats expérimentaux obtenus dans la gamme de concentrations utilisée. Néanmoins, en

supposant que la diminution de la thrombine résiduelle demeure linéaire, pour des concentrations plus importantes d'argatroban, nous pouvons, par extrapolation déterminer une IC_{50} de 840 nM (**Figure 44**). Dans ces conditions, et dans l'hypothèse d'une linéarité du phénomène observé, le dérivé coumarinique serait dans ces conditions plus efficace que l'argatroban en tant qu'inhibiteur de la thrombine, bien que les mécanismes d'inhibition mis en jeu soient différents. Ces résultats sont relativement en contradiction avec ceux trouvés par Frederick et al. dans leur étude, dans laquelle les valeurs de l' IC_{50} étaient 103 nM pour le dérivé coumarinique et de 331 nM pour l'argatroban [66].

3. Les tests coagulométriques:

Les résultats de tests coagulométriques ont été illustrés dans les figures ci-dessous, en effet, la **Figure 45** ne montre pas un allongement du TQ par rapport au temps témoin, usuellement situé entre 11 et 13 secondes, pour le dérivé coumarinique, de la plus petite dans la gamme étudiée (80 nM) à la concentration la plus élevée (400 nM). Cependant, en ce qui concerne l'argatroban, un allongement du TQ concentration dépendant est observé à partir d'une concentration de 80 nM. L'argatroban possède donc dans ces conditions, sur plasma sanguin, un effet anticoagulant augmentant en fonction de la concentration de l'inhibiteur. En revanche, le DCBC ne semble pas posséder d'effet anticoagulant dans ces conditions.

La **Figure 46** montre des résultats similaires, l'argatroban allongeant le TCA de manière concentration-dépendante et non le DCBC. Les valeurs du TCA restent, pour les différentes concentrations du DCBC, confinées dans l'intervalle de valeurs normales du temps témoin (entre 25 et 39 secondes). Pour l'argatroban, en revanche, un allongement très significatif de 63 secondes à partir de 80 nM jusqu'à une valeur de 147 secondes pour la concentration la plus élevée (400 nM).

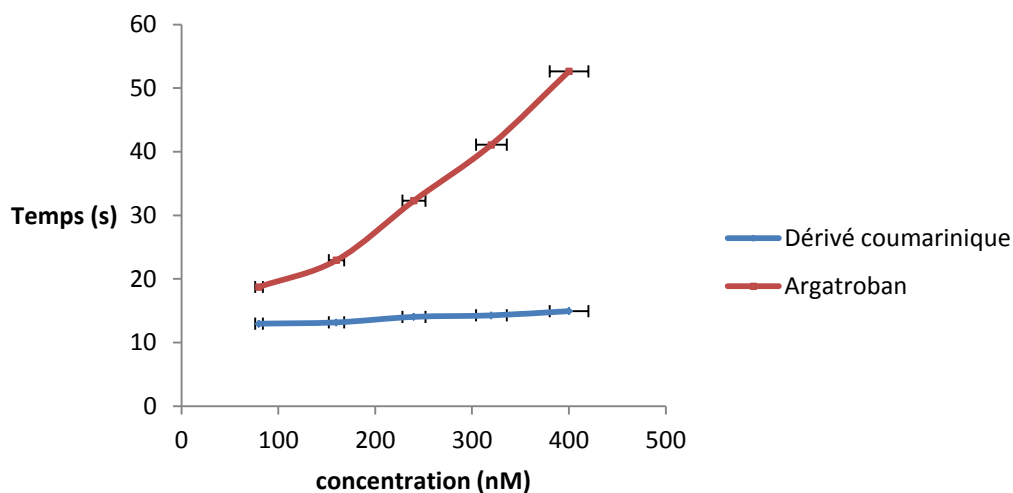


Figure 45: TQ en fonction de la concentration du dérivé coumarinique et de l'argatroban

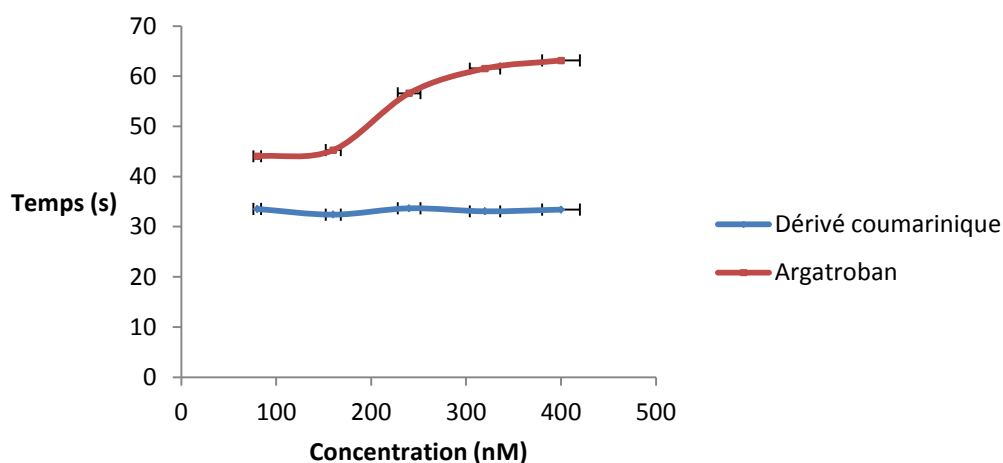


Figure 46: TCA en fonction de la concentration du dérivé coumarinique et de l'argatroban

En ce qui concerne le temps de la thrombine (TT), la **Figure 47** ne montre pas d'allongement non plus du TT par rapport aux valeurs normales du temps témoin entre 22 secondes et 23 secondes, à l'inverse de l'argatroban, pour lequel un allongement concentration dépendant du TT est observé à partir de 20, 40, 60, 80, et 100 nM.

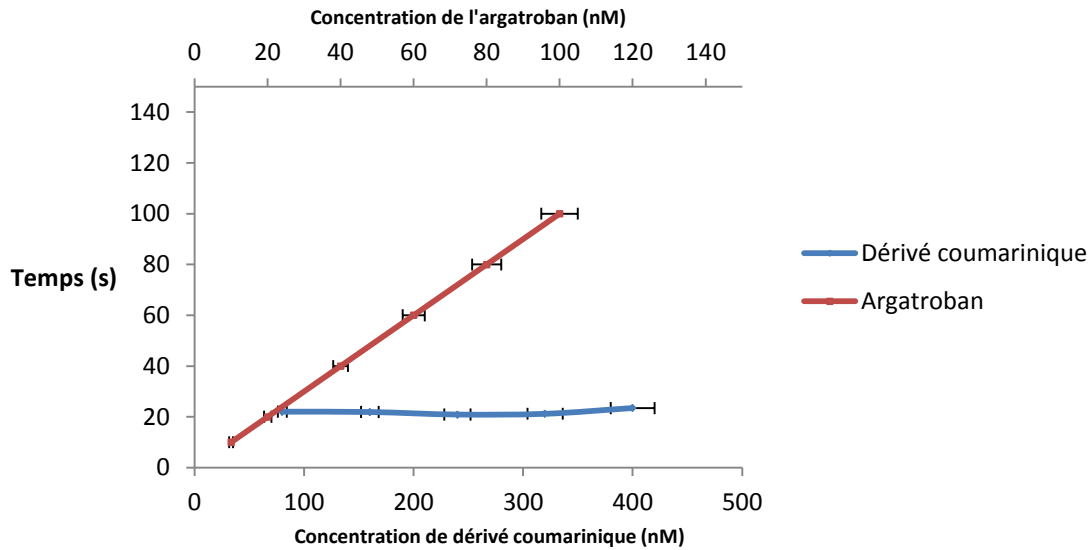


Figure 47: TT en fonction de la concentration du dérivé coumarinique et de l'argatroban

Donc d'après les résultats des tests coagulométriques, le dérivé coumarinique DCBC ne semble avoir aucun effet sur les temps de coagulation TQ, TCA et TT contrairement à l'argatroban pour lequel nous avons observé un allongement du temps de coagulation dans les différents tests. Le DCBC ne semble donc pas avoir d'effet anticoagulant sur plasma sanguin en dépit de l'effet antithrombine important observé en système purifié, supérieur à celle de l'argatroban.

L'ensemble de ces résultats émet l'hypothèse que notre dérivé coumarinique, bien que très actif vis à vis de la thrombine en système purifié, ne serait donc pas capable d'interagir de manière spécifique avec le site actif de la thrombine. Ainsi, l'absence d'effet anticoagulant dans les tests coagulométriques effectués sur plasma sanguin serait due à une fixation non spécifique et massive des molécules de DCBC sur des ligands plasmatiques autres que la thrombine.

Par conséquent, l'utilisation de systèmes nanoparticulaires tels que ceux utilisées pour la coumarine modèle, la warfarine, permettrait à la fois de réduire les difficultés liées à l'absence de spécificité du DCBC et d'augmenter éventuellement sa biodisponibilité

Conclusion générale

Dans ce travail, nous présentons un exemple d'application de dérivés de PDMMLA synthétiques dans le domaine biomédical. En effet, les nanoparticules à base de polymère offrent des opportunités potentielles d'adapter de nombreux matériaux biologiquement actifs, tels que les médicaments.

La Warfarine, un médicament hydrophobe, a été encapsulée avec succès, à la fois avec des nanoparticules en utilisant la méthode de nanoprécipitation avec une efficacité élevée d'encapsulation avec le PDMMLAH_{30-co}-Hex₇₀ et le PDMMLAH_{30-b}-Hex₇₀. En fait, la livraison d'un tel agent thérapeutique par des nano-vecteurs visant à améliorer leur biodisponibilité et leur efficacité, à minimiser leurs effets toxiques et secondaires, à assurer leur libération prolongée, à surmonter les obstacles biologiques à cibler les sites d'action spécifiques et à contrôler leur libération, a été et reste un formidable défi.

Les Nanoparticules formées par des copolymères statistiques et à blocs amphiphiles dérivés du polymère PDMMLA sont potentiellement des excellents supports pour les molécules hydrophobes, grâce à leur propriété de biodégradation et leur capacité à encapsuler un tel médicament hydrophobe. Les dérivés du PDMMLA sont des nouveaux polyesters amphiphiles très prometteurs. En effet, les copolymères amphiphiles sont constitués d'une partie hydrophobe et d'une partie hydrophile et forment des systèmes très efficaces utilisés comme vecteurs pour la libération des principes actifs grâce à leur versatilité de synthèse qui permet d'ajuster leur balance hydrophobe/hydrophile. Cette modulation se fait au cours de leur synthèse en jouant d'abord sur le choix du monomère et sur le pourcentage de ce dernier. Par conséquent des polyesters amphiphiles, hydrophobes, hydrophiles ou aussi neutres peuvent être obtenus. En plus, les dérivés du PDMMLA peuvent être synthétisés avec des masses moléculaires bien déterminées par une polymérisation anionique par ouverture de cycle. Cette polymérisation a permis d'avoir soit des longues chaînes de copolymère avec une masse moléculaire assez élevée en choisissant un rapport amorceur/monomère = 10^{-3} ou des courtes chaînes de ces derniers avec une faible masse moléculaire en choisissant le rapport amorceur/monomère = 10^{-2} .

Grace à cette polymérisation, deux types de copolymères ont été obtenus : les copolymères statistiques et les copolymères à blocs. Avec les copolymères statistiques, trois copolymères ont été synthétisés avec des différentes proportions de la lactone benzylique et de la lactone hexylique. Les mêmes proportions sont utilisées pour synthétiser les copolymères à blocs.

A partir de ces copolymères, des nanoparticules ont été préparées par nanopréciipitation. Cette méthode est simple à mettre en œuvre, rapide et efficace particulièrement pour l'encapsulation des principes actifs hydrophobes comme la warfarine.

La formulation des nanoparticules est optimisée afin d'obtenir une meilleure encapsulation, une bonne stabilité et une libération contrôlée du principe actif. Des nanospheres seront formées avec les copolymères statistiques (warfarine dispersée dans la matrice copolymère) et des nanoparticules en cœur couronne avec les copolymères à blocs (warfarine dispersée dans un cœur hydrophobe et protégée par une couronne hydrophile).

Enfin, les caractéristiques des nanoparticules sans et avec le principe actif ont été mises en évidence par différentes techniques physico-chimiques. La forme des nanoparticules a été déterminée par la Microscopie Electronique à Transmission (MET), la taille et la charge de la surface en mesurant le potentiel zêta par la Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS). La libération contrôlée de la warfarine est suivie par la Chromatographie Liquide à Haute Performance en Phase Inverse (RP-HPLC) dans des conditions proches de la normale (Tampon phosphate pH= 7,4, température =37 °C et sous agitation).

Article dans RSC Advances

Résumé

Dans cette publication, six copolymères de la famille de poly(acide (*R,S*)-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA) ont été synthétisés, avec différentes proportions de monomères benzylique et hexylique respectivement : 30/70, 50/50 et 70/30. Ces copolymères ont été caractérisés afin de déterminer leurs propriétés physicochimiques. A partir de ces copolymères, des nanoparticules ayant des propriétés bien déterminées ont été formées par une nanopréciipitation. Après la caractérisation de ces dernières, deux types de nanoparticules issues de deux copolymères de PDMMLA : le PDMMLAH_{30-*b*}-Hex₇₀ et le PDMMLAH_{30-*co*}-Hex₇₀ ont été choisis pour encapsuler un principe actif hydrophobe : la warfarine.

Les nouvelles nanoparticules chargées de la warfarine ont été caractérisées afin de déterminer leurs formes, tailles et charges de surface. Ensuite une étude de libération contrôlée de ce principe actif est menée dans des conditions physiologiques pendant quatre semaines. En effet la libération contrôlée d'un tel principe actif est primordiale pour déterminer le profil de délivrance de ce dernier soit *in vitro* ou *in vivo* étant donné que l'objectif principal pour une encapsulation d'un principe actif et l'étude de sa libération peuvent nous renseigner sur la période nécessaire pour sa libération complète ou partielle, la cinétique de sa libération et aussi la cinétique de la dégradation du copolymère.

Donc avec la warfarine encapsulée dans les nanoparticules de dérivé PDMMLA, un profil de libération lent et progressif est obtenu pour les deux types de nanoparticules au bout de 28 jours. Les nanoparticules de PDMMLAH_{30-*b*}-Hex₇₀ ont libéré 47% de sa contenance en warfarine alors que les nanoparticules de PDMMLAH_{30-*co*}-Hex₇₀ ont libéré 38% de la masse totale de la warfarine introduite. L'absence de la phase de burst release est observée, cette phase est caractérisée par une libération massive du principe actif dans un court délai. Ce profil de libération est avantageux et ouvre des perspectives pour élargir l'application de ces nanoparticules dans d'autres applications médicales.



CrossMark
click for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2017, 7, 6704

Synthesis of nanoparticles based on PDMMLA derivative copolymers and study of warfarin encapsulation and controlled release†

Inès Msolli,^{ab} Rima Belibel,^a Frédéric Chaubet,^a Raoui Mounir Maaroufi^b and Christel Barbaud^{*a}

Poly(*(R,S)*-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA) copolymers were synthesized by anionic ring opening polymerization of benzylic and hexylic lactones. The PDMMLA copolymer family has biodegradable and biocompatible properties of interest as nanoparticles (NPs) can be formed from PDMMLA derivatives. For this purpose, three statistical copolymers (PDMMLAH₃₀-*co*-Hex₇₀, PDMMLAH₅₀-*co*-Hex₅₀ and PDMMLAH₇₀-*co*-Hex₃₀) and three block copolymers (PDMMLAH₃₀-*b*-Hex₇₀, PDMMLAH₅₀-*b*-Hex₅₀ and PDMMLAH₇₀-*co*-Hex₃₀) were synthesized and characterized. The main objective of the present study was to formulate new PDMMLA derivative NPs with defined size and shape that can efficiently be used as a novel controlled delivery system for a hydrophobic antithrombotic drug: warfarin. Polymeric NPs were prepared by nanoprecipitation method, optimized and characterized by Transmission Electronic Microscopy (TEM) for morphology investigation and Dynamic Light Scattering (DLS) for size and surface charge analysis. Controlled release of the drug is followed by reverse phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for four weeks in phosphate buffer at pH = 7.4.

Received 18th November 2016
Accepted 11th January 2017

DOI: 10.1039/c6ra27015h

www.rsc.org/advances

Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the main cause of mortality worldwide with more than 17 million annual deaths. In addition, global cardiovascular deaths are expected to raise to more than 23 million by 2030.¹ Cardiovascular death is often related to acute myocardial infarction or strokes that are mostly the consequence of an underlying atherosclerotic process.² Atherosclerosis is a chronic inflammatory response in the arterial vessel wall leading to thrombosis formation which is an inappropriate clot formation within intact vascular structure.³

Two classes of anticoagulants agents were deeply investigated: antithrombotic and antiplatelet molecules that inhibit the formation and growth of thrombi. Most of the anticoagulant drugs are characterized by a limited therapeutic efficacy because of their hydrophobic nature.⁴ Coumarinic derivatives are a part of these drugs, they are natural⁵ or synthetic molecules⁶ belonging to the benzopyrones family⁷ and recognized for their great importance in medicine.⁸ However they present two

major limitations: narrow therapeutic index and a highly fluctuating dose–response relation.^{9,10}

Warfarin is an oral anticoagulant drug, also known as coumadin representing the most common coumarinic derivatives in medicine.¹¹ It's the most widely common anticoagulant as it effectively prevents thrombosis and thromboembolism formation in many diseases.¹² It acts as a vitamin K antagonist that inhibit reduction of vitamin K-2,3-epoxide to vitamin K thus disrupting synthesis of vitamin K dependent coagulation factors: II, VII, IV and X. Warfarin suffers from difficult clinical management because of a narrow therapeutic range and considerable interpatient variability. This may lead to severe bleeding that can be life-threatening.^{11,13,14} The controlled delivery of warfarin performed with adequately build nano-systems would greatly limit these drawbacks.

Poly(lactic acid) (PLA) and poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL) are among the most successfully developed polymers in the field of medicine due to their attractive properties: (i) biodegradability and biocompatibility, (ii) Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) approval in drug delivery systems for parenteral administration, (iii) well described formulations and methods of production adapted to various types of drugs, (iv) protection of drug from degradation, (v) possibility of sustained release, (vi) possibility to modify surface properties to provide stealth, better interaction with specific organs or cells.^{15–17} PLA/PLGA-based NPs are currently studied to increase the efficacy of treatments of cancer, inflammatory diseases, cerebral and

^aINSERM U1148, Laboratory for VascularTranslational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse, F-93430, France. E-mail: barbaud@univ-paris13.fr; Fax: +33 149403083; Tel: +33 149403357

^bLaboratory of Genetic, Biodiversity, and Bioresources Valorisation, Université de Monastir, Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Avenue Taher Haddad (Bp 74), Monastir 5000, Tunisia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6ra27015h



cardiovascular diseases, infection and diabetes, because of the sustained release of the therapeutic agent from stable NP by improving pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles.¹⁸

Anyway, the design of a nanosystem based on biocompatible functional polymers dedicated to the delivery of a particular drug still remains challenging.¹⁹

In this study, we have synthesized and characterized poly((*R,S*)-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA), new functional polyesters shaped as nanoparticles for the delivery of warfarin.

PDMMLA derivatives are obtained by anionic ring opening polymerization of racemic lactones prepared in few steps from diethyl oxalpropionate.²⁰ PDMMLA derivatives based NPs are formed by nanoprecipitation method and were characterized to determine its shape, size and surface charge properties (see ESI Fig. S1†). Warfarin which is a hydrophobic drug was encapsulated and its controlled release was followed by RP-HPLC.

Experimental

Chemicals

Warfarin and phenylbutazone were purchased from Sigma Aldrich Chemicals (St Quentin Fallavier, France).

All other solvents and chemical products were purchased from Carlo Erba (Chaussée du Vexin, France) and Sigma-Aldrich Analytical France (St Quentin Fallavier, France) and were used as received. Anhydrous THF was prepared by the distillation of THF on sodium-benzophenone and under N₂ atmosphere. Absolute EtOH was distilled over sodium under nitrogen atmosphere in order to prepare the initiator solutions. The later was dried under vacuum and N₂ atmosphere. All polymerization reactions were realized in anhydrous THF under nitrogen atmosphere. Acetonitrile (ACN) and phosphate buffer saline (PBS) (which prepared fresh daily) were HPLC grades. Deionised water was purified by using a Millipore Milli-Q® Integral System (Molsheim, France).

Physicochemical analysis

Molecular weight. Absolute average molecular weights and molecular weight distributions of PDMMLA copolymers were measured at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (HPSEC), multi-angle laser light scattering detector (MALLS) and a differential refractive index (dRI) detector. Acetone, used as solvent, was filtered using a 0.1 μm filter unit (Millipore, Billerica, USA), then thoroughly degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5 mL min⁻¹ flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). 100 μL of a 0.2 μm-filtered sample solution (at about 20 mg mL⁻¹) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The SEC line consisted of an OHPak SB-G guard column for protection and two OHPak SB-802.5 and-803 HQ columns (Showa Denko Europe, Munich, Germany) in series. The column packing was a poly(hydroxymethacrylate) gel. The MALLS detector, a DAWN HELEOS II from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA) was equipped with a fused silica cell and a Ga-As laser (λ = 665.8 nm). The whole collected data: light scattering (LS) and

dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method using angles between 53.1° and 140°. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of dn/dc (0.097 mL g⁻¹ in acetone and 0.05 mL g⁻¹ in THF).²¹

Glass transition temperatures. Glass transition temperatures (*T_g*) of copolymers were obtained using Differential Scanning Calorimetry (DSC). DSC was measured on a SDT Q600 analyser (TA instrument, Guyancourt, France). In a typical run, a copolymer sample was first put in the furnace and heated from -60 °C to 200 °C by means of a temperature ramp of 10 °C min⁻¹. This operation was repeated twice. *T_g* was determined from the inclination point of the second heating curve.

NMR. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on BRUKER AM-400 MHz spectrometer using CD₃COCD₃ as solvent and with the residual solvent signals as internal standard, unless otherwise indicated. Chemical shifts were given in ppm (δ) and coupling constants in Hz. The following abbreviations were used to describe the peak pattern: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet).

Infra red. IR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS) (Thermofischer, Voisin-le-Brettonneux, France).

Characterization of the NPs. The size of NPs was obtained by dynamic light scattering using Nanosizer (Malvern Instruments, Orsay, France). The size distribution was achieved by using the polydispersity index (PDI). Nanosizer also provided the zeta potential of NPs suspended in NaCl 1 mM to ensure standard and stable ionic strength. NPs external morphology was investigated by Transmission Electron Microscopy (TEM) using a JEOL JEM-2011 electron microscope at an operating voltage of 200 kV (Jeol Ltd., Japan). For TEM analysis, NPs sample drops were deposited onto a carbon coated copper grid support and kept drying at room temperature.

The Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) analytical system was constituted with a Purosphere®STAR endcapped RP-18 column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm, Merck, Darmstadt, Germany) used at room temperature with a mixture of ACN and PBS (40/60, v/v) at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The system included a Waters 2695 HPLC system (Milford, MA, USA) integrated with a column oven, an auto sampler, and a vacuum degasser. The detector was a Waters 2996 PDA detector (Milford, MA, USA). Empower Pro®5.0 software (Waters Corporation) monitored the equipment and allowed the treatment of the data.

PDMMLA synthesis and characterization

Synthesis of the monomers. PDMMLA monomers were synthesized according to previous protocols by Barbaud *et al.*^{20,22} (see ESI Text and Scheme S1†).

Synthesis of the polymers. A series of statistical and block copolyesters with different benzyl/hexyl ratio 30/70, 50/50 and 70/30 (mol mol⁻¹) were synthesized from commercial diethyl oxalpropionate:



P1 (PDMMLABn_{30-co}-Hex₇₀), P2 (PDMMLABn_{50-co}-Hex₅₀), P3 (PDMMLABn_{70-co}-Hex₃₀) and block copolymers: P4 (PDMMLABn_{30-b}-Hex₇₀), P5 (PDMMLABn_{50-b}-Hex₅₀), and P6 (PDMMLABn_{70-b}-Hex₃₀), those copolymers were deprotected and benzylic groups were removed to form finally P1' (PDMMLAH_{30-co}-Hex₇₀), P2' (PDMMLAH_{50-co}-Hex₅₀), P3' (PDMMLAH_{70-co}-Hex₃₀) and block copolymers: P4' (PDMMLAH_{30-b}-Hex₇₀), P5' (PDMMLAH_{50-b}-Hex₅₀), and P6' (PDMMLAH_{70-b}-Hex₃₀).

Polymerization was started by tetraethylammonium benzoate C₆H₅COO⁻N(Et)₄ (36 mg mL⁻¹ in distilled absolute ethanol) as initiator by a living anionic ring opening polymerization.

For statistical copolymers we have synthesized a long chain with a monomer/initiator ratio [m]/[a] = 103 and for block copolymers, short chains were synthesized with a ratio of [m]/[a] = 102. The initiator solution of each copolymer was dried under vacuum to remove absolute ethanol and then kept under nitrogen atmosphere at room temperature.

Benzylic and hexylic lactones already weighed and diluted in anhydrous THF were added to the initiator under nitrogen atmosphere. For statistical copolymers P1, P2 and P3 benzylic lactones were added, followed by the addition of the hexylic lactones whereas for block copolymers P4, P5 and P6, benzylic lactones were first added, polymerization process is instantaneously started to form the first block, after complete polymerization of benzylic lactones, hexylic lactones were added and polymerization process is continued to form the second block. All polymerizations were followed by FT-IR spectroscopy with the disappearance of the lactone band at 1835 cm⁻¹ in favor of the ester band at 1754 cm⁻¹. The polymerization process was stopped by the addition of 2 drops of glacial acetic acid in the reaction mixture. Then THF was evaporated and crude polymers were diluted in pure acetone before precipitation in absolute ethanol and left to stand overnight in order to allow polymers precipitation. After complete precipitation, ethanol supernatant was manually eliminated and polymers pellet was diluted in acetone and transferred into a crystallizer to be dried and weighed.

The proportions between benzylic and hexylic groups in the copolymers were determined from ¹H NMR spectrum, by calculating the integration ratio of the "O-CH₂-Ph" of the benzylic group against the integration of the "O-CH₂-(CH₂)₄-CH₃" of the hexylic group (see ESI Fig. S2†).

All copolymers were then deprotected by catalytic hydrolysis in the presence of palladium on charcoal (20% of PDMMLA mass) in acetone to remove the benzylic group.

Formation of the nanoparticles

NPs obtained from deprotected statistical copolymers (P1', P2' and P3') and block copolymers (P4', P5' and P6'), were prepared thanks to the nanoprecipitation method already described by Fessi *et al.*²³ NPs were formed by the adding of 100 mg of PDMMLA copolymers and a suitable percentage of warfarin to a 10 mL of acetone. This mixture was added dropwise to 20 mL of pure water under moderate agitation at room temperature. NPs were formed instantaneously by rapid solvent diffusion

during dropping and the medium got a milky aspect. Nano-suspensions were kept under agitation. Weight ratios of warfarin/polymer of 3%, 6% and 10% have been assayed. Warfarin free PDMMLA NPs were prepared according to the same procedure omitting the drug.

NPs were separated from non-encapsulated warfarin by ultracentrifugation at 40.000 rpm for 30 min followed by pellet resuspension. This procedure was repeated 3 times to remove the maximum of the non-encapsulated and surface bound warfarin.

PDMMLA NPs were characterized by TEM to determine their shape and by DLS to determine their size and surface charge.

Release experiments

To start the warfarin controlled release, pellets recovered from the ultracentrifugation were resuspended in 10 mL of PBS (pH = 7.4), the flask being maintained under a continuous gentle agitation in a temperature-controlled water bath kept at 37 °C. The released warfarin was checked over 4 weeks. Samples (1 mL) were collected twice a week, centrifuged at 4.500 rpm for 15 min. The supernatants were freeze-dried overnight at -80 °C, lyophilized, resuspended in 1 mL of acetonitrile (ACN) and analyzed by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). Standard solutions were freshly prepared by dilution of the stock solution of warfarin (1000 µg mL⁻¹) and phenylbutazone (100 µg mL⁻¹). The amounts of warfarin and phenylbutazone were determined from the peak area correlated with the standard curve. All analysis was performed in triplicate.

Results and discussion

We have synthesized statistical and block amphiphilic PDMMLA derivatives (with *n*: benzylic monomer proportion = 30%, 50% or 70% and *m*: hexylic monomer proportion = 70%, 50% or 30%) shaped as NPs for the controlled delivery of warfarin. PDMMLA derivatives have the assets of ester cleavable bonds in their backbones which make their degradation possible by simple hydrolysis. Besides, these synthetic copolymers with a stereogenic center in the repetitive unit for controlling the macromolecular structure include lateral chemical functions which could be adapted to carry on further chemical modifications.²⁴ Moreover, it was previously demonstrated that PDMMLA degraded to give (*R,S*)-3,3-dimethylmalic acid,²⁴ a non-toxic product involved in the biosynthesis of the pantothenate and the coenzyme A catalyzed by the β,β-dimethyldehydrogenase (EC. 1.1.1.84).^{25,26}

The formation of different copolymers was monitored by FTIR with the disappearance of the vibration band at 1835 cm⁻¹ (C=O stretching of the lactonic function) besides the ester band at 1754 cm⁻¹ (see ESI Fig. S3†).

Then lactones underwent an anionic ring-opening polymerization to form the different copolymers.²⁴ Polymerizations were thus followed by FTIR by a progressive decrease of the lactonic band and increase of the ester band.

The formation of the copolymers was confirmed by ¹H NMR analysis. The ¹H NMR spectrum of the statistical copolymer



evidenced the signals of aromatic hydrogen at 7.4 ppm, of the ester group at 5.3 ppm, and of the methylene groups of benzyl at 5.2 ppm and hexyl at 0.8, 1.25, 1.6 and 4.20 ppm respectively (see ESI Fig. S4†).

Copolymer proportions were obtained from ^1H NMR spectra, by determining the integration ratio of the methylene groups of the benzylic ester against the integration of some methylene groups of the hexylic ester at (Table 1). P1–P6 were then deprotected by catalytic hydrogenolysis to give P1'–P6' with free COOH moieties which provide the hydrophilic and acidic characters to the copolymers.²⁷ Yields, molecular weights and glass transition temperatures are gathered in the Table 1.

One T_g was measured for each of the statistical polymers: 5.6, 19.3 and 31.7 for P1, P2 and P3 respectively. This reflects merely the statistical character of the copolymers which destroy the regularity of the PDMMLA chain. Whereas for block copolymers, two T_g have been obtained which indicate that these polymers are constituted by two blocks: one for the benzylic block and another for the hexylic block.²⁸

In fact, when temperature is lower than T_g , PDMMLA derivatives backbone possess only molecular vibrational motion, and copolymers become hard and glassy on its “frozen” state, this state will protect the copolymer from water diffusion and thus from hydrolysis, as temperature increases approaching T_g , PDMMLA derivatives backbones develop rotational motion and as the temperature increases interactions between copolymer chains become looser thus copolymers become on its “elastic” state.

Or in our study, all T_g were lower than body temperature (37 °C) which mean that copolymers are on its elastic state that will facilitate water diffusion and therefore hydrolysis is easier, leading to a faster degradation time. These considerations make them very interesting materials to be used in association with bioactive molecules in the short and medium term.

On another hand, molar mass distribution value expressed by D for the six copolymers were between 1 and 2 reflecting a good homogeneity of copolymers' chains.

After catalytic hydrogenolysis and the removal of the benzylic group, deprotected copolymers were characterized by ^1H NMR spectrum (see ESI Fig. S5†).

The deprotected statistical copolymers have higher glass transition temperatures (T_g) (13.4 and 51.7 °C for P1' and P3' except P2' = 11.2 °C) than the corresponding protected copolymers besides the increase of the molecular weights likely due to the formation of intermolecular hydrogen bonds between the carboxyl groups. Hydrogen bonds also hinder the motion of the polymeric chains.²⁹ Whereas for the block copolymers we noticed that both T_g tended to shift to a low temperature region probably due to the effect of crystallization which occurred at lower temperatures.

Statistical and block copolymers were shaped as spherical NPs thanks to the nanoprecipitation method, a widely used technique based on interfacial deposition because of the displacement of a solvent with a non-solvent.^{16,30} In addition, the formation of the NPs was obtained without any additives. This allowed the fabrication of on demand NPs of controlled shape, size, and charge surface, all crucial factors that have been shown to affect NPs interactions with biological systems *in vitro* and *in vivo*.^{31,32}

According to TEM analysis (Fig. 1A), the average size of all NPs was about 50 nm (Table 2), whereas polydispersity index (PDI) was ranging from 0.08 to 0.25.

Nanoparticles have a highly negative zeta potential from –60 to –80 mV (Table 2). This high negative charge, mainly due to the presence of the carboxylate units on the surface, ensures and maintains the stability of the nanosuspensions since NPs with lower charge surface could undergo some aggregation.^{33,34}

TEM analysis evidenced spherical NPs from the six copolymers, but the more regular ones have been obtained with P1' and P4'. Those two copolymers were then selected for the remainder of the study assuming that a hydrophobic larger proportion and larger hydrophobic domain respectively may provide better encapsulation efficiency and a relatively slow controlled release of the hydrophobic drug warfarin.

Encapsulation efficiencies with 3%, 6% and 10% of warfarin assayed for the release study with NPs prepared from P1' and P4' gave the optimal encapsulation efficiencies of about 95%, 90% and 85%, respectively. Consequently, released experiments have been performed with NPs containing 3% of warfarin.

Table 1 Composition yields, molecular weights and glass transition temperatures of statistical and block copolymers. Pn' are deprotected Pn

Copolymer	Hex ^a (%)	Bn ^a (%)	Yield (%)	\bar{M}_w^b (g mol ⁻¹)	\bar{M}_n^b (g mol ⁻¹)	D^c	T_g^d (°C)
P1	70.9	29.1	85	19 000	17 800	1.07	5.6
P2	52.0	48.0	79	39 000	18 800	2.07	19.3
P3	31.1	68.9	85	24 000	13 700	1.75	31.7
P4	70.3	29.7	81	34 800	29 900	1.16	–6.2/63.0
P5	49.0	51.0	97	28 100	28 000	1.00	–1.3/72.5
P6	28.7	71.3	98	22 600	22 600	1.00	–9.7/52.2
P1'	—	—	—	141 200	128 500	1.10	13.4
P2'	—	—	—	85 400	79 600	1.07	11.2
P3'	—	—	—	35 900	33 600	1.07	51.7
P4'	—	—	—	109 200	44 500	2.45	–9.8/56.2
P5'	—	—	—	139 600	123 200	1.13	–9.0/57.2
P6'	—	—	—	53 700	30 700	1.75	–9.1/60.3

^a Obtained from ^1H -NMR integration. ^b HPSEC-MALLS-dRI in THF, 0.5 mL min⁻¹, $\bar{M}_n \pm 500$ g mol⁻¹, $\bar{M}_w \pm 500$ g mol⁻¹. ^c $D = \bar{M}_w/\bar{M}_n$.

^d Determined by DSC.



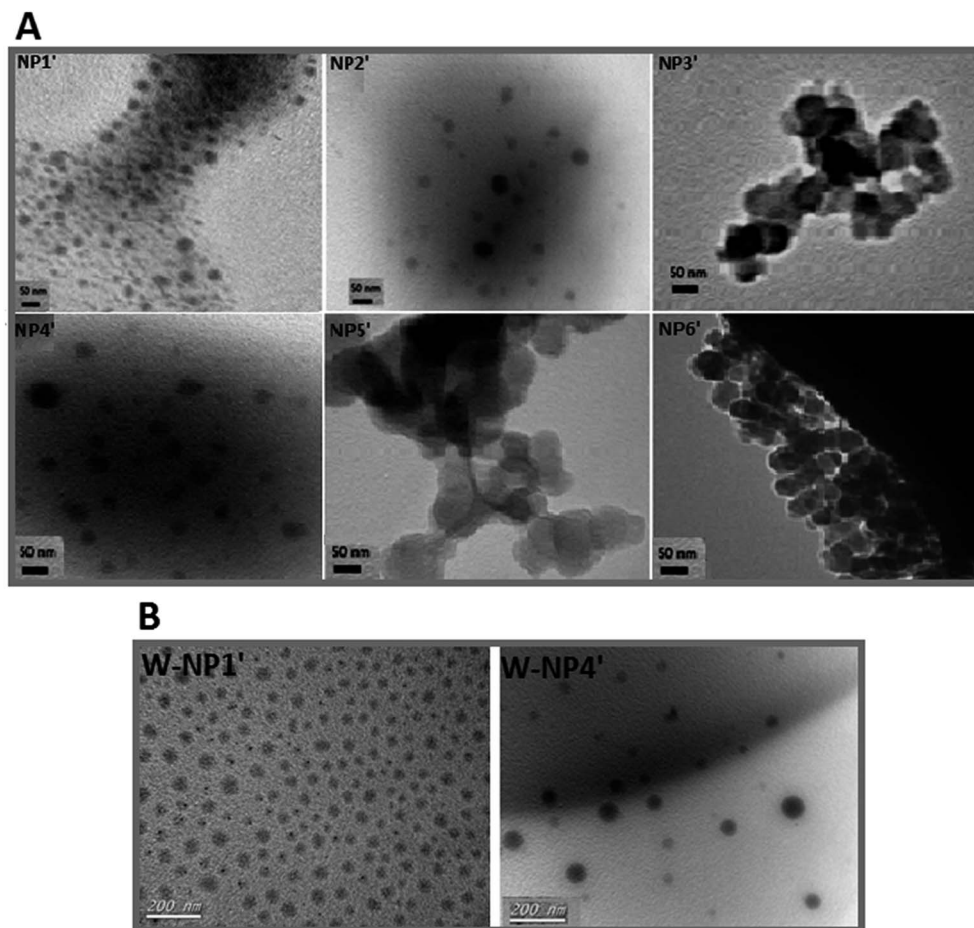


Fig. 1 TEM analysis of NPs. (A) Free NPs and (B) warfarin loaded NPs (W-NPs).

From TEM analysis, free NPs NP1' were distributed homogeneously (in bulk: Fig. 1A NP1'), whereas free NPs NP4' were dispersed heterogeneously (Fig. 1A, NP4'). Once drug was added, a slick of NPs with a homogenous size and shape distribution was obtained either with W-NP1' or W-NP4' (Fig. 1B).

NPs size strongly influences the degradation of the polymer matrix³⁵ and affects the performance of the nanosystem in many aspects such as circulation time, hepatic filtration, renal clearance, endocytosis and tissue extravasation/diffusion of the carrier.³⁶

NPs NP1' and NP4' had an average hydrodynamic diameter in the range of 77 to 93 nm, and a polydispersity index (PDI) of

0.1 for both of them (Fig. 2) emphasizing the monodispersity of NPs formulation charges surface of the loaded NPs were similar to those of unloaded ones *i.e.* -50 mV and -65 mV for NP1' and NP4' respectively and the corresponding nanosuspensions were very stable without observable aggregation for at least 4 weeks.

Controlled release of warfarin

A short term release of warfarin was investigated for 4 weeks to explore warfarin release profile *in vitro* in a similar way as in physiological conditions. From release results carried out by HPLC for the 4 weeks, 0.83 mg and 1.12 mg corresponds to 38%

Table 2 Size, PDI and charge surface of nanoparticles

Nanoparticles	Size ^a (nm)	PDI ^a	Zeta potential ^a (mV)
NP1'	80	0.08	-70
NP2'	85	0.14	-78
NP3'	93	0.10	-63
NP4'	85	0.09	-72
NP5'	60	0.11	-60
NP6'	62	0.25	-80

^a Measurements were obtained by DLS analysis.

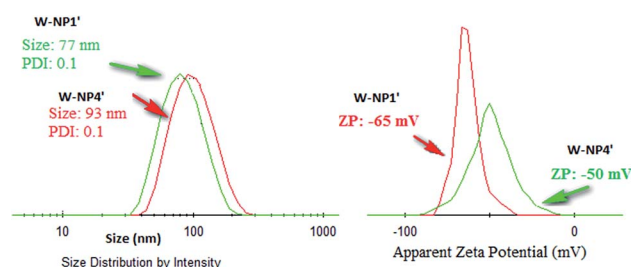


Fig. 2 Size and zeta potential distribution of nanoparticles W-NP1' and W-NP4'.



and 47% for respectively W-NP1' and W-NP4' of the total introduced warfarin quantity. From DLS analysis and for almost two weeks, no apparent change was observed either in size or in zeta potential. From the fourteenth day some modifications were noticed: size tends to slightly increase by a flattening of the size distribution. These modifications continued until the end of the study to obtain finally a larger NPs size: 120 nm for W-NP1' and 145 nm for W-NP4' as well as the increase of surface charge up to -21 and -28 mV respectively (Fig. 3).

These profiles evolution could be due to some limited aggregation of NPs. A preferential degradation of hydrophilic chain would lead to a relative increase of hydrophobic parts of the polymers and a decrease of the amount of carboxylate groups. As a consequence, the surface charge decreased.

A steady slow profile of the warfarin during the first two weeks and the warfarin release accentuation from the twelfth day were observed similarly for W-NP1' and W-NP4' (Fig. 4). It is noteworthy that the release profile of warfarin is done in a sustained and progressive way, in the absence of the burst release generally characterizing a surface-bound drug. This may emphasize the advantages of the PDMMLA derivatives as drug carriers and delivery systems comparing to other polymers.

The release of the therapeutic agents can proceed gradually over days to months depending on the polymer structure, and thus maintain the plasma drug concentrations at therapeutic levels for prolonged periods of time. This restricts the administration frequency of polymeric drug carriers.³⁷

Indeed, release kinetics of drugs from such drug delivery systems are controlled by erosion and/or diffusion mechanisms that have been demonstrated to be dependent on the polymer characteristics³⁵ since these release mechanisms are affected by the degradation rate of polymers.^{35,38}

The architecture of polymers has clearly a strong influence on the release behavior. First, we must note that both polymers have glass transition temperatures allowing the diffusion of water molecules within the particles. However, we could consider that statistical copolymers based nanoparticles behave as matrix systems. The structure of the macromolecules allows a more important concentration of warfarin in the core of the particles. Block copolymers lead to core-shell architecture with a hydrophilic shell surrounding a hydrophobic core with a kind of 'chemical composition gradient' from the outer area to the

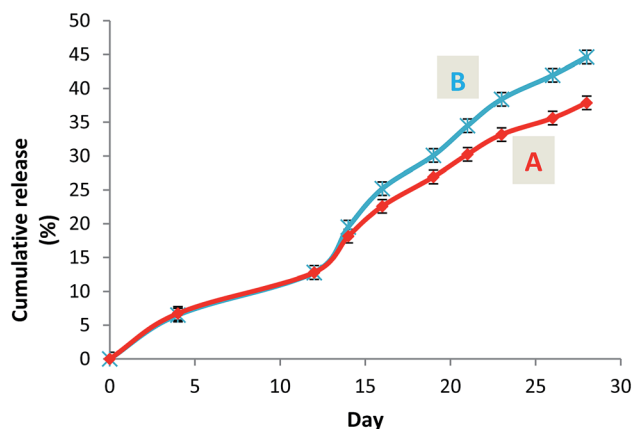


Fig. 4 Cumulative release curves of warfarin from the loaded nanoparticles W-NP1' (A) and W-NP4' (B).

inner one. In the first case, the release of the drug would be driven by the erosion of the particles into smaller hydrophobic structures. A straight release of the drug is the consequence of the increase of the specific surface of the particles. In the second case, the outer hydrophilic shell would act as a rate controlled membrane (dissolution controlled reservoir).

In a nutshell, thanks to the anionic ring opening polymerization we could synthesize well-defined and size-controlled copolymers without the drawback of copolymer large size. In addition to the versatility of PDMMLA derivatives by adding several types of pendant groups (hydrophilic, neutral, hydrophobic and reactive),^{24,39,40} the hydrophilic/hydrophobic balance is adjustable to enable the modulation of a slower or quicker degradation. At this level we assume that a higher proportion of hexylic group and a lower acid proportion result consequently in a slower degradation kinetic of copolymers and *vice versa*, which in turn, makes possible the monitoring of the encapsulation efficiency and release of the drug. PLGA, PLA and PCL, the main polymers used for controlled drug delivery present some shortcomings: PLGA main drawbacks are essentially due to the drug stability during preparation and storage steps, this instability mainly due to the acid-catalyzed nature of its degradation products, leading to the incomplete release of such drug,⁴¹ besides PLGA drug release profile which proceeds in three phases (triphasic): high burst effect in the beginning, lag phase and finally release phase imposed by polymer erosion. Because of its high hydrophobicity, many efforts have been made to adjust PLGA structure in order to increase its hydrophilicity to enhance drug stability that influence the biodegradation and also drug release kinetics.^{42,43}

In turn, poly(lactic acid) (PLA): poly(D,L-lactide) demands about 12 to 16 months to be completely biodegraded, and poly(L-lactide), is weakly hydrophilic and more crystalline, and could be found *in vivo* even after 1.5 to 2 years.⁴⁴

Conclusions

PDMMLA and its derivatives are promising polyesters that have shown an interesting biocompatibility and *in vivo* degradation

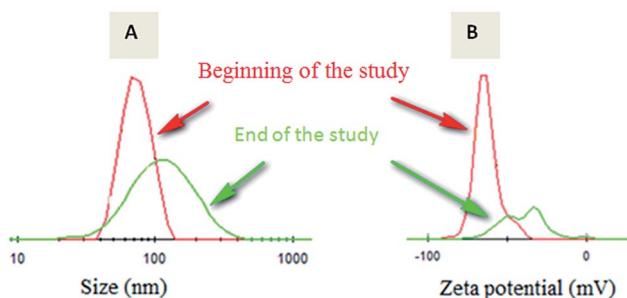


Fig. 3 Evolution of the size distribution (A) and zeta potential (B) of loaded NPs from the beginning (red curve) to the end (green curve) of the study.



giving the (*R,S*)-3,3-dimethylmalic acid as a non-toxic molecule.⁴⁵ PDMLLA derivatives seem to be appealing water soluble aliphatic polyesters with a pendant carboxylic acid groups that could be used in several temporary applications such as engineering technology, medical imaging, diagnostics and drug delivery system in the aim to improve hydrophobic drugs pharmacokinetics.^{28,46,47}

Drug delivery system is as important as the therapeutic impact itself. Polymer drug delivery system has had a tremendous impact on medical technology, improving therapy performance of many existing drugs. These drug carriers are tailored to overcome the weakness of treatment with free drugs that often lead to poor therapeutic responses.⁴⁸ In this study, we present an example of application of synthetic poly(*-*dimethylmalic acid) derivatives in the biomedical field.

Warfarin, a hydrophobic drug was successfully encapsulated in NPs made out of PDMLLAH_{30-co}-Hex₇₀ statistical copolymer and PDMLLAH_{30-b}-Hex₇₀ block copolymer, respectively. This was achieved using the nanoprecipitation method with high encapsulation efficiency. In fact the delivery of such therapeutic agents by nanocarriers aiming to improve their bioavailability and efficacy also minimize their toxicity and side effects, ensure their sustained release, overcome biological barriers to target specific action sites and control their release, have been and remain a tremendous challenge.^{49,50} NPs formed by amphiphilic statistical and block copolymers derived from PDMLLA copolymers represent potentially relevant drug delivery systems for hydrophobic molecules, thanks to their biodegradation properties and their ability to encapsulate such drug in their hydrophobic moieties or domains, besides the possibility to modulate their hydrophobic/hydrophilic balance to make NPs degradation rate faster or slower.

References

- 1 C. D. Mathers and D. Loncar, *PLoS Med.*, 2006, **3**, 2011–2030.
- 2 G. S. Getz and C. A. Reardon, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, 2012, **32**, 1104–1115.
- 3 A. G. Zaman, G. Helft, S. G. Worthley and J. J. Badimon, *Atherosclerosis*, 2000, **149**, 251–266.
- 4 T. Brighton, *Aust. Prescr.*, 2010, **33**, 1–4.
- 5 Iarc Monographs, *Some Industrial Chemicals*, 2000, **77**, 193–225.
- 6 T. Nasr, S. Bondock and M. Youns, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **76**, 539–548.
- 7 C. Kontogiorgis, A. Detsi and D. Hadjipavlou-litina, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2012, **22**, 437–454.
- 8 S. P. K. Rohini, *J. Biofertil. Biopestic.*, 2014, **5**, 5–7.
- 9 J. I. Weitz and J. Hirsh, *Lancet*, 1999, **353**, 1431–1436.
- 10 J. Hirsh, *N. Engl. J. Med.*, 1991, **324**, 1865–1875.
- 11 S. Weigt, N. Huebler, R. Strecker, T. Braunbeck and T. H. Broschard, *Reprod. Toxicol.*, 2012, **33**, 133–141.
- 12 J. W. Little, *J. Oral Med. Oral Surg. Oral Pathol. Oral Radiol.*, 2012, **113**, 575–580.
- 13 N. Bozina, *Biochem. Med.*, 2010, **20**, 33–44.
- 14 R. Autar, *J. Orthop. Nurs.*, 2009, **13**, 165–171.
- 15 R. Srikar, A. Upendran and R. Kannan, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2014, **6**, 245–267.
- 16 R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetsky, V. Torchilin and R. Langer, *Science*, 1994, **263**, 1600–1603.
- 17 P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J. F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J.-S. Chang, Y. K. Hwang, V. Marsaud, P.-N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Ferey, P. Couvreur and R. Gref, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 172–178.
- 18 D. Pandita, S. Kumar and V. Lather, *Drug Discovery Today*, 2015, **20**, 95–104.
- 19 Z. W. Huang, V. Laurent, G. Chetouani, J. Y. Ljubimova, E. Holler, T. Benvegnu, P. Loyer and S. Cammas-Marion, *Int. J. Pharm.*, 2012, **423**, 84–92.
- 20 C. Barbaud, M. Guerrouache and P. Guérin, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 9513–9515.
- 21 F. E. Kohn, J. W. A. van den Berg and G. van de Ridder, *J. Appl. Polym. Sci.*, 1984, **29**, 4265–4277.
- 22 R. Belibel, I. Azzouz and C. Barbaud, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2016, **54**, 1495–1507.
- 23 H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita, *Int. J. Pharm.*, 1989, **55**, R1–R4.
- 24 C. Barbaud, F. Faÿ, F. Abdillah, S. Randriamahefa and P. Guérin, *Macromol. Chem. Phys.*, 2004, **205**, 199–207.
- 25 C. T. Goodhue and E. E. Snell, *Biochemistry*, 1966, **5**, 403–408.
- 26 B. Acta, *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, **613**, 266–274.
- 27 M. J. Gaunt, J. Yu and J. B. Spencer, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 4172–4173.
- 28 F. Ouhib, S. Randriamahefa, P. Guérin and C. Barbaud, *Des. Monomers Polym.*, 2005, **8**, 25–35.
- 29 B. He, J. Bei and S. Wang, *Polymer*, 2003, **44**, 989–994.
- 30 S. Hornig, T. Heinze, C. R. Becer and U. S. Schubert, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 3838–3840.
- 31 A. Albanese, P. S. Tang and W. C. W. Chan, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2012, **14**, 1–16.
- 32 E. C. Wang and A. Z. Wang, *Integr. Biol.*, 2014, **6**, 9–26.
- 33 J. Wang, S. Tian, R. A. Petros, M. E. Napier and N. Carolina, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 11306–11313.
- 34 H. Jin, D. A. Heller, R. Sharma and M. S. Strano, *ACS Nano*, 2009, **3**, 149–158.
- 35 M. Dunne, O. I. Corrigan and Z. Ramtoola, *Biomaterials*, 2000, **21**, 1659–1668.
- 36 C. Dhand, M. P. Prabhakaran and R. W. Beuerman, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 32673–32689.
- 37 J. A. Champion, Y. K. Katare and S. Mitragotri, *J. Controlled Release*, 2007, **121**, 3–9.
- 38 R. A. Kenley, M. O. Lee, T. R. Mahoney and L. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **20**, 2398–2403.
- 39 S. Cammas, I. Renard, V. Langlois and P. Guérin, *Polymer*, 1996, **37**, 4215–4220.
- 40 S. Hyon, W. Cha and Y. Ikada, *Polym. Bull.*, 1987, **29**, 119–126.
- 41 P. Johansen, Y. Men, R. Audran, G. Corradin, H. P. Merkle and B. Gander, *Pharm. Res.*, 1998, **15**, 1103–1110.
- 42 A. Breitenbach, Y. X. Li and T. Kissel, *J. Controlled Release*, 2000, **64**, 167–178.



- 43 R. C. Mundargi, V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel and T. M. Aminabhavi, *J. Controlled Release*, 2008, **125**, 193–209.
- 44 I. Bala, S. Hariharan and M. N. V. R. Kumar, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2004, **21**, 387–422.
- 45 P. T. Magee and E. E. Snell, *Biochemistry*, 1966, **5**, 409–416.
- 46 K. L. Aillon, Y. Xie, N. El-Gendy, C. J. Berkland and M. L. Forrest, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2009, **61**, 457–466.
- 47 S. D. Caruthers, S. A. Wickline and G. M. Lanza, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, **18**, 26–30.
- 48 E. Merisko-liversidge, G. G. Liversidge and E. R. Cooper, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2003, **18**, 113–120.
- 49 S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala and M. Amiji, *J. Controlled Release*, 2008, **126**, 187–204.
- 50 R. Bott, *Igarss*, 2015, vol. 2014, pp. 1–5.



Conclusions et perspectives

Donc dans notre travail, la formulation des nanoparticules a été optimisée afin d'obtenir une meilleure encapsulation, une bonne stabilité et une libération contrôlée de la warfarine. Pour réaliser ces objectifs deux parmi les copolymères synthétisés ont été choisis pour atteindre ces objectifs. Le PDMMLAH_{30-co}-Hex₇₀ (P1') et le PDMMLAH_{30-b}-Hex₇₀ (P4') sont utilisés pour former des nanoparticules chargées de la warfarine. Ces deux copolymères ont générés des nanoparticules ayant une efficacité d'encapsulation pour la warfarine assez importante. Ces nanoparticules chargées ou non chargées de la warfarine, avaient une forme sphérique et une charge de surface assez négative garantissant leur stabilité sans avoir recours à un stabilisant. La taille de ces nanoparticules n'a pas dépassé le 100 nm ce qui les rend très intéressantes en vue d'une application *in vivo* minimisant le risque d'être neutralisée par les macrophages.

La libération contrôlée de la warfarine, suivie par Chromatographie Liquide à Haute Performance en Phase Inverse (RP-HPLC) a permis de mettre en évidence une libération lente et progressive de la warfarine sur une période de quatre semaines, pour les systèmes nanoparticulaires élaborés à partir des deux types de polymères utilisés P1' et P4'. 47 et 38% de la masse totale de warfarine encapsulée sont ainsi libérés sur cette période. Il est à noter l'absence de phase de burst release, consistant en une première phase de libération brutale et importante du principe actif caractérisant des systèmes nanoparticulaires construits à partir d'autres types de polymères tels le PLGA et le PLA.

Par ailleurs, un dérivé coumarinique, le 2,5 dichlorophényl-6-(chrométhyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate(DCBC) ayant une activité anti-thrombotique supposée importante et efficace (inhibiteur direct) selon la littérature, est synthétisé afin d'être encapsulé par les nanoparticules de PDMMLA. L'efficacité de ce DCBC contre la thrombine est évaluée en le comparant avec un inhibiteur compétitif direct de la thrombine: l'argatroban et en testant ses activités dans un système purifié et dans un plasma sanguin. Toutefois les résultats obtenus ont montré une efficacité d'inhibition dans un système purifié alors que dans un plasma sanguin le DCBC s'est avéré inefficace par rapport à la molécule de référence.

Comme perspectives, une étude de libération de DCBC avec ce système de libération est envisageable suite aux résultats de ce principe actif dans un système purifié, ainsi un ciblage direct de ces nanoparticules pour la fibrine après un greffage de fucose à la surface pourrait aboutir à des résultats promoteurs. Par ailleurs une étude de cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* est nécessaire pour déterminer d'un côté le comportement de ces nanoparticules vis-à-vis des cellules vivantes en déterminant leur absorption cellulaire dans les cellules endothéliales en utilisant un marquage et d'un autre côté leurs comportements vis-à-vis des cellules immunitaires (macrophages, leucocytes etc...). Ainsi la toxicité des produits de dégradation des nanoparticules vis-à-vis des cellules endothéliales sera mise en évidence. Le comportement des nanoparticules dans des conditions de flux proches à celui du flux sanguin et leur cinétique de libération seront aussi des perspectives à réaliser.

Enfin, grâce à ses nombreuses propriétés, les nanoparticules formées de PDMMLA peuvent servir comme vecteur pour plusieurs principes actifs. L'encapsulation des agents curatifs ou médicaments ayant comme cible potentiels les tumeurs ou d'autres pathologies vasculaires peuvent souligner l'importance de ces nanoparticules en vue d'élargir ses utilisations. Enfin et pourquoi pas voir un jour les nanoparticules de PDMMLA en phase I d'une étude clinique.

Bibliographie

- [1] M. Maddox, J. Liu, S. H. Mandava, C. Callaghan, V. John, and B. Lee, "Nanotechnology Applications in Urology: A Review.," *BJU Int.*, vol. 114, pp. 653–660, 2014.
- [2] Y. Kuthati, R. K. Kankala, and C. Lee, "Layered double hydroxide nanoparticles for biomedical applications: Current status and recent prospects," *Appl. Clay Sci.*, vol. 112–113, pp. 100–116, 2015.
- [3] G. Gainza, S. Villullas, J. L. Pedraz, R. M. Hernandez, and M. Igartua, "Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration.," *Nanomedicine*, vol. 11, no. 6, pp. 1551–1573, 2015.
- [4] R. Lehner, X. Wang, S. Marsch, and P. Hunziker, "Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 742–757, 2013.
- [5] T. Su, X. Peng, J. Cao, J. Chang, R. Liu, Z. Gu, and B. He, "Functionalization of biodegradable hyperbranched poly(α,β -malic acid) as a nanocarrier platform for anticancer drug delivery.," *RSC Adv.*, vol. 5, pp. 13157–13165, 2015.
- [6] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.
- [7] M. Franchini, "Hemostasis and aging," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 60, no. 2, pp. 144–151, 2006.
- [8] C. H. Cottart, C. Laguillier, V. Nivet-Antoine, C. Klimczak, C. Sebban, and J. L. Beaudeau, "Biologie du vieillissement artériel et artériosclérose," *Comptes Rendus - Biol.*, vol. 332, no. 5, pp. 433–447, 2009.
- [9] V. Noëlle and A. Eveillard, *Mieux vivre avec une maladie cardiovasculaire*. 2006.
- [10] G. K. Hansson, "Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 16, pp. 1685–1695, 2005.
- [11] M. E. Lobatto, V. Fuster, Z. A. Fayad, and W. J. M. Mulder, "Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. 11, pp. 835–52, 2011.
- [12] I. Cicha, A. Wörner, K. Urschel, K. Beronov, M. Goppelt-Struebe, E. Verhoeven, W. G. Daniel, and C. D. Garlich, "Carotid plaque vulnerability: A positive feedback between hemodynamic and biochemical mechanisms," *Stroke*, vol. 42, no. 12, pp. 3502–3510, 2011.
- [13] A. C. van der Wal and A. Becker, "Atherosclerotic plaque rupture-pathologic basis of plaque stability and instability.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 41, no. 2, pp. 334–344, 1999.

- [14] A. Klink, F. Hyafil, J. Rudd, P. Faries, V. Fuster, Z. Mallat, O. Meilhac, W. J. M. Mulder, J.-B. Michel, F. Ramirez, G. Storm, R. Thompson, I. C. Turnbull, J. Egido, J. L. Martín-Ventura, C. Zaragoza, D. Letourneur, and Z. A. Fayad, “Diagnostic and therapeutic strategies for small abdominal aortic aneurysms,” *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 8, no. 6, pp. 338–347, 2011.
- [15] S. N. Goonewardena, “Approaching the asymptote: obstacles and opportunities for nanomedicine in cardiovascular disease.,” *Curr. Atheroscler. Rep.*, vol. 14, no. 3, pp. 247–53, 2012.
- [16] D. Tsiantoulas, C. J. Diehl, J. L. Witztum, and C. J. Binder, “B cells and humoral immunity in atherosclerosis,” *Circ. Res.*, vol. 114, no. 11, pp. 1743–1756, 2014.
- [17] F. Niculescu and H. Rus, “Complement activation and atherosclerosis,” *Mol. Immunol.*, vol. 36, no. 13–14, pp. 949–955, 1999.
- [18] Q. Xu, “Infections, heat shock proteins, and atherosclerosis.,” *Curr. Opin. Cardiol.*, vol. 18, no. 4, pp. 245–252, 2003.
- [19] A. L. Kierszenbaum, “Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l’anatomie pathologique.” p. 646, 2006.
- [20] K. Croce and P. Libby, “Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis.,” *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 14, no. 1, pp. 55–61, 2007.
- [21] E. Falk and a Fernández-Ortiz, “Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications.,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 75, no. 6, p. 3B–11B, 1995.
- [22] A.G.Zaman, G.Helft, S.G.Worthley, and J.J.Badimon, “The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease,” *Atherosclerosis*, vol. 149, no. 2, pp. 251–266, 2000.
- [23] M. Hoffman and R. Pawlinski, “Hemostasis: Old system, new players, new directions,” *Thromb. Res.*, vol. 133, no. SUPPL. 1, pp. S1–S2, 2014.
- [24] M. C. Kleinegris, A. J. Ten Cate-Hoek, and H. Ten Cate, “Coagulation and the vessel wall in thrombosis and atherosclerosis,” *Pol. Arch. Med. Wewn.*, vol. 122, no. 11, pp. 557–566, 2012.
- [25] Z.Massy and F.Andreelli, “Cholestérol et triglycérides.” p. 80, 2004.
- [26] K.L Moore and A. . DalleY, “Anatomie médicale: aspects fondamentaux et applications cliniques.” pp. 13–1110, 1999.
- [27] H. Dupin, *Alimentation et nutrition humaines*. 1992.
- [28] Lauralee Sherwood, *Physiologie humaine*. 2006.
- [29] Joseph Emmerich, “Maladies des vaisseaux.” p. 379, 1998.
- [30] A. Stevens and J. Lowe, “Histologie humaine.” p. 416, 1997.
- [31] N. Voelkel and S. Rounds, “The Pulmonary Endothelium: Function in Health and

- Disease.” p. 550, 2009.
- [32] K. L. Moore and A. F. Dalley, “Anatomie médicale.” p. 1222, 2006.
- [33] D. Richard, P. Chevalet, and T. Soubaya, “Mémo visuel de biologie L’essentiel en fiches.” p. 264, 2016.
- [34] C. Brooker, “Le corps humain: Étude, structure et fonction,” vol. 2000. p. 592, 2000.
- [35] M. McMichael, “New Models of Hemostasis,” *Top. Companion Anim. Med.*, vol. 27, no. 2, pp. 40–45, 2012.
- [36] S. A. Smith and MS Dacvim, “The cell-based model of coagulation,” *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, vol. 19, no. 1, pp. 3–10, 2009.
- [37] P. F. Marx, C. J. N. Verkleij, M. Valls Seron, and J. C. M. Meijers, “Recent developments in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor research.,” *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 9, no. 10, pp. 1165–1173, 2009.
- [38] J. Jaffray and G. Young, “Developmental hemostasis. clinical implications from the fetus to the adolescent.,” *Pediatric Clinics of North America*, vol. 60, no. 6. pp. 1407–1417, 2013.
- [39] H. M. H. Spronk, H. Ten Cate, and P. E. J. Van Der Meijden, “Differential roles of Tissue Factor and Phosphatidylserine in activation of coagulation,” *Thromb. Res.*, vol. 133, pp. S54–S56, 2014.
- [40] D. M. Monroe and M. Hoffman, “What does it take to make the perfect clot?,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 1, pp. 41–48, 2006.
- [41] M. Goldman, K. E. Webert, D. M. Arnold, J. Freedman, J. Hannon, and M. a. Blajchman, “Proceedings of a consensus conference: Towards an understanding of TRALI,” *Transfus. Med. Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 2–31, 2005.
- [42] W. H. Seegers, L. McCoy, and E. Marciniak, *Blood-Clotting Enzymology*. 1967.
- [43] H. M. H. Spronk, J. W. P. Govers-Riemslog, and H. Ten Cate, “The blood coagulation system as a molecular machine,” *BioEssays*, vol. 25, no. 12, pp. 1220–1228, 2003.
- [44] B. N. Bouma and L. O. Mosnier, “Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis,” *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, vol. 33, no. 5–6, pp. 375–381, 2003.
- [45] P. F. Mercer and R. C. Chambers, “Coagulation and coagulation signalling in fibrosis,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1832, no. 7, pp. 1018–1027, 2013.
- [46] D. J. D. Johnson, J. Langdown, and J. a Huntington, “Molecular basis of factor IXa recognition by heparin-activated antithrombin revealed by a 1.7-Å structure of the ternary complex.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 2, pp. 645–650, 2010.
- [47] B. Dahlbäck, “Blood coagulation.,” *Lancet*, vol. 355, no. 9215, pp. 1627–1632, 2000.
- [48] V. Johari and C. Loke, “Brief Overview of the Coagulation Cascade,” *Disease-a-*

Month, vol. 58, no. 8, pp. 421–423, 2012.

- [49] H. ten Cate, K. a Bauer, M. Levi, T. S. Edgington, R. D. Sublett, S. Barzegar, B. L. Kass, and R. D. Rosenberg, “The activation of factor X and prothrombin by recombinant factor VIIa in vivo is mediated by tissue factor.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 92, no. 3, pp. 1207–12, 1993.
- [50] E. W. Davie, K. Fujikawa, and W. Kisiel, “The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation.,” *Biochemistry*, vol. 30, no. 43, pp. 10363–10370, 1991.
- [51] M. E. Papaconstantinou, a. Bah, and E. Di Cera, “Role of the A chain in thrombin function,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, no. 12, pp. 1943–1947, 2008.
- [52] M. A. Schreiber and D. J. Neveleff, “Achieving hemostasis with topical hemostats: Making clinically and economically appropriate decisions in the surgical and trauma settings,” *AORN J.*, vol. 94, no. 5, pp. S1–S20, 2011.
- [53] P. Kamath, J. a. Huntington, and S. Krishnaswamy, “Ligand binding shuttles thrombin along a continuum of zymogen- and proteinase-like states,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 37, pp. 28651–28658, 2010.
- [54] Marcello Di Nisio; M.D.; Saskia Middeldorp; M.D., “Direct Thrombin Inhibitors,” *N Engl J Med*, vol. 353, no. 1, pp. 1028–1040, 2005.
- [55] C. Becattini, M. C. Vedovati, and G. Agnelli, “Old and new oral anticoagulants for venous thromboembolism and atrial fibrillation: A review of the literature,” *Thromb. Res.*, vol. 129, no. 3, pp. 392–400, 2012.
- [56] I. Ahrens, G. Y. H. Lip, and K. Peter, “New oral anticoagulant drugs in cardiovascular disease,” *Thromb. Haemost.*, vol. 104, no. 1, pp. 49–60, 2010.
- [57] T. M. Hackeng, K. M. Seré, G. Tans, and J. Rosing, “Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 9, pp. 3106–3111, 2006.
- [58] K. Winckers, H. Ten Cate, and T. M. Hackeng, “The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis,” *Blood Rev.*, vol. 27, no. 3, pp. 119–132, 2013.
- [59] J. P. Riddel, B. E. Aouizerat, C. Miaskowski, and D. P. Lillicrap, “Theories of blood coagulation.,” *J. Pediatr. Oncol. Nurs.*, vol. 24, no. 3, pp. 123–31, 2007.
- [60] L. Berry, A. Stafford, J. Fredenburgh, H. O’Brodivich, L. Mitchell, J. Weitz, M. Andrew, and a. K. C. Chan, “Investigation of the anticoagulant mechanisms of a covalent antithrombin-heparin complex,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 52, pp. 34730–34736, 1998.
- [61] J. S. Paikin, J. W. Eikelboom, J. A. Cairns, and J. Hirsh, “New antithrombotic agents—insights from clinical trials.,” *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 7, no. 9, pp. 498–509, 2010.
- [62] C. Loke, S. S. Ali, and V. Johari, “Pharmacology of Anticoagulants,” *Disease-a-Month*, vol. 58, no. 8, pp. 424–430, 2012.

- [63] C. J. Lee and J. E. Ansell, "Direct thrombin inhibitors," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 72, no. 4, pp. 581–592, 2011.
- [64] J. I. Weitz, "A novel approach to thrombin inhibition," *Thromb. Res.*, vol. 109, no. SUPPL., pp. 17–22, 2003.
- [65] M. E. Stone and L. Shore-Lesserson, "Present and Future Anticoagulants," *Adv. Anesth.*, vol. 24, pp. 29–66, 2006.
- [66] R. Frédérick, S. Robert, C. Charlier, J. De Ruyck, J. Wouters, B. Pirotte, B. Masereel, and L. Pochet, "3,6-Disubstituted coumarins as mechanism-based inhibitors of thrombin and factor Xa," *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 24, pp. 7592–7603, 2005.
- [67] E. Grouzi, "Update on argatroban for the prophylaxis and treatment of heparin-induced thrombocytopenia type II," *J Blood Med*, vol. 5, pp. 131–41, 2014.
- [68] A. K and Yamada K, "Anti-angiogenic Effect of Argatroban and Angiopoietin 1/2 Balance in Experimental Cancerous Angiogenesis," *st Marian. Med.j*, vol. 32, pp. 433–443, 2004.
- [69] J. M. Walenga, "An overview of the direct thrombin inhibitor argatroban," *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, vol. 32, no. SUPPL. 3. pp. 9–14, 2002.
- [70] K. A. Tanaka, F. Szlam, N. Katori, N. Sato, J. D. Vega, and J. H. Levy, "The effects of argatroban on thrombin generation and hemostatic activation in vitro," *Anesth. Analg.*, vol. 99, no. 5, pp. 1283–1289, 2004.
- [71] S. Okamoto, A. Hijikata, R. Kikumoto, S. Tonomura, H. Hara, K. Ninomiya, A. Maruyama, M. Sugano, and Y. Tamao, "Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereo-structure of its hydrophobic carboxamide portion," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 101, no. 2, pp. 440–446, 1981.
- [72] T Brighton, "Experimental and clinical pharmacology New oral anticoagulant drugs – mechanisms of action," *Aust. Prescr.*, vol. 33, pp. 1–4, 2010.
- [73] J. I. Weitz and J. Hirsh, "New antithrombotic agents.," *Lancet*, vol. 353, no. 5 Suppl, pp. 1431–1436, 1999.
- [74] J. Hirsh, "Oral anticoagulant drugs," *N. Engl. J. Med.*, vol. 324, pp. 1865–75, 1991.
- [75] Iarc Monographs, "Chemical and physical data," *Some Ind. Chem.*, vol. 77, no. October 1975, pp. 193–225, 2000.
- [76] K. Fylaktakidou, D. Hadjipavlou-Litina, K. Litinas, and D. Nicolaides, "Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory / Antioxidant Activities," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 10, no. 30, pp. 3813–3833, 2004.
- [77] C. Kontogiorgis, A. Detsi, and D. Hadjipavlou-litina, "Coumarin-based drugs : a patent review (2008 -- present)," pp. 437–454, 2012.
- [78] S. P. Rohini K, "Therapeutic Role of Coumarins and Coumarin-Related Compounds,"

- J. Biofertilizers Biopestic.*, vol. 5, no. 1, pp. 5–7, 2014.
- [79] J. R. S. Hoult and M. Payá, “Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential,” *Gen. Pharmacol.*, vol. 27, no. 4, pp. 713–722, 1996.
- [80] M. Kataranovski, M. Vlaski, D. Kataranovski, N. Tosic, S. Mandic-Radic, and V. Todorovic, “Immunotoxicity of epicutaneously applied anticoagulant rodenticide warfarin: Evaluation by contact hypersensitivity to DNCB in rats,” *Toxicology*, vol. 188, no. 1, pp. 83–100, 2003.
- [81] Y. Bai, J. Du, and X. Weng, “Synthesis, characterization, optical properties and theoretical calculations of 6-fluoro coumarin,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 126, pp. 14–20, 2014.
- [82] P. K. Jain and H. Joshi, “Coumarin: Chemical and pharmacological profile,” *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 6, pp. 236–240, 2012.
- [83] M. J. Matos, L. Santana, E. Uriarte, O. A. Abreu, E. Molina, and E. G. Yordi, “Coumarins — An Important Class of Phytochemicals,” in *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, 2015, pp. 113–140.
- [84] F. Belluti, G. Fontana, L. D. Bo, N. Carenini, C. Giommarelli, and F. Zunino, “Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 18, no. 10, pp. 3543–3550, 2010.
- [85] G. Qadeer, N. H. Rama, and M. L. Garduño-Ramírez, “Synthesis and anti-inflammatory activity of fluorinated isocoumarins and 3,4-dihydroisocoumarins,” *J. Fluor. Chem.*, vol. 128, no. 6, pp. 641–646, 2007.
- [86] K. Kinza Aslam, M. K. Khosa, N. Jahan, and S. Nosheen, “Short communication: synthesis and applications of Coumarin,” *Pak. J. Pharm. Sci.*, vol. 23, no. 4, pp. 449–454, 2010.
- [87] L. Piazzzi, A. Cavalli, F. Colizzi, F. Belluti, M. Bartolini, F. Mancini, M. Recanatini, V. Andrisano, and A. Rampa, “Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 1, pp. 423–426, 2008.
- [88] T. Nasr, S. Bondock, and M. Youns, “Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide e hydrazone derivatives,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 76, pp. 539–548, 2014.
- [89] Neha Mishra, Vrushali Patil, A. Ashish, A. . Bobade, and C. Abhay, “Synthesis of substituted Coumarin derivatives and their spectral Characterization,” *IOSR J. Appl. Chem.*, vol. 7, no. 8, pp. 48–51, 2014.
- [90] J. K. Aronson, “Meyler’s Side Effects of Cardiovascular Drugs.” p. 840, 2009.
- [91] F. W. Deckert, “Coumarin anticoagulants: a review of some current research ares,” *Southern medical journal*, vol. 67, no. 10. pp. 1191–202, 1974.

- [92] N. Stankovic, M. Mladenovic, S. Matic, S. Stanic, V. Stankovic, M. Mihailovic, V. Mihailovic, J. Katanic, T. Boroja, N. Vukovic, and S. Sukdolak, "Serum albumin binding analysis and toxicological screening of novel chroman-2,4-diones as oral anticoagulants," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 227, pp. 18–31, 2015.
- [93] L. Lei, Y. Xue, Z. Liu, S. Peng, Y. He, Y. Zhang, and R. Fang, "Coumarin derivatives from *Ainsliaea fragrans* and their anticoagulant activity," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 5, pp. 1–9, 2015.
- [94] J. Hirsh, M. O. Donnell, and J. I. Weitz, "New anticoagulants," *Blood*, vol. 105, no. 2, pp. 453–463, 2005.
- [95] R. M. Jay and P. Lui, "How anticoagulants work," *Tech. Reg. Anesth. Pain Manag.*, vol. 10, no. 2, pp. 30–39, 2006.
- [96] M. Mladenović, M. Mihailović, D. Bogojević, N. Vuković, S. Sukdolak, S. Matić, N. Nićiforović, V. Mihailović, P. Mašković, M. M. Vrvić, and S. Solujić, "Biochemical and pharmacological evaluation of 4-hydroxychromen-2-ones bearing polar C-3 substituents as anticoagulants," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 54, pp. 144–158, 2012.
- [97] P. H. Duffield, D. J. Birkett, D. N. Wade, and A. M. Duffield, "Quantitation of plasma warfarin levels by gas chromatography chemical ionization mass spectrometry," *Biomed Mass Spectrom.*, vol. 6, no. 3, pp. 101–104, 1979.
- [98] I. a. Nicholls, B. C. G. Karlsson, A. M. Rosengren, and H. Henschel, "Warfarin: An environment-dependent switchable molecular probe," *J. Mol. Recognit.*, vol. 23, no. 6, pp. 604–608, 2010.
- [99] Y. A. Chua, W. Z. Abdullah, and S. H. Gan, "Development of a high-performance liquid chromatography method for warfarin detection in human plasma," *Turk J Med Sci*, vol. 42, no. 5, pp. 930–941, 2012.
- [100] Y. H. Hu, F. Wu, C. L. Lo, and C. T. Tai, "Predicting warfarin dosage from clinical data: A supervised learning approach," *Artif. Intell. Med.*, vol. 56, no. 1, pp. 27–34, 2012.
- [101] B. R. a O. Reilly, P. M. Aggeler, and L. S. Leong, "Studies on," vol. 42, no. 10, pp. 1542–1551, 1963.
- [102] M. McCullough, "Pharmacogenetics of warfarin," *Aust. Prescr.*, vol. 32, no. 3, p. 80, 2009.
- [103] S. Sun, M. Wang, L. Su, J. Li, H. Li, and D. Gu, "Study on warfarin plasma concentration and its correlation with international normalized ratio," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 42, no. 2, pp. 218–222, 2006.
- [104] B. Risk, "Coumadin tablets (Warfarin Sodium Tablets , USP) Crystalline coumadin for injection (Warfarin Sodium for Injection , USP)," pp. 1–39, 2011.
- [105] B. R. Gudmundsdottir, C. W. Francis, A. M. Bjornsdottir, M. Nellbring, and P. T. Onundarson, "Critical role of factors II and X during coumarin anticoagulation and their combined measurement with a new Fiix-prothrombin time," *Thromb. Res.*, vol.

- 130, no. 4, pp. 674–681, 2012.
- [106] O. M. Abdelhafez, K. M. Amin, R. Z. Batran, T. J. Maher, S. a. Nada, and S. Sethumadhavan, “Synthesis, anticoagulant and PIVKA-II induced by new 4-hydroxycoumarin derivatives,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 18, no. 10, pp. 3371–3378, 2010.
- [107] A. Göpferich and J. Tessmar, “Polyanhydride degradation and erosion,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. 7, pp. 911–931, 2002.
- [108] W. He and R. Benson, *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*, no. 2011. Elsevier Inc., 2014.
- [109] C. Engineer, J. Parikh, and A. Raval, “Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system,” *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 25, no. 2, pp. 79–85, 2011.
- [110] R. Kronenthal, “Biodegradable polymers in medicine and surgery,” *Polym. Med. Surg.*, pp. 119–37, 1975.
- [111] A. Göpferich, “Mechanisms of polymer degradation and erosion,” *Biomaterials*, vol. 17, no. 2, pp. 103–114, 1996.
- [112] A. D’Emanuele, J. Hill, J. A. Tamada, A. J. Domb, and R. Langer, “molecular weight changes in polymer erosion.pdf,” *Pharm. Res.*, vol. 9, no. 10, pp. 1279–1283, 1992.
- [113] Z. Zhang, O. Ortiz, R. Goyal, and J. Kohn, *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. Elsevier Inc., 2014.
- [114] R. Ortiz, S. Moreno-Flores, I. Quintana, M. M. Vivanco, J. R. Sarasua, and J. L. Toca-Herrera, “Ultra-fast laser microprocessing of medical polymers for cell engineering applications,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 37, no. 1, pp. 241–250, 2014.
- [115] S. J. Huang and L.-H. Ho, “Biodegradable polymers derived from aminoacids,” *Macromol symp*, vol. 144, pp. 7–32, 1999.
- [116] A. P. Gupta and V. Kumar, “New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique,” *Eur. Polym. J.*, vol. 43, no. 10, pp. 4053–4074, 2007.
- [117] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, and X. Jing, “Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 237–280, 2012.
- [118] F. P. La Mantia, R. Arrigo, and M. Morreale, “Effect of the orientation and rheological behaviour of biodegradable polymer nanocomposites,” *Eur. Polym. J.*, vol. 54, pp. 11–17, 2014.
- [119] M. Leemhuis, *Biodegradable Functionalized Poly (α-Hydroxy) Acids: A New Class of Polymers for Pharmaceutical Applications*. 2007.
- [120] A. Aravamudhan, D. M. Ramos, A. A. Nada, and S. G. Kumbar, *Natural Polymers: polysaccharides and their derivatives for biomedical applications*. Elsevier Inc., 2014.

- [121] J. S. Suwandi, R. E. M. Toes, T. Nikolic, and B. O. Roep, "Inducing tissue specific tolerance in autoimmune disease with tolerogenic dendritic cells," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 33, pp. 97–103, 2015.
- [122] C. K. S. Pillai, W. Paul, and C. P. Sharma, "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 34, no. 7, pp. 641–678, 2009.
- [123] N. Wang and X. S. Wu, "Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid oligomers: Part II. Biodegradation and drug delivery application.," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 9, no. 1, pp. 75–87, 1997.
- [124] R. Van Dijkhuizen-Radersma, S. Métairie, J. R. Roosma, K. De Groot, and J. M. Bezemer, "Controlled release of proteins from degradable poly(ether-ester) multiblock copolymers," *J. Control. Release*, vol. 101, no. 1–3 SPEC. ISS., pp. 175–186, 2005.
- [125] M. Chasin, A. Domb, E. Ron, E. Mathiowitz, R. Langer, K. Leong, C. Laurencin, H. Brem, and S. Grossman, *Polyanhydrides as Drug Delivery Systems*. 1990.
- [126] E. Sharmin and F. Zafar, "Polyurethane : An Introduction," *Polyurethane*, pp. 3–16, 2012.
- [127] I. Engelberg and J. Kohn, "Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study," *Biomaterials*, vol. 12, no. 3, pp. 292–304, 1991.
- [128] Z. Zhang, O. Ortiz, R. Goyal, and J. Kohn, *Principles of Tissue Engineering*, Fourth Edi. Elsevier, 2014.
- [129] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 102, pp. 47–90, 2006.
- [130] T. Barrows, "Degradable implant materials: A review of synthetic absorbable polymers and their applications," *Clinical Materials*, vol. 1, no. 4. pp. 233–257, 1986.
- [131] E. Piskin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *J. Biomater. Sci.*, vol. 6, no. 9, pp. 775–795, 1994.
- [132] M. Acemoglu, "Chemistry of polymer biodegradation and implications on parenteral drug delivery.," *Int. J. Pharm.*, vol. 277, no. 1–2, pp. 133–9, 2004.
- [133] M. Okada, "Chemical syntheses of biodegradable polymers," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 87–133, 2002.
- [134] S. Venkatraman, F. Boey, and L. L. Lao, "Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 33, no. 9, pp. 853–874, 2008.
- [135] A. M. Reed and D. K. Gilding, "Biodegradable polymers for use in surgery - poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers: 2. In vitro degradation," *Polymer (Guildf)*, vol. 22, no. 4, pp. 494–498, 1981.
- [136] F. Masood, "Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 60, pp. 569–578, 2016.

- [137] I. Kong, *Polymers with Nano-Encapsulated Functional Polymers*. Elsevier Inc., 2016.
- [138] O. Nuyken and S. Pask, “Ring-Opening Polymerization—An Introductory Review,” *Polymers (Basel)*, vol. 5, no. 2, pp. 361–403, 2013.
- [139] R. J. Pounder and A. P. Dove, “Towards poly(ester) nanoparticles: recent advances in the synthesis of functional poly(ester)s by ring-opening polymerization,” *Polym. Chem.*, vol. 1, pp. 260–271, 2010.
- [140] P. Loyer and S. Cammas-Marion, “Natural and synthetic poly(malic acid)-based derivatives: a family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers,” *J. Drug Target.*, vol. 22, no. 7, pp. 556–575, 2014.
- [141] D. Chaturvedi, S. Mishra, P. Tandon, J. a. Portilla-Arias, and S. Muñoz-Guerra, “Thermal degradation and theoretical interpretation of vibrational spectra of poly (β ,l-malic acid),” *Polymer (Guildf)*, vol. 52, no. 14, pp. 3118–3126, 2011.
- [142] B. S. Lee, M. Fujita, N. M. Khazenzon, K. A. Wawrowsky, S. Wachsmann-Hogiu, D. L. Farkas, K. L. Black, J. Y. Ljubimova, and E. Holler, “Polycefim, a new prototype of a multifunctional nanoconjugate based on poly(β -L-malic acid) for drug delivery,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 17, no. 2, pp. 317–326, 2006.
- [143] Y. Qiao, X. Duan, L. Fan, W. Li, H. Wu, and Y. Wang, “Synthesis of controlled molecular weight poly (β -malic acid) and conjugation with HCPT as a polymeric drug carrier,” *J. Polym. Res.*, vol. 21, no. 4, p. 397, 2014.
- [144] A. Lanz-Landázuri, M. García-Alvarez, J. Portilla-Arias, A. M. de Ilarduya, R. Patil, E. Holler, J. Y. Ljubimova, and S. Muñoz-Guerra, “Poly(methyl malate) nanoparticles: formation, degradation, and encapsulation of anticancer drugs,” *Macromol. Biosci.*, vol. 11, no. 10, pp. 1370–7, Oct. 2011.
- [145] S. Cammas, I. Renard, V. Langlois, and P. Guérin, “Poly(β -malic acid): obtaining high molecular weights by improvement of the synthesis route,” *Polymer (Guildf)*, vol. 37, no. 18, pp. 4215–4220, 1996.
- [146] M. Niaounakis, *Introduction to Biopolymers*, no. 5. 2013.
- [147] C. T. Goodhue and E. E. Snell, “The bacterial degradation of pantothenic acid. III. Enzymic formation of aldopantoic acid,” *Biochemistry*, vol. 5, no. 2, pp. 403–408, 1966.
- [148] O. Coulembier, L. Mespouille, J. L. Hedrick, R. M. Waymouth, and P. Dubois, “Metal-Free Catalyzed Ring-Opening Polymerization of γ -Lactones : Synthesis of Amphiphilic Triblock Copolymers Based on Poly (dimethylmalic acid),” *Macromolecules*, vol. 39, pp. 4001–4008, 2006.
- [149] F. Ouhib, S. Randriamahefa, V. Wintgens, P. Guérin, and C. Barbaud, “Polymeric Micelles and Nanoparticles from Block and Statistical Poly((RS)-3,3-dimethylmalic acid) Derivatives: Preparation and Characterization,” *Macromol. Biosci.*, vol. 5, no. 4, pp. 299–305, 2005.
- [150] D. Domurado, “Solubilization of Water-Insoluble Drugs Due to Random Amphiphilic

- and Degradable Poly(dimethylmalic acid) Derivatives,” *Biomacromolecules*, vol. 14, pp. 1936–1944, 2013.
- [151] F. Ouhib, S. Randriamahefa, P. Guérin, and C. Barbaud, “Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of α,α,β -trisubstituted β -lactones and their characterizations,” *Des. Monomers Polym.*, vol. 8, no. 1, pp. 25–35, 2005.
- [152] A. Viscido, A. Capannolo, G. Latella, R. Caprilli, and G. Frieri, “Nanotechnology in the treatment of inflammatory bowel diseases,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 8, no. 9, pp. 903–918, 2014.
- [153] T. Haruyama, “Micro- and nanobiotechnology for biosensing cellular responses,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 3, pp. 393–401, 2003.
- [154] W. S. Khan and R. Asmatulu, *Nanotechnology Emerging Trends, Markets, and Concerns*, 1st ed., vol. #volume#. © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved., 2013.
- [155] S. K. Sahoo, S. Parveen, and J. J. Panda, “The present and future of nanotechnology in human health care,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 3, no. 1, pp. 20–31, 2007.
- [156] C. Chauvierre, “Nano and Microsystems for Molecular Imaging and Therapy Nanomedicine,” 2014.
- [157] R. Sharma, U. Agrawal, N. Mody, and S. P. Vyas, “Polymer nanotechnology based approaches in mucosal vaccine delivery: challenges and opportunities,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 1, pp. 64–79, 2015.
- [158] O. C. Farokhzad and R. Langer, “Impact of Nanotechnology on Hair Attributes,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, 2007.
- [159] E. Lepeltier, C. Bourgaux, and P. Couvreur, “Nanoprecipitation and the ‘Ouzo effect’: Application to drug delivery devices,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 71, pp. 86–97, 2014.
- [160] S. Gadde, O. Even-Or, N. Kamaly, A. Hasija, P. G. Gagnon, K. H. Adusumilli, A. Erakovic, A. K. Pal, X.-Q. Zhang, N. Kolishetti, J. Shi, E. a. Fisher, and O. C. Farokhzad, “Development of Therapeutic Polymeric Nanoparticles for the Resolution of Inflammation,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 3, no. 9, pp. 1448–1456, 2014.
- [161] S. Zhang, Y. Wu, B. He, K. Luo, and Z. Gu, “Biodegradable polymeric nanoparticles based on amphiphilic principle: construction and application in drug delivery,” *Sci. China Chem.*, vol. 57, no. 4, pp. 461–475, 2014.
- [162] Health Quality Ontario, *Nanotechnology: an evidence-based analysis.*, vol. 6, no. 19. 2006.
- [163] S. Barua and S. Mitragotri, “Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects,” *Nano Today*, vol. 9, no. 2, pp. 223–243, 2014.
- [164] B. Godin, J. H. Sakamoto, R. E. Serda, A. Grattoni, A. Bouamrani, and M. Ferrari, “Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of

- cardiovascular diseases,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 31, no. 5, pp. 199–205, 2010.
- [165] H. D. Danenberg, I. Fishbein, J. Gao, J. Mönkkönen, R. Reich, I. Gati, E. Moerman, and G. Golomb, “Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits,” *Circulation*, vol. 106, no. 5, pp. 599–605, 2002.
- [166] M. Hedman, “Safety and Feasibility of Catheter-Based Local Intracoronary Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transfer in the Prevention of Postangioplasty and In-Stent Restenosis and in the Treatment of Chronic Myocardial Ischemia: Phase II Results of the Kuopio,” *Circulation*, vol. 107, pp. 2677–2683, 2003.
- [167] G. M. Lanza, P. M. Winter, S. D. Caruthers, M. S. Hughes, T. Cyrus, J. N. Marsh, A. M. Neubauer, K. C. Partlow, and S. a Wickline, “Nanomedicine opportunities for cardiovascular disease with perfluorocarbon nanoparticles.,” *Nanomedicine (Lond.)*, vol. 1, no. 3, pp. 321–329, 2006.
- [168] F. A. Jaffer, P. Libby, and R. Weissleder, “Optical and multimodality molecular imaging: Insights into atherosclerosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 7, pp. 1017–1024, 2009.
- [169] T. W. Chung, S. S. Wang, and W. J. Tsai, “Accelerating thrombolysis with chitosan-coated plasminogen activators encapsulated in poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 2, pp. 228–237, 2008.
- [170] A. K. A. Silva, D. Letourneur, and C. Chauvierre, “Polysaccharide nanosystems for future progress in cardiovascular pathologies.,” *Theranostics*, vol. 4, no. 6, pp. 579–91, 2014.
- [171] L. B. Peres, L. B. Peres, P. Henrique, H. De Araújo, and C. Sayer, “Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 140, pp. 317–323, 2016.
- [172] C. Wischke and S. P. Schwendeman, “Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles,” *Int. J. Pharm.*, vol. 364, no. 2, pp. 298–327, 2008.
- [173] R. E. Whitmire, D. Scott Wilson, A. Singh, M. E. Levenston, N. Murthy, and A. J. García, “Self-assembling nanoparticles for intra-articular delivery of anti-inflammatory proteins,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 30, pp. 7665–7675, 2012.
- [174] W. Monsky, D. Fukumura, T. Gohongi, M. Ancukiewicz, H. Weich, V. Torchilin, F. Yuan, and R. Jain, “Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor,” *Cancer Res.*, vol. 59, no. 16, pp. 4129–4135, 1999.
- [175] G. Oberdörster, E. Oberdörster, and J. Oberdörster, “Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 113, no. 7, pp. 823–39, Jul. 2005.
- [176] M. Tajes, E. Ramos-Fernández, X. Weng-Jiang, M. Bosch-Morató, B. Guivernau, A. Eraso-Pichot, B. Salvador, X. Fernández-Busquets, J. Roquer, and F. J. Muñoz, “The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it.,” *Mol.*

- Membr. Biol.*, vol. 31, no. 5, pp. 152–67, 2014.
- [177] J. Kreuter, “Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery.,” *Journal of Anatomy*, vol. 63, no. 6. pp. 470–491, 1996.
- [178] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita, “Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement,” *Int. J. Pharm.*, vol. 55, no. 1, pp. R1–R4, 1989.
- [179] C. Vauthier and K. Bouchemal, “Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles,” *Pharm. Res.*, vol. 26, no. 5, pp. 1025–1058, 2009.
- [180] U. Bilati, E. Allémann, and E. Doelker, “Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 67–75, 2005.
- [181] M. Chorny, I. Fishbein, H. D. Danenberg, and G. Golomb, “Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: Effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics,” *J. Control. Release*, vol. 83, no. 3, pp. 389–400, 2002.
- [182] H. Zhang, W. Cui, J. Bei, and S. Wang, “Preparation of poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) nanoparticles and their degradation behaviour in aqueous solution,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 91, no. 9, pp. 1929–1936, 2006.
- [183] A. J. Thote, J. T. Chappell, R. B. Gupta, and R. Kumar, “Reduction in the initial-burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 31, no. 1, pp. 43–57, 2005.
- [184] S. E. Ahmed, A. M. Martins, and G. a. Husseini, “The use of ultrasound to release chemotherapeutic drugs from micelles and liposomes,” *J. Drug Target.*, vol. 23, no. 1, pp. 16–42, 2015.
- [185] C. L. Peterson, “Nanotechnology: From Feynman to the grand challenge of molecular manufacturing,” *IEEE Technol. Soc. Mag.*, vol. 23, no. 4, pp. 9–15, 2004.
- [186] J. F. Leary, “Nanotechnology: what is it and why is small so big?,” *Can. J. Ophthalmol.*, vol. 45, no. 5, pp. 449–456, 2010.
- [187] R. Subbiah, M. Veerapandian, and K. S. Yun, “Nanoparticles: functionalization and multifunctional applications in biomedical sciences.,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 17, no. 36, pp. 4559–4577, 2010.
- [188] P. Legrand, S. Lesieur, A. Bochot, R. Gref, W. Raatjes, G. Barratt, and C. Vauthier, “Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation,” *Int. J. Pharm.*, vol. 344, no. 1–2, pp. 33–43, 2007.
- [189] É. Dellacherie, R. Gref, and P. Quellec, “Les nanosphères a «furtives» comme nouvelles formes galéniques injectables: Espoirs et réalités,” *Medecine/Sciences*, vol. 17, no. 5, pp. 619–626, 2001.
- [190] Z. W. Huang, V. Laurent, G. Chetouani, J. Y. Ljubimova, E. Holler, T. Benvegna, P.

- Loyer, and S. Cammas-Marion, “New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 423, no. 1, pp. 84–92, 2012.
- [191] A. S. Hoffman, “The origins and evolution of ‘controlled’ drug delivery systems,” *J. Control. Release*, vol. 132, no. 3, pp. 153–163, 2008.
- [192] C. Dhand, M. P. Prabhakaran, and R. W. Beuerman, “Role of size of drug delivery carriers for pulmonary and intravenous administration with emphasis on cancer therapeutics and lung-targeted drug delivery,” *RSC Adv.*, vol. 4, pp. 32673–32689, 2014.
- [193] U. Bazylińska, A. Lewińska, Ł. Lamch, and K. a. Wilk, “Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 442, pp. 42–49, 2014.
- [194] S. Honary and F. Zahir, “Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems,” vol. 12, no. 2, pp. 265–273, 2013.
- [195] D. J. Brayden, “Controlled release technologies for drug delivery,” *Drug Discov. Today*, vol. 8, no. 21, pp. 976–978, 2003.
- [196] M.-A. Leboucher-Durand, V. Langlois, and P. Guerin, “4-Carboxy-2-oxetanone as a new chiral precursor in the preparation of functionalized racemic or optically active poly(malic acid) derivatives,” *Polym. Bull.*, vol. 36, pp. 35–41, 1996.
- [197] Anna Finne Wistrand and A.-C. Albertsson, “the Use of Polymer Design in Resorbable Colloids,” *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 369–395, 2006.
- [198] G. S. Kwon and K. Kataoka, “Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 237–245, 2012.
- [199] T. K. Sau and A. L. Rogach, “Nonspherical noble metal nanoparticles: Colloid-chemical synthesis and morphology control,” *Adv. Mater.*, vol. 22, no. 16, pp. 1781–1804, 2010.
- [200] P. Legrand, J.-P. Benoît, S. Briançon, E. Fattal, H. Fessi, and C. Passirani, “Spheroides Et Formes Vectorisees,” *Pharm. Galénique Formul. Technol. Pharm.*, pp. 221–250, 2007.
- [201] J. Panyam and V. Labhasetwar, “Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 3, pp. 329–347, 2003.
- [202] T. Akagi, M. Higashi, T. Kaneko, T. Kida, and M. Akashi, “Hydrolytic and enzymatic degradation of nanoparticles based on amphiphilic poly(γ -glutamic acid)-graft-L-phenylalanine copolymers,” *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 1, pp. 297–303, 2006.
- [203] J. Mulzer, G. Brüntrup, and A. Chucholowski, “Competition in the Three-Component System Triphenylphosphane/Azo Ester/3-Hydroxy-Carboxylic Acid: OH-versus COOH-Activation,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 18, no. 8, pp. 622–623, 1979.

- [204] K. Stridsberg, M. Ryner, and A. Albertsson, "Controlled ring-opening polymerization: polymers with designed macromolecular architecture," *Adv. Polym. Sci.*, vol. 157, pp. 1–25, 2002.
- [205] C. Barbaud, F. Faÿ, F. Abdillah, S. Randriamahefa, and P. Guérin, "Synthesis of New Homopolyester and Copolyesters by Anionic Ring-opening Polymerization of α,α',β -Trisubstituted β -Lactones," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 205, no. 2, pp. 199–207, 2004.
- [206] L. R. Bush, "Argatroban , A Selective , Potent Thrombin Inhibitor," vol. 9, no. 3, pp. 247–263, 1991.
- [207] R. F. Valeev, A. M. Davletbaev, R. F. Talipov, and M. S. Miftakhov, "Synthesis of a Chiral Building Block for the C 6 – C 9 Fragment of Epothilones," vol. 52, no. 6, pp. 883–886, 2016.
- [208] Y. Wang, W. Wang, Z. Zhang, L. Xu, and P. Li, "Study of the glass transition temperature and the mechanical properties of PET/modified silica nanocomposite by molecular dynamics simulation," *Eur. Polym. J.*, vol. 75, pp. 36–45, 2016.
- [209] B. He, J. Bei, and S. Wang, "Synthesis and characterization of a functionalized biodegradable copolymer: Poly(L-lactide-co-RS- β -malic acid)," *Polymer (Guildf.)*, vol. 44, no. 4, pp. 989–994, 2003.
- [210] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray, "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 53, no. 2, pp. 283–318, 2001.
- [211] J. a. Champion, Y. K. Katare, and S. Mitragotri, "Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers," *J. Control. Release*, vol. 121, no. 1–2, pp. 3–9, 2007.
- [212] P. Decuzzi, S. Lee, B. Bhushan, and M. Ferrari, "A theoretical model for the margination of particles within blood vessels," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 33, no. 2, pp. 179–190, 2005.
- [213] J. A. Champion and S. Mitragotri, "Role of target geometry in phagocytosis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 13, pp. 4930–4934, 2006.
- [214] P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap, and M. Ferrari, "Intravascular delivery of particulate systems: Does geometry really matter?," *Pharmaceutical Research*, vol. 26, no. 1, pp. 235–243, 2009.
- [215] L. Tang, T. M. Fan, L. B. Borst, and J. Cheng, "Synthesis and Biological Response of Size-Specific, Monodisperse Drug-Silica Nanoconjugates," *ACS Nano*, vol. 6, no. 5, pp. 3954–3966, 2012.
- [216] F. Lu, S. H. Wu, Y. Hung, and C. Y. Mou, "Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles," *Small*, vol. 5, no. 12, pp. 1408–1413, 2009.
- [217] A. Aderem, "How to eat something bigger than your head," *Cell*, vol. 110, no. 1, pp. 5–8, 2002.

- [218] E. D. Korn and R. a Weisman, "Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba* III. Electron microscopic study of the initial events," *J. Cell Biol.*, vol. 34, pp. 219–227, 1967.
- [219] M. K. Pratten and J. B. Lloyd, "Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro," *BBA - Gen. Subj.*, vol. 881, no. 3, pp. 307–313, 1986.
- [220] G. Sonavane, K. Tomoda, and K. Makino, "Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 66, no. 2, pp. 274–280, 2008.
- [221] R. Singh and J. W. Lillard, "Nanoparticle-based targeted drug delivery," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 86, no. 3, pp. 215–223, 2009.
- [222] E. Frohlich, "The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 5577–5591, 2012.
- [223] S. Mura, H. Hillaireau, J. Nicolas, B. L. D. C. Gueutin, S. Zanna, N. Tsapis, and E. Fattal, "Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 2591–2605, 2011.
- [224] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K. a Dawson, and S. Linse, "Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 7, pp. 2050–2055, 2007.
- [225] A. Albanese, P. S. Tang, and W. C. W. Chan, "The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–16, 2012.
- [226] K. Xiao, Y. Li, J. Luo, J. S. Lee, W. Xiao, A. M. Gonik, R. G. Agarwal, and K. S. Lam, "The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 32, no. 13, pp. 3435–3446, 2011.
- [227] J. Ma, P. Feng, C. Ye, Y. Wang, and Y. Fan, "An improved interfacial coacervation technique to fabricate biodegradable nanocapsules of an aqueous peptide solution from polylactide and its block copolymers with poly(ethylene glycol)," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 279, no. 4, pp. 387–392, 2001.
- [228] N. Khayata, W. Abdelwahed, M. F. Chehna, C. Charcosset, and H. Fessi, "Preparation of vitamin e loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor," *Int. J. Pharm.*, vol. 423, no. 2, pp. 419–427, 2012.
- [229] R. A. Kenley, M. O. Lee, T. R. Mahoney, and L. M. Sanders, "Poly(lactide-co-glycolide) Decomposition Kinetics in Vivo and in Vitro," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 20, pp. 2398–2403, 1987.
- [230] M. Dunne, O. I. Corrigan, and Z. Ramtoola, "Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles," *Biomaterials*, vol. 21, no. 16, pp. 1659–1668, 2000.

- [231] B. Stella, S. Arpicco, F. Rocco, V. Marsaud, J. M. Renoir, L. Cattel, and P. Couvreur, "Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules," *Int. J. Pharm.*, vol. 344, no. 1–2, pp. 71–77, 2007.
- [232] P. Johansen, Y. Men, R. Audran, G. Corradin, H. P. Merkle, and B. Gander, "Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives.," *Pharmaceutical research*, vol. 15, no. 7. pp. 1103–1110, 1998.
- [233] A. Breitenbach, Y. X. Li, and T. Kissel, "Branched biodegradable polyesters for parenteral drug delivery systems," *J. Control. Release*, vol. 64, pp. 167–178, 2000.
- [234] R. C. Mundargi, V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, and T. M. Aminabhavi, "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives," *J. Control. Release*, vol. 125, no. 3, pp. 193–209, 2008.
- [235] I. Bala, S. Hariharan, and M. N. V. R. Kumar, "PLGA Nanoparticles in Drug Delivery : The State of the Art," *Crit. Rev. Ther. Drug Syst.*, vol. 21, no. 5, pp. 387–422, 2004.