

2m 11.3284.8

Université de Montréal

Caractérisation d'un organogel à base d'un dérivé amphiphile de la L-alanine

par

Aude Motulsky

Faculté de pharmacie



Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Sciences pharmaceutiques
option technologie pharmaceutique

Mai 2005

© Aude Motulsky, 2005



QV

705

U58

2005

V. 006

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Mémoire intitulé :

Caractérisation d'un organogel à base d'un dérivé amphiphile de la L-alanine

présenté par :
Aude Motulsky

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. Huy Ong, président-rapporteur
Prof. Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche
Prof. Michel Lafleur, membre du jury

Résumé

Divers systèmes de libération prolongée des médicaments ont été développés au cours des dernières décennies. Parmi ceux-ci, les implants autoformants *in situ* sont des formulations liquides à température ambiante qui se solidifient après injection parentérale extravasculaire. Les organogélifiants, de petites molécules capables de gélifier un solvant organique, peuvent être à la base d'un système de libération prolongée. Six dérivés amphiphiles de la L-alanine ont été synthétisés. Leurs propriétés gélifiantes dans différentes huiles pharmaceutiques ont été évaluées par la méthode du tube inversé. Le mécanisme de gélification a été étudié par spectroscopie infrarouge, par analyse thermique différentielle et par texturométrie. Les gels à base de dérivés stéaroylé de la L-alanine dans l'huile de carthame ont été sélectionnés pour la poursuite de l'étude en raison de leur température de transition et de leur aspect macroscopique qui étaient optimaux. L'ajout de 10% à 20% v/v de *N*-méthyle pyrrolidone a permis d'inhiber partiellement la gélification à température ambiante et d'obtenir une formulation injectable et stable. La biocompatibilité des formulations a ensuite été évaluée après injection dans le tissu sous-cutané de rats. L'analyse histologique du site d'injection en fonction du temps a révélé une réaction inflammatoire chronique granulomateuse autour des vacuoles de gel, ce qui est la réponse normale à un implant biocompatible. Toutes les formulations se sont avérées biocompatibles et biodégradables au cours des 8 semaines de l'étude. Ce travail a démontré que les organogels à base de dérivés de la L-alanine et d'huile de carthame ont un potentiel de développement comme implant autoformant *in situ* pour la libération prolongée de médicaments.

Mots-clés : implants autoformants *in situ*, organogels, biocompatibilité, libération prolongée de médicaments

Abstract

In recent years, there has been a great deal of interest in developing parenteral long term drug delivery systems. Among them, *in situ*-forming implants are liquid at room temperature, and form a gel when injected in subcutaneous or intramuscular tissue. Organogelators, small molecules that have the fascinating ability to gelate organic solvent at low concentrations, have been proposed as a sustained delivery system. Six amphiphilic L-alanine derivatives were synthesized and their gelling ability was evaluated in different pharmaceutical oils by the inverse flow method. Gelation mechanism was investigated by infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry and texture analysis. Stearoyl ester derivatives were selected to develop an injectable formulation in safflower oil. In order to inject the formulation, an oil-miscible organic solvent that partially disrupts interactions between organogelator molecules at room temperature was added to the formulation. Biocompatibility of the formulation was evaluated after injection to rats. Histological analysis of the injection site revealed a granulomatous inflammatory reaction around the gel. Each formulation was demonstrated to be biocompatible and biodegradable after 8 weeks. This study demonstrates that *in situ*-forming organogels represent a potentially promising platform for sustained drug delivery.

Keywords: *in situ*-forming implant, biocompatibility, controlled drug release, organogel

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et des abréviations	x
Remerciements.....	xiii
CHAPITRE 1. Organogel : un implant autoformant <i>in situ</i> pour la libération prolongée de médicaments.....	1
1.1. Introduction.....	1
1.2. Systèmes de libération prolongée de médicaments.....	2
1.2.1. Implants autoformants <i>in situ</i>	3
1.2.1.1. Pâtes thermoplastiques.....	4
1.2.1.2. Réticulation de polymères <i>in situ</i>	6
1.2.1.3. Précipitation de polymères <i>in situ</i>	13
1.3. Organogels	18
1.3.1. Introduction	18
1.3.2. Définitions.....	19
1.3.3. Classification et méthodes de caractérisation.....	20
1.3.3.1. Organogels formés par des liaisons hydrogène	21
1.3.3.2. Organogels formés par des liaisons non hydrogène	22
1.3.3.3. Méthodes de caractérisation.....	26
1.3.4. Applications des organogels	30
1.3.4.1. Applications industrielles.....	30
1.3.4.2. Applications pharmaceutiques	31

CHAPITRE 2. La biocompatibilité des implants autoformants <i>in situ</i>.....	35
2.1. Introduction.....	35
2.2. La réaction inflammatoire.....	35
2.3. Caractéristiques d'un IAI biocompatible.....	39
2.4. Méthodes pour étudier la biocompatibilité des systèmes de libération prolongée de médicaments.....	40
2.5. Conclusion.....	42
2.6. But du projet.....	42
CHAPITRE 3. Article.....	43
3.1. Introduction.....	45
3.2. Materials and methods.....	47
3.2.1. Materials.....	47
3.2.2. Synthesis of ester derivatives.....	48
3.2.3. Synthesis of acid derivatives.....	50
3.2.4. Gelation temperature and gel characterization.....	50
3.2.5. Biocompatibility studies.....	53
3.3. Results and discussion.....	54
3.3.1. Characterization of the gels.....	54
3.3.2. Biocompatibility of <i>in situ</i> -forming implants.....	59
3.4. Conclusion.....	62
3.5. Acknowledgements.....	62
3.6. References.....	64
3.7. Figure Captions.....	68
CHAPITRE 4. Discussion.....	78
4.1. Synthèse des organogélifiants et caractérisation des gels.....	79
4.2. Biocompatibilité.....	89
CHAPITRE 5. Conclusion.....	93

BIBLIOGRAPHIE	xiii
ANNEXE 1 : Matériels et méthodes	xxviii

Liste des tableaux

CHAPITRE 3

Table I. Positions (wavenumbers in cm^{-1}) of the characteristic bands of organogelators in the solid state, gel state in safflower oil and in chloroform solution.

CHAPITRE 4

Tableau I : Séquence d'événements locaux à la suite de l'injection d'un biomatériau : le continuum de la réponse tissulaire 38

Tableau II : Tests de biocompatibilité que doit subir un implant à libération contrôlée selon le tissu dans lequel il est implanté. (+) requis; (-) non requis..... 41

Liste des figures

CHAPITRE 1, 2 et 4

- Figure 1.1.** Réticulation chimique d'un polymère contenant des groupements thiol sans polymérisation radicalaire. 8
- Figure 1.2.** Organisation micellaire des polymères diblocs ou triblocs ABA (1) et BAB (2) en solution aqueuse. A représente la portion hydrophile (PEO) et B, la portion hydrophobe du polymère (PPO, PLA, PLGA, PCL)..... 11
- Figure 1.3.** Suppression de la testostérone chez des chiens après l'injection s.c. du Eligard[®] (Atrigel[®]) comparativement au Lupron Dépôt[®] (microsphères) 15
- Figure 1.4.** Structure du SAIB. PM : 846 g/mol..... 16
- Figure 1.5.** *N*-lauroyle L-alanine comme agent gélifiant..... 21
- Figure 1.6.** OG dérivés de l'antracène (A), des stéroïdes (B) (couplé à l'antracène) ou de structure diverse (C). 22
- Figure 1.7.** Organisation de molécules amphiphiles avec un mélange d'eau et d'huile. Phase micellaire (A) et micellaire allongée (B), phase lamellaire (C) et phase cubique (D)..... 23
- Figure 1.8.** Structure du monopalmitate de glycérol, qui forme un organogel lorsqu'une certaine proportion d'eau est ajoutée au mélange. 24
- Figure 1.9.** Diagramme de phase du système MOG selon la proportion en eau. Phase micellaire inversée (L₂), phase lamellaire (L_α), phase cubique (C) et phase hexagonale inversée (HII)..... 24
- Figure 1.10.** Organogel à base d'une microémulsion..... 25
- Figure 1.11.** Détermination des températures de transition d'un OG constitué de 10% *p/v* de SAE dans l'huile de carthame par la méthode du tube inversé. 27
- Figure 2.1.** Évolution dans le temps des réactions inflammatoires aiguë et chronique, avec le développement de tissu de granulation et la réaction à corps étrangers à la suite de l'implantation d'un biomatériau..... 38
- Figure 4.1.** Spectre de RMN ¹H (A) et ¹³C (B) du LAM dans le CDCl₃..... 80

- Figure 4.2.** Diagrammes de phase des OG dans l'huile de soya (A), l'huile de maïs (B), l'oléate d'éthyle (C) et les TGCM (D) déterminés par la méthode du tube inversé. T_{GL} (ligne pointillée) ou T_{LG} (ligne pleine) de LAM (carré), LAE (triangle), SAM (cercle), SAE (losange) et LA (triangle inversé)..... 82
- Figure 4.3.** Viscosité de formulations de 7.5% *p/v* de SAM (A) et de 10% *p/v* de SAE (B) dans l'huile de carthame avec 20% *v/v* de NMP après 1 jour (symboles vides) et 6 mois de conservation (symboles pleins) à 4°C (lignes pleines) et 20 °C (lignes pointillées)..... 86
- Figure 4.4.** Analyse de texture de gels de SAM (A) et SAE (B) dans l'huile de carthame en fonction de la concentration en OG. Moyenne \pm écart-type (n=3)..... 87
- Figure 4.5.** Coupe histologique du tissu s.c. d'un rat 28 jours après l'injection de 250 μ L d'un organogel constitué de 7.5% *p/v* de SAM dans l'huile de carthame avec 20% *v/v* NMP (encadré)..... 89

CHAPITRE 3

Fig. 1: Structure of amphiphile organogelators derived from L-alanine amino acid (framed).

Fig. 2: T_{GS} (dotted lines, open symbols) and T_{SG} (solid lines and symbols) as a function of gelator concentration in safflower oil obtained by the inverse flow method. SA phase diagram was not measured by the inverse flow method since its T_i exceeded 80°C. SAM (\circ , \bullet), SAE (\diamond , \blacklozenge), LAM (\square , \blacksquare), LAE (\triangle , \blacktriangle) and LA (∇ , \blacktriangledown).

Fig. 3: (A) Representative thermograms of stearyl methyl (1) and ethyl (2) ester derivatives and lauroyl methyl ester derivative (3) in safflower oil. (B) Enthalpies of endothermic (open columns) and exothermic (closed columns) transitions of 10% (*w/v*) gels of L-alanine derivatives in safflower oil. Mean enthalpy \pm S.D. (n=4).

Fig. 4: (A) Exothermic transition temperature T_{SG} of safflower gels as a function of the organogelator concentration obtained from cooling DSC scans. SAM (\circ), SAE (\diamond), SA (\star), LAM (\square), LAE (\triangle) and LA (∇). (B) Comparison of T_{SG} of methyl ester derivative gels in safflower oil obtained by the inverse flow method (solid symbol) and DSC (open symbol). SAM (\circ , \bullet) and LAM (\square , \blacksquare).

Fig. 5: Thermal evolution, as probed by FT-IR spectroscopy of (A, B) SAE and (C, D) SAM 10% (*w/v*) gel in safflower oil. Changes in amide I and II bands (A, C) and in the NH stretching region (B, D) from 20 to 80°C.

Fig. 6: Proportion of free amide bonds, as determined from the relative intensity of the amide I component located at $1,686\text{ cm}^{-1}$ of SAM (●) and SAE (◆), as a function of temperature.

Fig. 7: Optical micrographs of s.c. sites injected with 7.5% (*w/v*) SAM in safflower oil formulation as a function of time. (A) Day 3 post-injection, a band of mononuclear leukocytes encircles the gel, and small vessels are observed (small arrow). (C) Higher magnification shows some PMN and FBGC beginning to form (arrow head). (B, D) Day 7 post-injection, the gel gradually degrades and fragments into discrete multifocal areas. (E, G) Two weeks and (F, H) 4 weeks after injection, the tissue response evokes a granulomatous inflammatory reaction, with active phagocytosis around vacuoles (arrow).

Fig. 8: Optical micrographs of s.c. sites injected with 7.5% (*w/v*) SAM in safflower oil formulation after (A, C) 6 and (B, D) 8 weeks.

Liste des sigles et des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ASB	Albumine sérique bovine
ATD	Analyse thermique différentielle
CGCE	Cellules géantes à corps étrangers
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
OE	Oléate d'éthyle
EPO	Érythropoïétine
FDA	Food and Drug Administration
fig.	Figure
FT-IR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
G'	Module élastique
G''	Module de perte
i.m.	Intra-musculaire
i.v.	Intra-veineux
IAI	Implant autoformant <i>in situ</i>
IL	Interleukine
INF	Interféron
IPM	Myristate d'isopropyle
IPP	Palmitate d'isopropyle
ISO	International Standard Organization
LA	<i>N</i> -lauroyle L-alanine

LAE	<i>N</i> -lauroyle éthoxy-L-alanine
LAM	<i>N</i> -lauroyle méthoxy-L-alanine
LHRH	Gonadolibérine
MA	Maladie d'Alzheimer
MOG	Monooléate de glycérol
MPG	Monopalmitate de glycérol
NMP	<i>N</i> -Méthyle pyrrolidone
OBM	Organogel à base de microémulsions
OG	Organogélifiant
PA	Principe actif
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PEO	Poly(oxyde d'éthylène)
PLA	Poly(acide lactique)
PLC	Poly(acide lactique- <i>co</i> -caprolactone)
PLGA	Poly(acide lactique- <i>co</i> -acide glycolique)
PM	Poids moléculaire
PMN	Leucocytes polymorphonucléés
PNIPAAM	Poly(<i>N</i> -isopropyl acrylamide)
POE	Poly(orthoester)
PPO	Poly(oxyde de propylène)
rhGH	Hormone de croissance humaine recombinante
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s.c.	Sous-cutané
SA	<i>N</i> -stéaroyle L-alanine

SAE	<i>N</i> -stéaroyle éthoxy-L-alanine
SAIB	acétate d'isobutyrate de sucrose
SAM	<i>N</i> -stéaroyle méthoxy-L-alanine
SC	<i>Stratum corneum</i>
T _f	Température de fusion
t _{1/2}	Temps de demi-vie
E/H	Eau dans l'huile
TGCM	Triglycérides à chaînes moyennes
TGI	Tractus gastro-intestinal
T _{GL}	Température de transition gel-liquide
TNF- α	Tumor necrosis factor α
T _{LG}	Température de transition liquide-gel
T _t	Température de transition
ΔH	Enthalpie
σ	Contrainte de cisaillement oscillatoire

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur, Jean-Christophe Leroux, pour la confiance qu'il m'a accordée, de même que pour le temps et l'énergie qu'il a consacrés à mon apprentissage et à la réalisation de ce projet. Je voudrais aussi remercier Anne-Claude Couffin-Hoarau de m'avoir initié aux organogels et pour ses précieux conseils, de même que Didier Hoarau pour la direction de mes travaux au sein de la compagnie Ethypharm. Je remercie également Michel Lafleur pour sa disponibilité et sa collaboration au projet.

De plus, ce projet n'aurait pu être mené à terme sans la collaboration précieuse de plusieurs personnes : Thierry Marris, Victor Kokta, Christiane Girard, Christian Gravel, Denis Rodrigue, Jean-Pierre Benoît et Frank Boury. De même, je tiens à remercier mes collègues de laboratoire; particulièrement Marie-Andrée Yessine et Marie-Christine Jones pour leurs commentaires constructifs à la rédaction de ce mémoire, Geneviève Gaucher, David Ghattas, Joanna Rossi et Anda Vintiloiu pour leurs judicieux conseils sur la langue anglaise ainsi que Annabelle Dubé, Eve Ruel-Gariépy, Claire Jarry, Emmanuelle roux, Marie-Hélène Dufresne, Pierre Simard, Nabil Khalid et Mylène Beaudoin pour leur collaboration. En plus, je remercie profondément François Plourde, pour sa contribution au projet avec une énergie constante, puis Elvire Fournier et Geneviève Gaucher, pour leur soutien moral. Enfin, je remercie les membres du jury, soient les professeurs Michel Lafleur et Huy Ong.

Finalement, un remerciement particulier à ma famille et mes amis, notamment Claude Lapointe, Catherine Lapointe, Marie-Lou Rancourt, Sarah Simard, Geneviève Leclerc, ainsi que Jean-Marc Lambert. À vous tous, merci.

CHAPITRE 1. Organogel : un implant autoformant *in situ* pour la libération prolongée de médicaments

1.1. Introduction

La grande majorité des médicaments sont traditionnellement administrés par la voie orale. Cependant, de nouvelles voies d'administration sont nécessaires au regard de l'évolution des technologies et des traitements disponibles. En effet, les progrès récents en biotechnologie ont entraîné l'émergence de molécules thérapeutiques ayant une structure complexe, telles que des protéines ou des peptides, voire même des fragments d'ADN (Orive, Hernandez, *et al.* 2003). Actuellement, environ 700 molécules issues des biotechnologies sont en étude clinique aux États-Unis (Dal Monte, Kathy, *et al.* 2002). Ces médicaments ont une faible biodisponibilité orale étant donné leur taille (plus de 500 g/mol) et leur susceptibilité à la dégradation enzymatique au niveau du tractus gastro-intestinal (TGI) et du foie (effet de premier passage hépatique). Par ailleurs, pour certaines populations, la prise quotidienne de comprimés ou de capsules est pénible et on observe une diminution de l'observance plus le nombre de prises est élevé (Claxton, Cramer, *et al.* 2001). Les personnes âgées vivant seules ou souffrant de troubles cognitifs (maladie d'Alzheimer, démence) (Kane, Eerdeken, *et al.* 2003), les patients qui ne ressentent pas les bénéfices directs de leur traitement (antihypertenseur, hypolipidémiant, etc.) et ceux ayant des problèmes de dysphagie (soins palliatifs) n'en sont que quelques exemples. Il s'ensuit qu'un échec thérapeutique peut être lié à une observance inadéquate plutôt qu'à une inefficacité du traitement. Les systèmes de libération prolongée de médicaments ont vu le jour en réponse à ces obstacles inhérents à la voie orale. Il s'agit de la méthode idéale pour administrer un principe actif (PA) au patient pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines, en une seule dose. Cependant, le système doit libérer le médicament graduellement et maintenir une concentration plasmatique stable et thérapeutique. On évite ainsi les fluctuations des niveaux plasmatiques, ce qui assure un meilleur contrôle de l'activité thérapeutique et minimise la toxicité.

1.2. Systèmes de libération prolongée de médicaments

Un système de libération prolongée de médicaments agit comme un réservoir qui libère une dose adéquate sur un intervalle de temps donné. Pour ce faire, les voies transdermique et parentérale sont les plus prometteuses. Divers timbres transdermiques sont actuellement commercialisés, tels que l'Ortho-Evra[®], un timbre contraceptif qui libère le norelgestromine et l'éthinyl oestradiol pendant 1 semaine. Cependant, pour des molécules hydrophiles ou de poids moléculaire (PM) élevé, la voie transdermique pose problème puisque le *stratum corneum* (SC), qui est très lipophile, constitue une barrière importante à leur absorption. Ainsi, la voie parentérale semble la plus appropriée pour l'administration prolongée de la plupart des molécules. De nombreux systèmes de libération de médicaments ont été mis au point pour l'administration intraveineuse (i.v.) de PA. Ils ont une petite taille (inférieure à 200 nm) (Allen et Cullis 2004) et rassemblent les micelles, les liposomes, les nanoparticules (p. ex. nanoparticules lipidiques solides) (Muller, Mader, *et al.* 2000) et les transporteurs macromoléculaires solubles (Duncan 2003). Cependant, bien que ces véhicules permettent d'obtenir une meilleure solubilité de la drogue, d'améliorer la pharmacocinétique de molécules labiles ou de cibler un tissu en particulier, ils sont peu utiles comme système de libération prolongée (Allen et Cullis 2004). En effet, leur temps de circulation dans le sang est habituellement limité à quelques heures, puisqu'ils sont rapidement éliminés de la circulation sanguine par les reins et le foie.

Pour obtenir la libération soutenue d'un médicament pendant plusieurs semaines, l'implantation du dispositif dans les tissus mous (sous-cutané (s.c), intramusculaire (i.m.) ou intradermique) est idéale, bien qu'une injection dans l'espace intrapéritonéal ou intrathécale soit également possible. Ces systèmes peuvent servir à un traitement local (anticancéreux, anesthésiques, anti-inflammatoires, etc.) ou systémique. Au début des années quatre-vingt, les premiers implants polymères ont été commercialisés; Zoladex[®] (goséréline acétate/poly(acide lactique-co-glycolique) [PLGA]) pour le traitement du cancer de la prostate (biodégradable), et Norplant[®] (lévonorgestrel/silicone), qui avait un effet contraceptif pendant 5 ans (non biodégradable) (Tipton et Dunn 2000). Ce dernier produit a été retiré du marché à la suite de problèmes liés au développement d'une fibrose autour de l'implant, ce qui rendait sa localisation difficile au moment du retrait.

De plus, l'insertion de ce type d'implant pouvait être douloureuse pour le patient puisqu'un trocart de 10G à 16G devait être utilisé. Les microsphères ont ensuite été développées comme système de libération prolongée de médicaments (Sinha et Trehan 2003). Les microsphères sont des particules de polymères solides, biodégradables et injectables avec une seringue. Les principaux polymères utilisés sont les polyesters, tels que le PLGA et le poly(acide lactique) (PLA), maintenant reconnus comme étant biodégradables et biocompatibles (Anderson et Shive 1997). Plusieurs produits à base de microsphères de PLGA sont commercialisés; notamment, le Lupron Dépôt[®], qui libère l'acétate de leuprolide pendant 3 à 6 mois, ou encore le Risperdal-Consta[®], qui libère la rispéridone pendant 2 semaines. Cependant, les microsphères présentent divers inconvénients. Par exemple, la méthode de préparation d'une formulation stable et stérile est complexe, et peut entraîner la dégradation d'un PA fragile. De plus, elles doivent être reconstituées avant l'emploi. Enfin, les microsphères peuvent migrer de leur site d'injection, ce qui entrave l'extraction si l'on désire interrompre subitement le traitement. Au cours des dernières années, un nouveau type d'implants injectables a vu le jour; les implants autoformants *in situ* (IAI), qui seront présentés ici en détail.

1.2.1. Implants autoformants *in situ*

Les IAI regroupent divers systèmes qui ont la particularité d'être liquides à température ambiante et de former un implant solide ou semi-solide une fois injectés (Packhaeuser, Schnieders, *et al.* 2004). Ils sont simples à préparer et faciles à localiser lors d'un retrait éventuel. La majorité des systèmes sont constitués de polymères, bien que de petites molécules puissent aussi former des implants *in situ* (Tipton et Dunn 2000). Les différents types d'IAI seront classifiés selon le mécanisme de formation du dépôt : les pâtes thermoplastiques, la réticulation chimique ou physique de polymères *in situ* et la précipitation de molécules *in situ*. Les IAI à base d'organogels seront présentés dans la section 1.3.

1.2.1.1. Pâtes thermoplastiques

Les pâtes thermoplastiques désignent des polymères qui sont injectables une fois fondus, formant un dépôt semi-solide lors du refroidissement à la température corporelle. Ces polymères ont une température de fusion (T_f) comprise entre 25°C et 65°C, un PM et une température de transition vitreuse peu élevés (Hatefi et Amsden 2002). Lorsque le polymère est chauffé au-dessus de la T_f , il est suffisamment liquide pour être injecté et l'incorporation du PA peut se faire par simple mélange avec le polymère fondu, sans aucun solvant (Packhaeuser, Schnieders, *et al.* 2004). En général, la viscosité intrinsèque de la solution de polymère doit être supérieure à 0,05 dL/g afin d'obtenir un implant qui ne se décharge pas trop rapidement de son PA. Toutefois, la viscosité doit être inférieure à 0,8 dL/g pour permettre l'injection à travers une aiguille 22G (Bezwada 1995; Hatefi et Amsden 2002). Les principaux matériaux utilisés à cette fin sont des polymères ou des copolymères des monomères suivants : acide lactique et glycolique, ϵ -caprolactone et orthoesters. Ces polymères peuvent aussi être mélangés avec du poly(oxyde d'éthylène) (PEO) ou de l'albumine afin d'accélérer la libération du PA incorporé. Notons que Zhang *et al.* (Zhang, Jackson, *et al.* 1996) ont évalué la libération de paclitaxel (PM : 853 g/mol) à partir de polymères triblocs de PLA-PEO-PLA pour l'injection intratumorale. Avec 20% et 30% de PEO, la viscosité intrinsèque du polymère se situe autour de 1 dL/g, alors qu'elle diminue à environ 0,3 dL/g lorsque la proportion en PEO est supérieure à 40%. Cependant, les polymères ayant une plus grande quantité de PEO se dissolvent rapidement dans l'eau, entraînant une libération rapide des médicaments incorporés. Ainsi, l'évaluation de la cinétique de libération *in vitro* n'a été effectuée qu'avec les formulations de PLA-PEO-PLA contenant 20% et 30% de PEO, bien que leur viscosité intrinsèque ne soit pas optimale pour l'injection. Après 30 jours, seulement 2% et 17% du paclitaxel incorporé avait été respectivement libéré des gels de 20% et 30%. De même, Winternitz *et al.* (Winternitz, Jackson, *et al.* 1996) ont évalué la libération *in vitro* de paclitaxel à partir d'une pâte de poly(ϵ -caprolactone) (PCL). Selon la concentration en paclitaxel contenue dans la formulation, la proportion de médicament libérée après 20 jours était de 5% à 20%. Ces pâtes thermoplastiques permettent donc de soutenir la libération d'un PA hydrophobe pendant une longue période. Malheureusement, elles doivent être chauffées à une température

d'environ 60°C afin d'être injectées, ce qui risque de causer de la douleur, voire même de la nécrose, au site d'administration. Cet effet peut aussi entraîner la formation d'un tissu fibreux autour de l'implant, ce qui pourrait ralentir de façon imprévisible la libération du PA. Pour pallier ces inconvénients, des poly(orthoesters) (POE) de faibles masses molaires, ayant une T_f comprise entre 25°C et 45°C, ont été développés comme pâtes thermoplastiques (Heller, Barr, *et al.* 2002; van de Weert, van Steenberg, *et al.* 2002). On obtient alors la fusion du polymère à une température moins élevée, ce qui devrait rendre l'injection moins douloureuse.

Par ailleurs, la vitesse de libération des molécules à partir des pâtes thermoplastiques dépend de la taille du PA incorporé. En effet, si l'on compare les études, il apparaît que les petites molécules sont libérées plus rapidement que les macromolécules lorsque l'on utilise le même véhicule. Barr *et al.* (Barr, Woodburn, *et al.* 2002) ont proposé l'utilisation de POE ayant une température de fusion inférieure à 45°C pour l'administration prolongée de la mépivacaïne (PM : 249 g/mol), un anesthésique soulageant la douleur postchirurgicale. Après injection s.c. à des chiens, cette molécule de faible PM a été libérée rapidement, puisqu'elle était décelable dans le sang pendant seulement 72-96 h (temps de demi-vie ($t_{1/2}$) : 17 h). Van de Weert *et al.* (van de Weert, van Steenberg, *et al.* 2002) ont déterminé que la α -lactalbumine (PM : 15 000 g/mol) pouvait être libérée *in vitro* pendant plus de 10 jours à partir de pâtes de POE, avec un effet « *burst* » minimal. Ces exemples illustrent bien le fait que les petites molécules représentent un défi supplémentaire à la mise au point de formulations à libération prolongée. De manière générale, les pâtes thermoplastiques sont des systèmes polymères prometteurs pour la libération prolongée de médicaments. Il manque cependant d'études de biocompatibilité et de libération *in vivo* pour soutenir leur potentiel de développement chez l'humain.

1.2.1.2. Réticulation de polymères *in situ*

In situ, la solidification d'un système peut se faire par la réticulation des chaînes de polymères entre elles. À température ambiante, les chaînes de polymère glissent les unes sur les autres, et le mélange est liquide. Lors de l'injection, le système se solidifie à la suite de la formation de liaisons covalentes ou d'interactions physiques entre les chaînes de polymères. Les systèmes seront ici classés selon la nature de la réticulation.

1.2.1.2.1. Réticulation chimique

La réticulation chimique implique l'établissement d'une liaison covalente entre deux chaînes de polymère (ou d'oligomères). Ce type de réaction chimique nécessite la présence d'un amorceur. Ce dernier peut être ajouté au mélange juste avant l'injection, ou être incorporé dans la formulation sous une forme inactive pour ensuite être activé sous l'effet de la chaleur ou de la lumière. La réticulation chimique résultant habituellement d'une polymérisation radicalaire, seuls les polymères possédant des liaisons doubles libres peuvent être utilisés (Burkoth et Anseth 2000; Lu et Anseth 1999). Dunn *et al.* (Dunn, English, *et al.* 1994) ont développé un oligomère constitué d'acide lactique ou glycolique et de ϵ -caprolactone avec des terminaisons ester acrylique. La réticulation a été initiée par l'ajout de peroxyde de benzoyle quelques instants avant l'injection. Le système s'est alors solidifié graduellement en 5 à 30 minutes (Moore, Norton, *et al.* 1995). Moore *et al.* (Moore, Norton, *et al.* 1995) ont évalué la cinétique de libération du flurbiprofène (PM : 244 g/mol) *in vitro* à partir de ce type d'implant. L'ajout de 5% de flurbiprofène à la formulation n'a pas modifié la réticulation *in situ*. Après une libération initiale rapide (près de 40% de son contenu libéré en 24 h), due au délai de solidification de l'implant, le système a libéré graduellement 80% de son contenu pendant 7 jours.

L'activation de l'initiateur peut aussi se faire au moyen d'une source lumineuse. Hubbell *et al.* (Hubbell, Pathak, *et al.* 1995) ont mis au point un hydrogel photopolymérisable constitué d'un macromère présentant au moins 2 groupements polymérisables (PEO-glycolyl acrylate) et d'un activateur photosensible (éosine). Le

système injecté dans le tissu s.c. se solidifie rapidement *in situ* lorsqu'une source lumineuse (ultraviolette ou visible) est dirigée vers le site d'injection. West et Hubbell (West et Hubbell 1995) ont évalué la libération *in vitro* de diverses protéines à partir de ces gels. Citons notamment l'insuline (PM : 5 800 g/mol) et l'albumine sérique bovine (ASB) (PM : 68 000 g/mol) qui ont respectivement été libérées pendant près de 2 et 5 jours (90% de la dose incorporée). Une contrainte limite cependant son utilisation, puisque le site d'injection doit être accessible à la lumière.

Le risque de modification chimique du PA incorporé, et la perte d'activité thérapeutique qui s'ensuit, constitue l'un des principaux problèmes associé à la polymérisation radicalaire. Afin de pallier à cet obstacle, Qiu *et al.* (Qiu, Stefanos, *et al.* 2003) ont proposé une méthode de réticulation chimique sans polymérisation radicalaire utilisant un copolymère de PEO avec des groupements thiols. Les groupements thiols se réticulent en 2 à 3 minutes lors de l'ajout de vinylsulfones (fig. 1.1). L'hydrogel formé, composé à 90% d'eau, a été évalué pour l'administration d'érythropoïétine (EPO) chez le lapin. L'EPO (PM : 34 000 g/mol) est une glycoprotéine sécrétée par le rein qui stimule la production de globules rouges par la moelle osseuse. Après injection s.c. du système, les concentrations plasmatiques en EPO sont demeurées dans l'intervalle thérapeutique pendant 14 jours, ce qui a entraîné une augmentation de l'hématocrite de 50% après cette période. Cette étude a démontré que la protéine peut maintenir son intégrité, malgré la réticulation chimique que subit le polymère. Par contre, ce gel n'est pas biodégradable et demeure dans le tissu s.c. 6 mois après son injection, ce qui constitue un inconvénient majeur. Finalement, la méthode de réticulation chimique présente un autre problème; les amorceurs peuvent être toxiques s'ils sont en contact avec l'organisme. Ainsi, la réticulation physique des polymères semble une meilleure alternative pour une application *in vivo*.

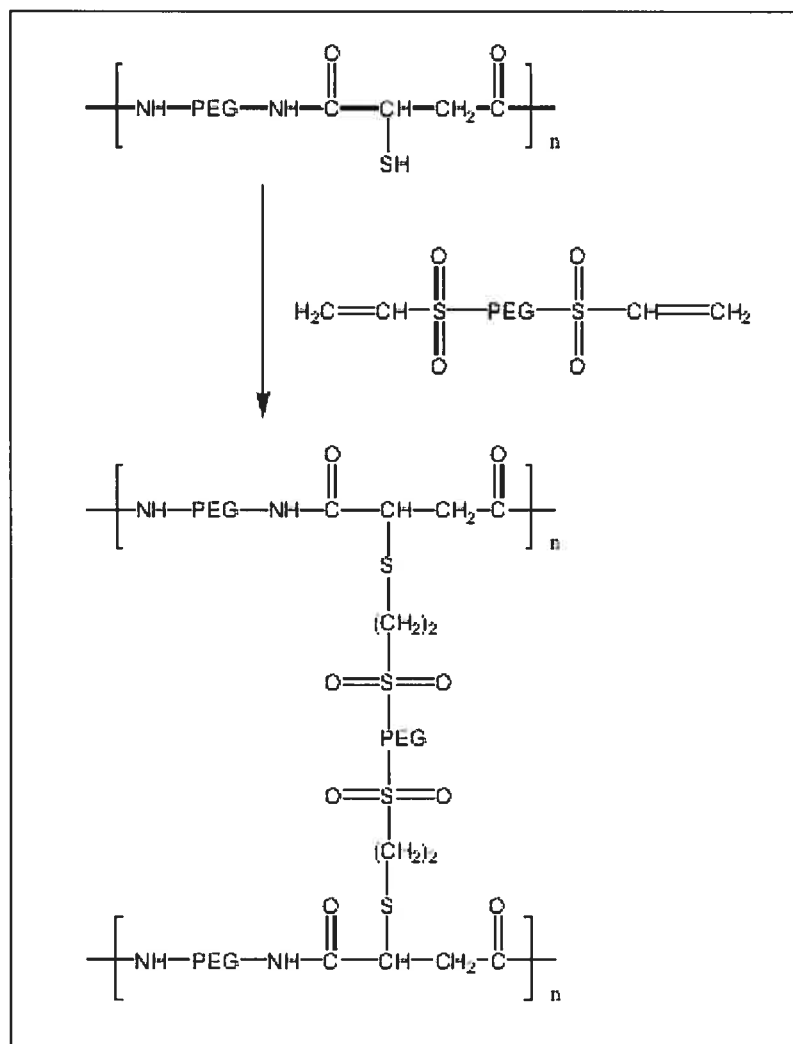


Figure 1.1. Réticulation chimique d'un polymère contenant des groupements thiol sans polymérisation radicalaire. Tiré de (Qiu, Stefanos, *et al.* 2003).

1.2.1.2.2. Réticulation physique

La réticulation physique résulte de la formation de liaisons non covalentes, principalement des interactions hydrophobes et électrostatiques, entre les chaînes de polymère, ce qui entraîne la solidification du système. Par exemple, certains polymères peuvent être liés les uns aux autres par des cations mono ou divalents, comme c'est le cas pour l'alginate, un copolymère d'acide β -D-manuronique et d'acide α -L-guluronique. En présence de calcium, les chaînes d'alginate s'assemblent pour former un réseau tridimensionnel. Pour entraîner la gélification *in situ*, Cui *et al.* (Cui et Messermith 1998) ont emmagasiné le calcium dans des liposomes thermosensibles, constitués de 90% de 1,2-bis-(palmitoyle)-*sn*-glycéro-3-phosphocholine et de 10% de 1,2-bis(myristoyle)-*sn*-glycéro-3-phosphocholine, dispersés dans une solution d'alginate sodique. Cette composition en phospholipides a été sélectionnée pour que la T_f des chaînes de lipides se situe à 37°C. En-dessous de cette température, la bicouche de phospholipides est relativement imperméable aux ions multivalents, et le calcium est emprisonné dans les liposomes. Au-dessus de cette température, la membrane liposomale est déstabilisée et le calcium est alors libéré. Ce type de système a été étudié pour la libération *in vitro* de métronidazole (PM : 171 g/mol) (Packhaeuser, Schnieders, *et al.* 2004). Toutefois, le processus de gélification est ralenti puisqu'il dépend de la vitesse de diffusion du calcium à travers la membrane liposomale. Ainsi, bien que la libération du métronidazole ait été maintenue pendant 7 jours, 60% de la dose a été libérée pendant les premières 24 h.

Par ailleurs, divers polymères diblocs ou triblocs ont la propriété de former un gel en milieu aqueux en fonction de la température. Bien que le mécanisme de gélification ne soit pas clairement élucidé, il serait dû à la déshydratation de la portion hydrophobe du polymère, qui survient lorsque la température est augmentée (Bohorquez, Koch, *et al.* 1999). L'entropie du système favoriserait alors la formation de micelles, qui seraient de plus en plus nombreuses à mesure que la température augmente (Packhaeuser, Schnieders, *et al.* 2004). À partir d'une certaine concentration, les micelles entreraient en contact les unes avec les autres, immobilisant le solvant dans le réseau formé (fig. 1.2). En général, pour avoir une température de transition liquide-gel

(T_{LG}) autour de 30°C, le polymère doit être dissous dans un solvant aqueux à une concentration de 15% à 35% *p/p*. Parmi ces polymères, les plus connus sont les poloxamers, des polymères triblocs de type ABA avec le PEO comme segment hydrophile (A) et le poly(oxyde de propylène) (PPO) comme segment hydrophobe (B) (Katakam, Ravis, *et al.* 1997; Veyries, Couarraze, *et al.* 1999; Wenzel, Balaji, *et al.* 2002). Sosnik et Cohn (Sosnik et Cohn 2004) ont observé la libération *in vitro* d'une petite molécule, le métronidazole, à partir du poloxamer 407 (PEO₉₉-PPO₆₇-PEO₉₉) à 30% *p/p*. Le gel n'a pu soutenir la libération sur une longue période puisque 100 % de la dose a été libérée en moins de 50 h. Par ailleurs, Katakam *et al.* (Katakam, Ravis, *et al.* 1997) ont évalué la cinétique de libération d'une macromolécule, l'hormone de croissance humaine recombinante (rhGH, PM : 22 000 g/mol) à partir d'un gel de 36% *p/p* de poloxamer 407 après injection s.c. ou i.m. chez le rat. Une fois encore, la libération du PA a été relativement rapide, 90% de la dose ayant été libérée en 4 jours, malgré le PM élevé de la molécule incorporée. Le réseau poreux que constituent ces hydrogels explique la diffusion rapide des molécules. Ce type de gel ne semble donc pas constituer un système adéquat pour une thérapie s'échelonnant sur plusieurs semaines. De plus, l'innocuité des poloxamers suscite des questions ; ils ne sont pas biodégradables, et ont entraîné diverses modifications du métabolisme des lipides chez le rat, telles que l'hypertriglycémie et l'hypercholestérolémie (Wasan 2003).

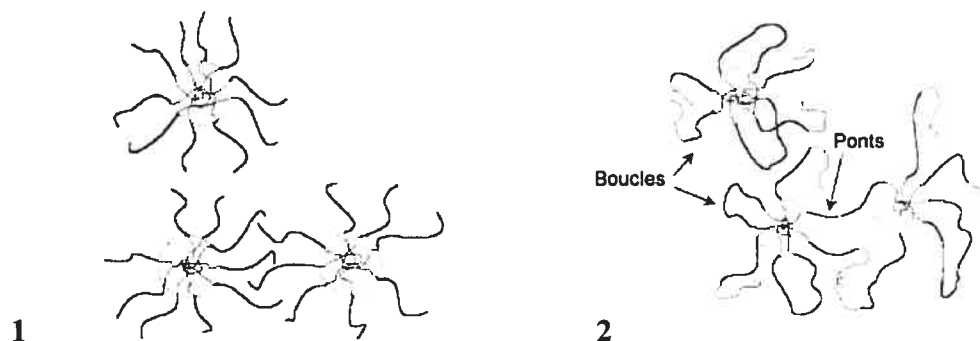


Figure 1.2. Organisation micellaire des polymères diblocs ou triblocs ABA (1) et BAB (2) en solution aqueuse. A représente la portion hydrophile (PEO) et B, la portion hydrophobe du polymère (PPO, PLA, PLGA, PCL). Lorsque les micelles deviennent suffisamment nombreuses, elles se touchent et forment un réseau tridimensionnel. Adapté de (Packhaeuser, Schnieders, *et al.* 2004) et reproduit avec l'autorisation de Elsevier.

Suite aux problèmes identifiés avec les poloxamers, d'autres systèmes à base de polymères biodégradables, principalement des polymères diblocs ou triblocs de PEO et de PLA, PLGA et/ou PCL, ont été mis au point (Chen, Pieper, *et al.* 2005; Jeong, Bae, *et al.* 2000; Jeong, Bae, *et al.* 1997; Kissel, Li, *et al.* 2002). La T_g du système peut être modifiée selon la composition et la concentration du copolymère. Jeong *et al.* (Jeong, Bae, *et al.* 1999; Jeong, Bae, *et al.* 1997) ont remplacé le PPO des poloxamers par du PLGA pour former un polymère tribloc de PEO-PLGA-PEO (PM : 550-2810-550 g/mol). À des concentrations de 20% à 30% *p/p*, ce polymère est liquide à température ambiante et gélifie à température corporelle. Jeong *et al.* (Jeong, Bae, *et al.* 2000) ont démontré que l'implant maintenait son intégrité pendant 1 mois après injection s.c. chez le rat. *In vitro*, la libération de kétoprofen (PM : 254 g/mol) ou de spironolactone (PM : 416 g/mol) a été soutenue pendant 5 et 50 jours, respectivement (Jeong, Bae, *et al.* 2000). Ceci a permis de démontrer que l'hydrophilie du PA incorporé avait une influence sur la cinétique de libération. En effet, le kétoprofen est relativement hydrophile et diffuse donc rapidement à travers l'hydrogel alors que la spironolactone, plus hydrophobe, est mieux retenue dans les domaines de PLGA. Cette étude démontre

l'importance d'adapter les systèmes afin de parvenir à une libération soutenue de molécules hydrophiles.

Récemment, la compagnie MacroMed Inc. a mis au point un autre type de polymère tribloc BAB constitué de PLGA-PEO-PLGA. Tout comme les polymères triblocs ABA, la formation de micelles (reliées les unes aux autres par des ponts à mesure que leur concentration augmente [fig. 1.2-2]) serait également le mécanisme assurant la gélification de ce type de système (Packhaeuser, Schnieders, *et al.* 2004). Cette approche a mené à la mise au point du ReGel[®]. Ce gel est préparé par la dissolution de 20% à 30% *p/p* de PLGA-PEO-PLGA (PM : 1500-1000-1500 g/mol) dans un tampon salin et possède une T_g avoisinant les 30°C (Zentner, Rathi, *et al.* 2001). Zentner *et al.* ont démontré que le ReGel[®] permettait de soutenir la libération de paclitaxel *in vitro* pendant 50 jours. Ce produit, commercialisé sous le nom d'Oncogel[®], est évalué pour l'administration intratumorale de paclitaxel. Le ReGel[®] a également été étudié pour la formulation de protéines, notamment l'insuline (Zentner, Rathi, *et al.* 2001). Après injection s.c. chez le rat, l'insuline a été libérée pendant au moins 15 jours (Kim, Choi, *et al.* 2001). Cependant, jusqu'à présent, ces gels ont été principalement conçus pour la libération de molécules hydrophobes ou de macromolécules.

Enfin, la différence de pH peut aussi entraîner une réticulation physique. Les systèmes basés sur ce mécanisme sont principalement étudiés pour l'administration orale puisque le pH varie selon la région du TGI. Toutefois, divers polymères sensibles au pH ont été évalués comme systèmes de libération prolongée injectables. Ismail *et al.* (Ismail, Napaporn, *et al.* 2000) ont proposé une solution de 2% *p/p* de Carbopol[®] comme IAI pour la libération d'acide désoxyribonucléique (ADN). Le Carbopol[®] est un dérivé du poly(acide acrylique) dont le pKa se situe autour de 6 (Singla, Chawla, *et al.* 2000). À pH acide, il forme une solution aqueuse de faible viscosité grâce aux nombreux groupements carboxyliques protonés présents dans sa structure (Curran, Ayes, *et al.* 2002). Lorsque le pH augmente, les groupements carboxyliques s'ionisent (déprotonation) et se repoussent, ce qui entraîne le déploiement du polymère et la formation d'un hydrogel visqueux (Singla, Chawla, *et al.* 2000). L'ajout d'hydroxypropylméthylcellulose au mélange diminue la douleur lors de l'injection, sans compromettre les propriétés de gélification du Carbopol[®] (Ismail, Napaporn, *et al.*

2000). Les auteurs ont évalué la libération d'ADN *in vitro* à partir de ces gels en fonction du pH. L'intégrité de la molécule d'ADN a été maintenue, mais la libération a été rapide avec 90% et 60% de la dose libérée après 24 h à pH 6 et 7.4, respectivement.

1.2.1.3. Précipitation de polymères *in situ*

La précipitation d'un polymère *in situ* est une autre méthode pour obtenir un IAI. Le polymère précipite soit en réponse au changement de température ou à la suite de la diffusion d'un solvant *in situ*. Plusieurs polymères ont une solubilité différente dans un solvant selon la température. Toutefois, l'utilisation d'un polymère ayant un point de trouble autour de la température corporelle est privilégiée afin d'assurer une précipitation rapide suite à l'injection. Le poly(*N*-isopropyl acrylamide) (PNIPAAM) en est un exemple, puisque son point de trouble est de 32°C (Heskins et Guillet 1968). Cette T_t peut être modifiée par l'ajout de sels ou de surfactifs, ou par la copolymérisation avec d'autres monomères (p. ex. acide acrylique). Cependant, le PNIPAAM a démontré une toxicité cellulaire et la capacité d'activer les plaquettes s'il est en contact avec le sang, ce qui rend son approbation par la *Food and Drug Administration* (FDA) peu probable (Hatefi et Amsden 2002). De plus, ce polymère n'est pas biodégradable.

D'autre part, certains polymères insolubles dans l'eau peuvent être solubilisés dans un solvant organique miscible à l'eau. Lors de l'injection, le solvant diffuse dans les tissus environnants, entraînant la précipitation du polymère. En principe, le médicament est emprisonné lors de la précipitation du polymère, bien qu'une certaine quantité puisse diffuser avec le solvant organique (effet «*burst*»). Les polymères les plus utilisés sont le PCL, le PLA, le poly(acide glycolique) et leurs copolymères, dissous à des concentrations de 30% à 70% *p/p* dans des solvants tels que la *N*-méthyle pyrrolidone (NMP), le diméthyle sulfoxyde (DMSO), le glycofurol et le benzoate de benzyle. Le premier système d'IAI par diffusion de solvant a été développé par Dunn *et al.* (Dunn, English, *et al.* 1990) au début des années quatre-vingt-dix, et a mené à la mise au point du système Atrigel[®] (Yewey, Duysen, *et al.* 1997) par la compagnie Atrix Laboratories Inc. L'Atrigel[®] est constitué de PLA, de PLGA ou de poly(acide lactique-co-caprolactone) (PLC) en solution dans la NMP. Ravivarapu *et al.* (Ravivarapu, Moyer,

et al. 2000) ont évalué la libération d'acétate de leuprolide (PM : 1269 g/mol) à partir d'une formulation constituée de 45% *p/p* de PLGA (75:25, PM : 17 800 g/mol) dissous dans la NMP. Le leuprolide est un agoniste de la LHRH qui est utilisé dans le cadre du traitement du cancer de la prostate pour induire une castration chimique. Tout d'abord, le leuprolide entraîne une activation des récepteurs des gonadotropines au niveau hypophysaire, ce qui induit la sécrétion de LH, qui stimule la production de testostérone par les gonades. Après plusieurs jours d'administration (5 à 12 jours), les récepteurs des gonadotropines se désensibilisent, ce qui inhibe la sécrétion de LH et ainsi, de testostérone (Cook et Sheridan 2000). Après une injection de la formulation d'Atrigel[®] contenant le leuprolide chez le rat, la concentration plasmatique de testostérone est demeurée sous le seuil de castration (< 0.5 ng/mL) pendant environ 105 jours. Les résultats encourageants obtenus chez les animaux ont mené à la commercialisation récente du Eligard[®], qui permet d'obtenir des concentrations plasmatiques thérapeutiques de leuprolide chez l'humain pendant 3 à 6 mois (Sartor 2003) (fig. 1.3). Il s'agit du premier système d'IAI pour la libération prolongée de médicaments accepté pour usage humain. Ce système présente cependant des inconvénients, notamment un effet « *burst* » important qui rend son utilisation difficile pour les molécules avec un indice thérapeutique faible (Tipton et Dunn 2000). De plus, la forte concentration de NMP utilisée peut causer de la douleur au site d'injection (Packhaeuser, Schnieders, *et al.* 2004). Enfin, la dégradation du PLA/PLGA par hydrolyse peut entraîner une acidification du milieu environnant, risquant de dégrader des PA fragiles (Mäder, Bittner, *et al.* 1998).

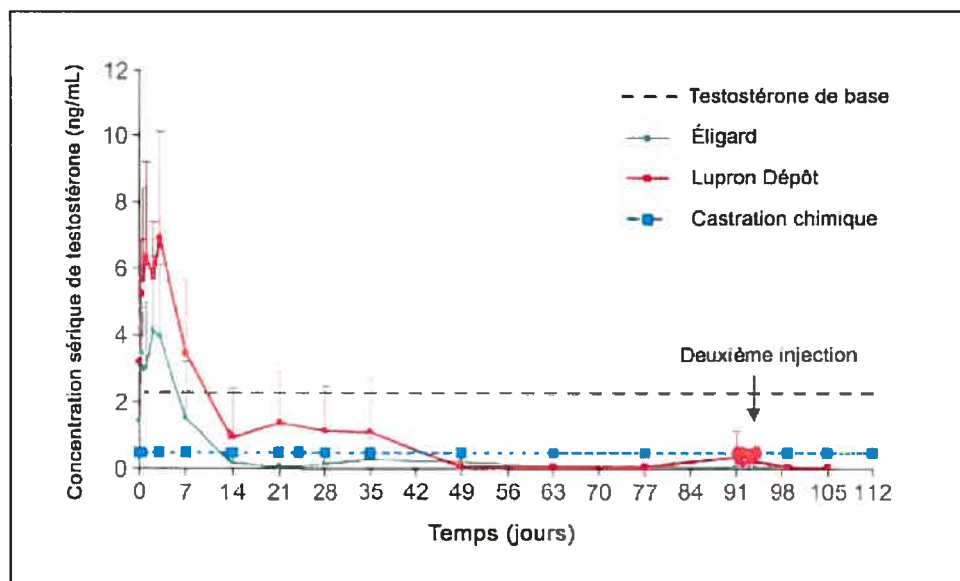


Figure 1.3. Suppression de la testostérone chez le chien après l'injection s.c. du Eligard[®] (Atrigel[®]) comparé au Lupron Dépôt[®] (microsphères). Injection des formulations 3 mois. Quatorze jours après l'injection, la concentration de testostérone est sous le seuil de la castration chimique. L'effet « *burst* » est moins marqué avec le Eligard[®] qu'avec les microsphères. Reproduit de (Sartor 2003) avec l'autorisation de Elsevier.

Récemment, un autre type d'IAI formé par diffusion de solvant a été mis au point à partir d'une molécule non polymère, l'acétate d'isobutyrate de sucrose (SAIB) (fig. 1.4) (Okumu, Dao le, *et al.* 2002). Le SAIB est insoluble dans l'eau, mais peut être dissous dans divers solvants organiques, tels que l'éthanol, la triacétine, la NMP et le carbonate de propylène. Avant l'injection, le système a une faible viscosité. Celle-ci augmente rapidement après la diffusion du solvant dans les tissus environnants. La libération de médicaments à partir de ce type de système peut être modulée, de quelques heures à quelques mois selon les paramètres suivants : la concentration en SAIB, le choix et la concentration du solvant organique et les additifs utilisés (Smith et Tipton 1996). La compagnie Southern Biosystem Inc., ensuite acquise par la maison Durect, a développé le SABER[®]. Celui-ci est constitué de SAIB dissous dans l'éthanol à une concentration de 65% à 85% *p/p* (Ray et Tipton 2001). La proportion de solvant organique y est plus faible que dans les systèmes à base d'Atrigel[®]. Pechenov *et al.* (Pechenov, Shenoy, *et al.* 2004) ont comparé la libération *in vitro* de différentes formes

crystallines d'amylase (PM : 54 000 g/mol) à partir de SAIB dans l'éthanol (concentration non mentionnée). La formulation contenant 100 mg/mL d'amylase a libéré 77% de la protéine sous sa forme active en 28 jours. Cette étude a aussi démontré l'importance de la dose incorporée sur la vitesse de libération du système. En effet, avec 300 mg/mL d'amylase dans le gel, la proportion libérée pour la même période est passée à 100%. De leur côté, Okumu *et al.* (Okumu, Dao le, *et al.* 2002) ont évalué les propriétés de libération du SABER[®] *in vivo*. La libération de la rhGH a été maintenue pendant au moins 7 jours après une injection s.c. chez le rat. Comparativement aux microsphères, le SABER[®] aurait un effet « *burst* » moins important (Ray et Tipton 2001).

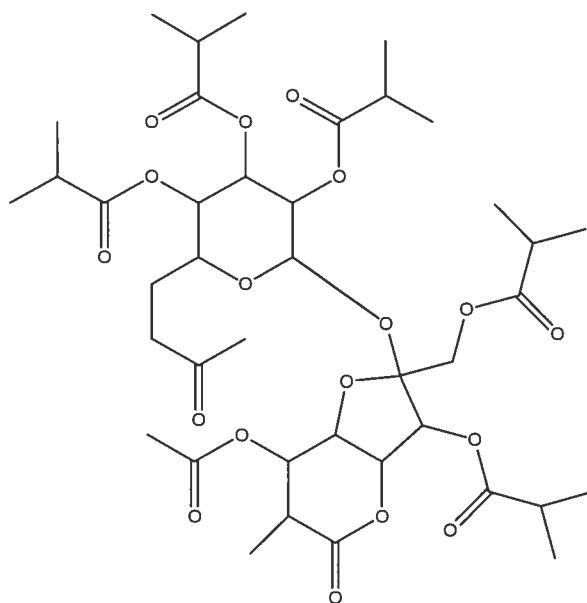


Figure 1.4. Structure du SAIB. PM : 846 g/mol.

En conclusion, les systèmes à base de polymères et de SAIB regroupent une grande variété d'IAI mis au point pour la libération prolongée de molécules. De façon générale, le système contient un polymère qui subit une modification (augmentation de la viscosité intrinsèque, réticulation, précipitation) lors de l'injection, se solidifiant en un implant *in situ*. Puisque les polymères sont des macromolécules, le réseau formé est habituellement constitué de larges pores. Ainsi, les petites molécules ont tendance à diffuser facilement. De plus, les systèmes contenant de l'eau (hydrogels) ne parviennent pas à retenir les PA hydrophiles, ceux-ci diffusant rapidement à travers la matrice. Pour pallier à ces inconvénients, des IAI constitués principalement de petites molécules dans un solvant oléagineux (hydrophobe) et/ou de lipides ont été développés pour la libération prolongée de PA. La prochaine section sera entièrement dédiée à ce type de gel, communément appelé organogel.

1.3. Organogels

1.3.1. Introduction

L'autoassemblage moléculaire est un phénomène fascinant qui résulte de l'association spontanée de molécules *via* des interactions non covalentes, entraînant la formation d'agrégats de structure spécifique (Whitesides, Mathias, *et al.* 1991). Cette propriété est connue pour des macromolécules telles que les protéines (Aggeli, Bell, *et al.* 1997), l'ADN (Engelkamp, Middelbeek, *et al.* 1999) ou encore les polymères synthétiques. Récemment, il a été observé que des molécules de faible PM (≤ 3000 g/mol) possédaient aussi la propriété de s'autoassembler en un réseau tridimensionnel lorsqu'elles étaient dissoutes dans un solvant approprié (Abdallah et Weiss 2000). Le solvant peut être de l'eau (Estroff et Hamilton 2004 ; Heeres, van der Pol, *et al.* 2003) ou encore un solvant organique (alcool, solvant aromatique, hydrocarbure, etc.) (Gronwald, Snip, *et al.* 2002). Parmi cette grande famille de molécules gélifiantes de faible PM, nous retrouvons les organogélifiants (OG), qui ont la propriété de gélifier, à faibles concentrations (inférieure à 2% *p/p*), un solvant organique afin de former un organogel (Terech et Weiss 1997). Le gel est préparé simplement par dissolution de l'OG dans le solvant chaud. Le réseau qui forme l'organogel est maintenu en place uniquement par des interactions de faible énergie, telles que des ponts hydrogène (pont H), des interactions π - π , des forces électrostatiques, des forces de van der Waals et/ou des forces solvophobes (Gronwald, Snip, *et al.* 2002; van Esch et Feringa 2000). Le processus de gélification débute par l'assemblage des molécules en fibres d'architectures diverses, allant de fibres droites et unidirectionnelles aux rubans et hélices, selon la structure de la molécule gélifiante (Abdallah et Weiss 2000). Les fibres s'unissent à leur tour pour former un réseau tridimensionnel emprisonnant le solvant. Les zones de jonctions entre les fibres déterminent la rigidité de la microstructure. Le processus de gélification est même réversible. Cette propriété rend les organogels extrêmement intéressants comme guide pour la synthèse dirigée de nanostructures. En effet, le solvant peut être retiré par évaporation sous vide en augmentant légèrement la température, une fois le réseau d'OG formé, ce qui constitue le xérogel. On peut ainsi obtenir une mousse de très faible densité, utilisable en chimie séparative ou comme matériau isolant (Shi, Huang, *et al.*

1999). Les OG constituent donc une famille de matériaux regroupant des molécules variées, dont la structure peut être modifiée selon l'application visée.

1.3.2. Définitions

La définition d'un organogel varie selon le domaine. Plusieurs définitions des gels ont été proposées au cours des dernières décennies sans consensus général. Le premier à reconnaître la problématique fut le Dr. Dorothy Jordon Lloyd en 1926 qui énonça que : « *a gel is easier to recognize than to define* » (Lloyd 1926). Plus de 50 ans plus tard, Flory a établi que pour être qualifié de gel, un système doit (Flory 1974): 1) avoir une structure continue avec une composante macroscopique, préservant son intégrité au cours d'une expérimentation analytique ; 2) avoir un comportement rhéologique de type solide. Ainsi, les solutions de polymères, les solutions micellaires, les microémulsions et les systèmes semi-solides formés à la suite de l'autoassemblage de petites molécules gélifiantes pourraient satisfaire cette définition (Schoonbeek 2001). Cependant, Gelbart et Ben-Shaul (Gelbart et Ben-Shaul 1996) proposent le terme « fluides complexes » pour regrouper tous les systèmes comprenant une structure colloïdale ayant une dimension située entre la taille d'une simple molécule et celle d'une structure macromoléculaire (c.-à-d. à l'échelle mésoscopique, de 20 à 2000 Å) (Schoonbeek 2001; Terech et Weiss 1997). Il a en effet été démontré que la taille des vésicules et des gouttelettes dans les microémulsions est de l'ordre des centaines de nm (Rees et Robinson 1993). De même, le diamètre des fibres formées par l'assemblage des OG est habituellement de l'ordre des centaines de nm (Abdallah et Weiss 2000 ; Brinksma, Feringa, *et al.* 2000; Sakurai, Jeong, *et al.* 2003). Ces systèmes forment un gel lorsque les particules colloïdales interagissent physiquement les unes avec les autres pour immobiliser le liquide, lequel est maintenu en place principalement par la tension de surface (Terech et Weiss 1997).

Ainsi, les organogels regroupent une grande variété de systèmes. En chimie, ils sont exclusivement constitués d'une molécule gélifiante, appelée OG, présente à faible concentration dans un solvant organique. Dans le domaine pharmaceutique, la définition est un peu plus large. Les organogels y sont principalement constitués d'une phase

continue oléagineuse (Hatefi et Amsden 2002). Ils peuvent donc être obtenus en dissolvant un OG en faible concentration dans une huile pharmaceutique. De plus, ils regroupent divers systèmes à base de molécules amphiphiles, dont la phase externe est hydrophobe, tels que les organogels basés sur les microémulsions (OBM), les amphiphilogels et les lipides formant une phase cubique cristalline (Rees et Robinson 1993). Ces systèmes seront décrits en détail à la section 1.3.3.

1.3.3. Classification et méthodes de caractérisation

La plupart des OG ont été découverts fortuitement, par observation de leurs propriétés gélifiantes dans des solvants organiques ou divers mélanges (van Esch et Feringa 2000). Des molécules gélifiantes aussi simples que des acides gras (Terech, Pasquier, *et al.* 2000) et des surfactifs (Murdan, Gregoriadis, *et al.* 1999) ont ainsi été identifiés. En général, les OG peuvent être représentés comme des molécules amphiphiles, qui possèdent de longues chaînes aliphatiques et un ou plusieurs groupements aromatiques, polaires ou ioniques permettant l'établissement de liaisons non covalentes entre les molécules (Schoonbeek 2001). Ces liaisons sont principalement des ponts H et des interactions π - π . Cependant, Abdallah et Weiss (Abdallah et Weiss 2000) ont démontré que les forces de dispersion de London peuvent être suffisantes pour entraîner la formation d'un gel puisque des *n*-alcanes gélifient des *n*-alcanes. Il est à noter qu'aucune généralisation n'est possible en se basant uniquement sur la structure de la molécule puisque la gélification du solvant dépend de divers facteurs, tels que la concentration en OG, sa polarité, sa rigidité, sa forme ainsi que la nature du solvant. En effet, certaines modifications structurales mineures sur des OG peuvent éliminer leur capacité à gélifier un solvant.

Étant donné l'immense diversité des OG, divers types de classification ont été élaborés. La classification selon la nature des interactions permet de regrouper la majorité des OG (Gronwald, Snip, *et al.* 2002; Terech et Weiss 1997).

1.3.3.1. Organogels formés par des liaisons hydrogène

L'autoassemblage des OG de cette famille se produit suite à la formation de ponts H entre les groupements polaires des molécules. Les motifs structuraux spécifiques à ces molécules sont principalement les acides aminés alanine (fig. 1.5) (Luo, Liu, *et al.* 2001), phénylalanine (Bhattacharya et Ghanashyam Achara 1999), lysine (Suzuki, Nigawara, *et al.* 2003), valine (Hanabusa, Tange, *et al.* 1993), les dérivés des nucléosides (p. ex. thymidine [Yun, Park, *et al.* 2003]) ainsi que les groupements amide et urée (Lescanne, Grondin, *et al.* 2004 ; van Gorp, Vekemans, *et al.* 2002). De plus, les OG dérivés des hydrates de carbone (Hafkamp, Feiters, *et al.* 1999 ; Sakurai, Jeong, *et al.* 2003), des porphyrines (Shirakawa, Kawano, *et al.* 2003) et des sels organiques (Trivedi, Ballabh, *et al.* 2004) font aussi partie de cette catégorie.

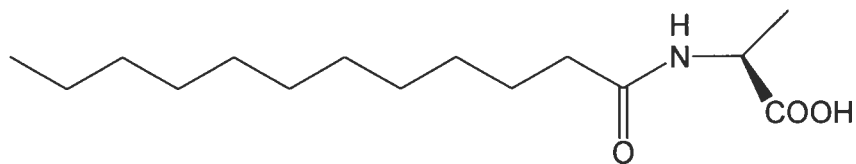


Figure 1.5. N-lauroyle L-alanine comme agent gélifiant. Tiré de (Bhattacharya et Krishnan-Gosh 2001).

1.3.3.2. Organogels formés par des liaisons non hydrogène

La famille des OG qui gélifient sans la contribution des ponts H regroupe principalement les dérivés des anthracènes (Placin, Desvergne, *et al.* 2001) (fig. 1.6A) et les dérivés de stéroïdes (fig. 1.6B) (Lin et Weiss 1987 ; Mukkamala et Weiss 1995), particulièrement le cholestérol (Jung, Ono, *et al.* 2000 ; Sugiyasu, Fujita, *et al.* 2004; Wang, Geiger, *et al.* 2000). Les interactions qui permettent la gélification des solvants organiques en présence de ce type de molécules sont principalement les interactions π - π des cycles aromatiques (Gronwald, Snip, *et al.* 2002). À partir de ces constatations, divers OG comprenant des cycles aromatiques ont été développés, tels que des dérivés fluorés ayant des propriétés fluorescentes (fig. 1.6C) (An, Lee, *et al.* 2004). Les molécules gélifiant par les forces de dispersion de London sont aussi comprises dans cette catégorie.

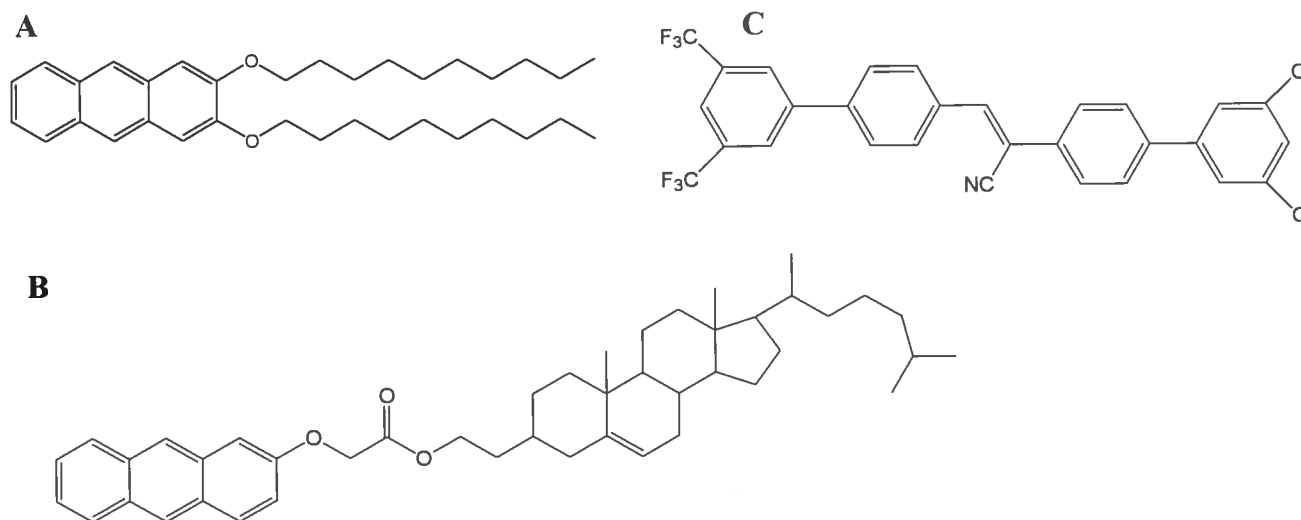


Figure 1.6. OG dérivés de l'anthracène (A), des stéroïdes (B) (couplé à l'anthracène) ou de structure diverse (C). Adapté de (Terech et Weiss 1997), (Schoonbeek 2001) et (An, Lee, *et al.* 2004).

Par ailleurs, les interactions hydrophobes sont responsables de la gélification de divers systèmes à base de molécules amphiphiles. Habituellement, il s'agit de lipides ou de surfactifs qui, selon le contenu en eau et en huile du mélange, s'organisent en différentes géométries : micelles ou micelles inverses, phase lamellaire, phase cubique, etc. (Taulier 1999) (fig. 1.7). La nature de la phase formée dépend des propriétés structurales des lipides, de la température et de la quantité d'eau et de solvant hydrophobe dans le mélange (Engström et Engström 1992; Shah, Sadhale, *et al.* 2001). Une catégorie de lipides très étudiée sont les monoglycérides, tels que le monooléate de glycérol (MOG) et le monopalmitate de glycérol (MPG) (Chang et Bodmeier 1998; Engström 1990; Wyatt et Dorschel 1992) (fig. 1.8).

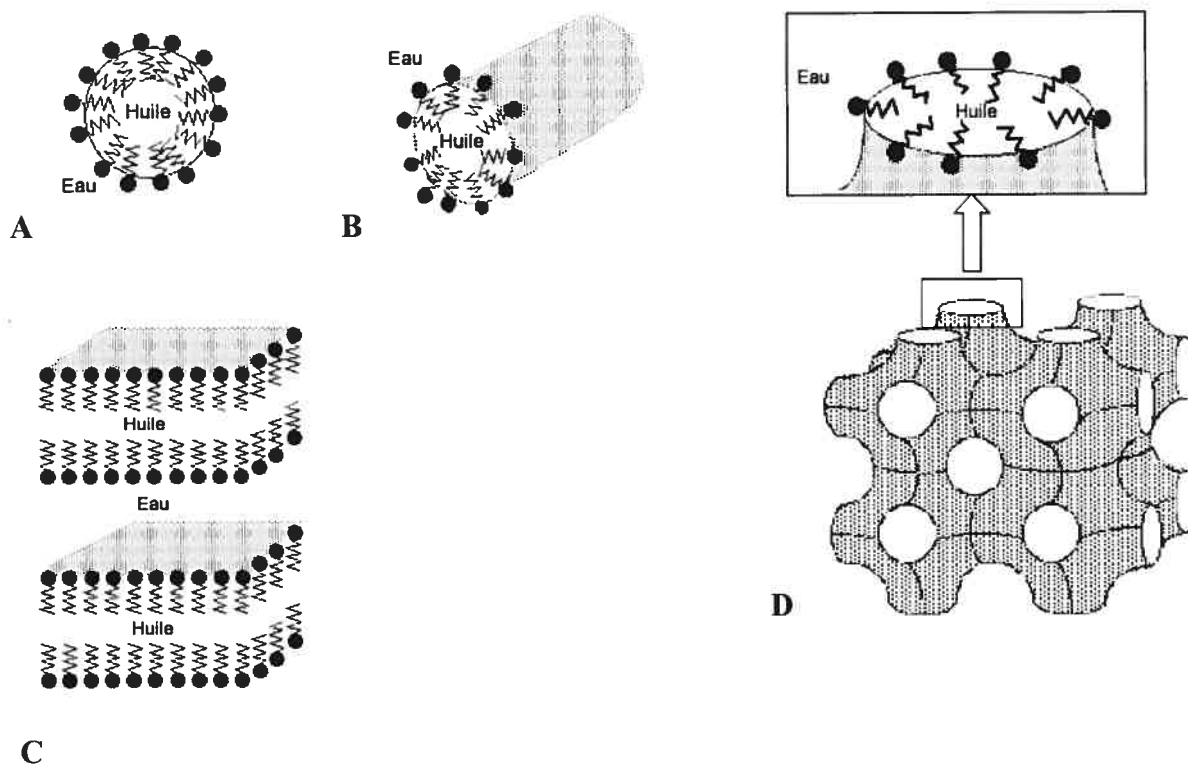


Figure 1.7. Organisation de molécules amphiphiles avec un mélange d'eau et d'huile. Phase micellaire (A) et micellaire allongée (B), phase lamellaire (C) et phase cubique (D). L'organisation dépend de la concentration en eau et en huile du mélange. Tiré de (Taulier 1999) avec l'autorisation de l'auteur.

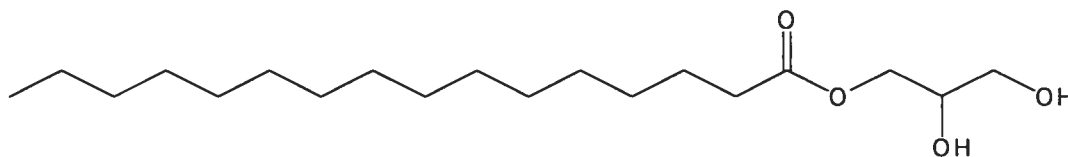


Figure 1.8. Structure du monopalmitate de glycérol, qui forme un organogel lorsqu'une certaine proportion d'eau est ajoutée au mélange.

Ces lipides forment un organogel lorsqu'ils sont mélangés à de l'eau. Pour des concentrations en eau inférieures à 15%, le système s'organise en phase micellaire inverse ou lamellaire, de faible viscosité (Appel, Engle, *et al.* 1996; Shah, Sadhale, *et al.* 2001) (fig. 1.9). Lorsque la concentration en eau est supérieure à 20%, ces lipides forment une phase cubique, qui est très visqueuse.

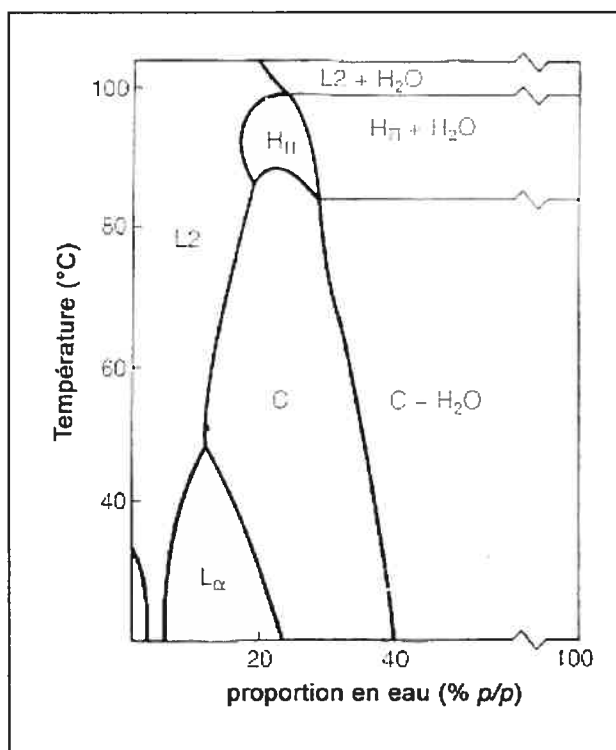


Figure 1.9. Diagramme de phase du système MOG selon la proportion en eau. Phase micellaire inversée (L₂), phase lamellaire (L_α), phase cubique (C) et phase hexagonale inversée (H_{II}). Tiré de (Shah, Sadhale, *et al.* 2001) avec l'autorisation de Elsevier.

Par ailleurs, les OBM font aussi partie de cette catégorie. Ces systèmes sont constitués de lipides amphiphiles en solution dans un solvant organique, qui s'organisent en micelles inverses lorsqu'une certaine quantité d'eau est ajoutée (fig. 1.10A). Les micelles s'allongent à mesure que la quantité d'eau augmente jusqu'à former un réseau tridimensionnel (fig. 1.10B) (Willimann, Walde, *et al.* 1992). Ce réseau de micelles allongées coexisterait avec une population de gouttelettes conventionnelles d'eau dans l'huile (E/H) (Kantaria, Rees, *et al.* 1999). La lécithine est un exemple de molécules ayant été particulièrement étudié pour la préparation de ce type d'organogels (Dreher, Walde, *et al.* 1997).

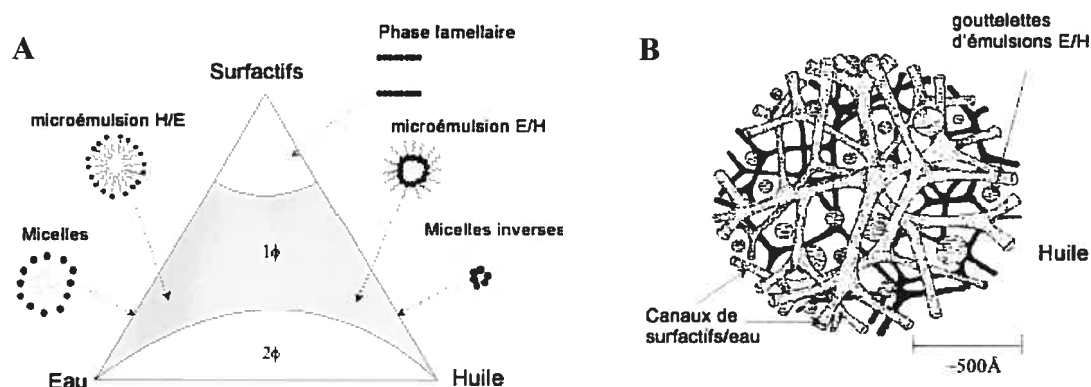


Figure 1.10. Organogel à base d'une microémulsion (OBM). Représentation schématique du diagramme de phase d'un mélange huile/surfactif/eau (A) et représentation du réseau tridimensionnel dans une microémulsion (B). Deux phases sont observées lorsque la concentration de l'un des constituants est trop élevée. Adapté de (Lawrence et Rees 2000) et reproduit avec l'autorisation de Elsevier.

1.3.3.3. Méthodes de caractérisation

Plusieurs questions peuvent être soulevées au sujet de l'autoassemblage de petites molécules dans un solvant organique. Par exemple, quelle est la structure du réseau formé ? Comment le réseau est-il maintenu en place ? Quelle est la force du gel ? Quelle est sa T_i ? Étant donné la diversité des systèmes regroupés par ce concept, les caractéristiques physiques des organogels peuvent se rapprocher autant de celles des surfactifs en solution (p. ex. micellisation, lyotropisme, cristallisation) que de celles des polymères en solution (p. ex. gonflement, mouvement massique microscopique) (Terech et Weiss 1997). La caractérisation des organogels fait donc appel à plusieurs techniques, dont les plus utilisées seront ici présentées.

1.3.3.3.1. Diagramme de phase

Lorsque l'on refroidit une solution d'OG dans un solvant organique, la diminution de l'agitation thermique des molécules facilite l'établissement de liaisons intermoléculaires, ce qui permet la formation d'un gel. La T_i de l'état liquide à l'état gel, notée T_{LG} , varie en fonction de la concentration de l'OG et du solvant. Il en est de même pour la transition inverse gel-liquide, T_{GL} . La T_i varie selon la technique utilisée pour la mesurer (Terech et Weiss 1997). Les techniques les plus simples sont des méthodes visuelles, soit la méthode du tube inversé ou de la bille tombante (Terech, Rossat, *et al.* 2000). Dans le premier cas, on observe visuellement l'écoulement de la substance contenue dans un tube, lorsque celui-ci est inversé verticalement (fig. 1.11). La température à partir de laquelle aucun écoulement n'est observé est considérée comme la T_{LG} , et le phénomène inverse est noté lors de l'augmentation de la température. Dans le deuxième cas, on observe la trajectoire d'une bille d'acier placée sur un gel qui est chauffé graduellement. La T_{GL} est atteinte lorsque la bille touche le fond du gel. Il faut noter que la T_{LG} ne peut être mesurée avec cette méthode. Ces méthodes visuelles sont couramment utilisées pour établir rapidement le diagramme de phase de mélanges, mais sont relativement subjectives, puisqu'elles dépendent de divers facteurs, tels que le volume de l'échantillon, la forme du tube et la taille de la bille (Terech, Rossat, *et al.* 2000).

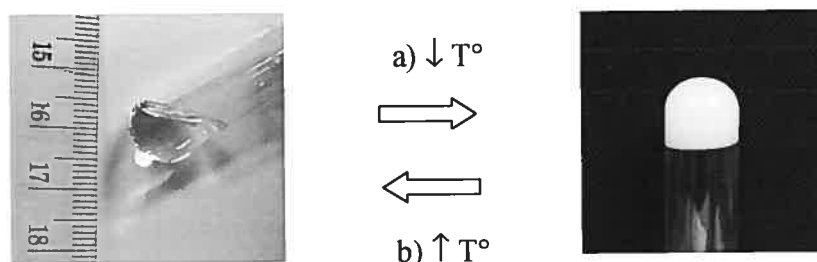


Figure 1.11. Détermination des températures de transition d'un OG constitué de 10% *p/v* de SAE dans l'huile de carthame par la méthode du tube inversé. a) La solution gélifie lors de la diminution de température ($\downarrow T^\circ$). b) Le processus est complètement réversible, puisqu'une augmentation de température ($\uparrow T^\circ$) entraîne la solubilisation du gel.

Une technique plus objective pour déterminer la T_t est l'analyse thermique différentielle (ATD) (George et Weiss 2002). Cette méthode permet d'obtenir, en plus de T_{LG} et T_{GL} , l'enthalpie de transition de phase, qui représente l'énergie libérée ou absorbée lors du changement de phase (Abdallah, Lu, *et al.* 1999). Cependant, la concentration en OG étant faible dans un organogel, l'interprétation des thermogrammes est difficile puisque l'intensité du signal est peu intense.

Selon Terech *et al.* (Terech, Rossat, *et al.* 2000), la méthode la plus appropriée pour mesurer les températures de transition de phase est la rhéologie à température variable. L'organogel est soumis à une contrainte de cisaillement oscillatoire (σ) et la température est augmentée graduellement. Le module élastique G' diminue drastiquement lorsque les jonctions qui retiennent la structure tridimensionnelle à l'échelle macroscopique sont détruites, c.-à-d. lorsque l'on passe de l'état gel à l'état liquide (Terech, Rossat, *et al.* 2000). La méthode du tube inversé détermine la température à laquelle le réseau de fibres n'est plus assez résistant pour empêcher l'écoulement du solvant le long du tube sous l'effet de la force de gravité, ce qui introduit une composante qui n'est pas liée au système comme tel. Par ailleurs, la présence de la bille peut perturber le réseau en place, ce qui influence la T_t ainsi mesurée.

Enfin, différentes techniques de spectroscopie à température variable sont utilisées pour déterminer les diagrammes de phases (Terech, Meerschaut, *et al.* 2003). Elles font appel à l'évaluation des interactions entre les groupements structuraux des OG, qui sont perturbées lors du changement d'état. La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut être utilisée pour la majorité des molécules. Par ailleurs, certaines techniques requièrent des particularités structurales. La résonance magnétique de l'électron pourra être utilisée si le paramagnétisme est impliqué, la spectroscopie infra-rouge s'il y a formation de pont H et la spectroscopie en fluorescence si la luminescence entre en jeu. Cependant, les spectres obtenus avec ces méthodes mesurent le degré d'agrégation des molécules à l'échelle microscopique, mais ne donnent aucune information sur l'aspect macroscopique du système (Terech, Rossat, *et al.* 2000). De plus, mis à part la RMN, les techniques spectroscopiques s'appliquent précisément à un type de molécules selon leur structure, ce qui n'en font pas des méthodes d'analyse absolues.

1.3.3.3.2. Propriétés mécaniques

La rhéologie est la technique la plus utilisée pour évaluer la force du réseau formé (gel fort ou faible). Elle permet d'établir le lien entre la structure de la molécule gélifiante, le solvant utilisé et les propriétés mécaniques du gel (Terech, Pasquier, *et al.* 2000). Classiquement, on détermine s'il s'agit d'un gel fort ou faible en mesurant les modules dynamiques. Le G' et le module de perte (G'') sont mesurés en fonction de l'amplitude de σ dans le régime de comportement linéaire (lorsque les modules sont indépendants de σ). Normalement, la composante élastique (G') est supérieure à la composante visqueuse (G'') pour satisfaire la définition du gel de Flory. De plus, des expériences de fluage (mesure de la déformation à contrainte constante) permettent d'établir les propriétés viscoélastiques en fonction du temps (Lescanne, Colin, *et al.* 2003). On peut observer la cinétique de formation du gel à température ambiante puisque la composante visqueuse diminue au fur et à mesure que le système devient solide (Brinksmas, Feringa, *et al.* 2000). Finalement, on peut aussi mesurer la stabilité du réseau formé en mesurant l'évolution de la viscosité du système en fonction du temps de conservation.

La texturométrie est une autre technique qui permet d'analyser les propriétés mécaniques d'un gel. Un texturomètre est un appareil qui exerce une pression uniaxiale sur un matériau avec une force et une vitesse déterminées. Cette technique mesure la force rencontrée par une sonde alors qu'elle pénètre dans un gel à une vitesse constante (Ferrari, Bertoni, *et al.* 1994). On peut ainsi déterminer la « force » du gel (Gregson, Hill, *et al.* 1999). Cependant, plusieurs paramètres ont une influence sur les résultats obtenus, tels que le rayon de la sonde, la forme et le volume de l'échantillon, ce qui rend cette technique moins objective que la rhéologie. Elle peut toutefois permettre une comparaison de divers gels mesurés avec le même protocole.

1.3.3.3. *Structure du réseau tridimensionnel*

Pour obtenir une connaissance détaillée sur l'arrangement moléculaire et la structure des agrégats (morphologie, orientation, cristallinité) qui constituent l'organogel, diverses techniques peuvent être utilisées. Tout d'abord, les techniques d'imagerie directe, soit la microscopie optique (polarisée ou non), la microscopie électronique à transmission ou à balayage, et la microscopie à force atomique, permettent d'obtenir des informations sur la structure du réseau dans l'espace, tels que la taille et l'orientation des fibres dans les dimensions de 10 à 1000 nm. Cependant, la technique d'échantillonnage peut endommager la structure du gel et introduire des artefacts dans l'image obtenue. Ainsi, les techniques de diffusion des neutrons ou des rayons X aux petits angles sont de plus en plus utilisées (Imae, Hayashi, *et al.* 2000; Willemen, Marcellis, *et al.* 2004). À partir des données de diffraction et de modèles mathématiques, il est possible de calculer la taille des agrégats. Par exemple, Willemen *et al.* (Willemen, Marcellis, *et al.* 2004) ont déterminé que le rayon des agrégats de divers dérivés de l'acide cholique dissous dans le benzène se situait entre 10 et 20 Å. En combinant les méthodes de diffraction avec l'imagerie directe, les informations sur la structure du réseau sont de plus en plus précises, allant de 1 à 1000 nm (Gronwald, Snip, *et al.* 2002). Finalement, les méthodes spectroscopiques, telles que la RMN et la spectroscopie infrarouge, permettent aussi d'évaluer les groupements moléculaires impliqués dans la gélification. En effet, Bhattacharya et Krishnan-Ghosh (Bhattacharya et Krishnan-Gosh 2001) ont démontré en utilisant la spectroscopie infra-rouge qu'un

dérivé de la L-alanine permettait la gélification de divers solvants organiques grâce à l'établissement de ponts H entre les groupements amide. Cette capacité de gélification était affectée significativement par la polarité et la nature protique du solvant.

1.3.4. Applications des organogels

1.3.4.1. Applications industrielles

Les applications industrielles des organogels sont nombreuses étant donné la diversité des structures possibles à l'échelle microscopique et mésoscopique (Terech et Weiss 1997). Les exemples présentés ici permettent d'illustrer le grand éventail des possibilités. Les organogels sont constitués d'un réseau de fibres qui possède une structure très orientée. Cette superstructure peut refléter une propriété de la molécule gélifiante (Gronwald, Snip, *et al.* 2002). Par exemple, van Gorp *et al.* (van Gorp, Vekemans, *et al.* 2002) ont développé un OG discoïde qui s'agence sous forme d'hélices dans un solvant apolaire. Ces systèmes suscitent un intérêt grandissant comme guide pour la synthèse de superstructures inorganiques (Tamaru, Takeuchi, *et al.* 2002) ou organiques (Shirakawa, Fujita, *et al.* 2003) puisqu'ils permettent d'obtenir des formes très précises, qui seraient très difficiles, voire impossibles à obtenir autrement (Shi, Huang, *et al.* 1999). Ainsi, grâce à la nanochimie, des matériaux avec de nouvelles propriétés mécaniques et électriques ont pu voir le jour (Terech et Weiss 1997). On retrouve notamment les fibres creuses de silice préparées par Tamaru *et al.* (Tamaru, Takeuchi, *et al.* 2002), qui font en moyenne 50 nm de diamètre, mais qui possèdent une cavité centrale de 5 à 9 nm. Les possibilités d'utilisation des matériaux produits au moyen des organogels sont nombreuses, particulièrement en chimie séparatoire, où les nanostructures peuvent servir d'agents absorbants ou complexants (Gu, Lu, *et al.* 1997; Hafkamp, Kokke, *et al.* 1997).

Par ailleurs, les OG ont aussi des applications dans l'industrie pétrochimique, pour lutter contre le déversement de pétrole dans l'océan (Bhattacharya et Krishnan-Gosh 2001 ; Hanabusa, Matsumoto, *et al.* 2000), dans l'industrie alimentaire, où ils peuvent être utilisés comme agent gélifiant, et dans l'industrie de l'électronique et

l'optique, particulièrement pour les molécules ayant des électrons π conjugués (Ryu, Kim, *et al.* 2004). De plus, tout comme les polymères, les organogels peuvent être « intelligents » si l'on crée des structures pouvant répondre à un stimulus, tel que le pH ou la lumière (Yi, Sada, *et al.* 2003). Enfin, les possibilités d'applications de ces gels dans le domaine pharmaceutique seront traitées séparément dans la prochaine section.

1.3.4.2. Applications pharmaceutiques

Les organogels sont, par définition, principalement constitués d'une phase organique. Pour l'utilisation dans le domaine pharmaceutique, cette phase organique doit être inerte et non toxique. Les solvants organiques acceptables pour la voie parentérale sont généralement des huiles pharmaceutiques, telles que les huiles végétales (soya, arachide, carthame, maïs, sésame, etc.) (Fredholt, Larsen, *et al.* 2000). On compte aussi les esters d'acides gras, tels que le myristate ou le palmitate d'isopropyle (IPM ou IPP, respectivement), ainsi que les triglycérides à chaîne moyenne (TGCM), tels que le Mygliol[®] (Lawrence et Rees 2000). Les esters méthyliques ou éthyliques d'acide lauroïque, oléique ou myristique, tels que l'oléate d'éthyle (OE) peuvent également être utilisés (Kawakami, Yoshikawa, *et al.* 2002). Le PA peut être simplement solubilisé dans la phase huileuse s'il est liposoluble. Les médicaments hydrophiles peuvent être incorporés par dispersion ou par émulsion E/H. La présence de l'huile protège le PA d'une dégradation rapide puisqu'il est confiné dans la phase hydrophobe. Grâce aux différentes méthodes d'incorporation, les organogels peuvent servir de réservoir pour une grande diversité de médicaments. Les applications sont nombreuses, soit pour la libération percutanée de PA ou pour la formation d'un implant.

1.3.4.2.1. Application topique

En médecine vétérinaire, la prise d'un médicament par la voie orale ou même par la voie injectable peut s'avérer complexe, particulièrement chez les petits animaux domestiques, tels que les chats (Mealey, Peck, *et al.* 2004). Ainsi, l'administration des PA sous la forme de crèmes ou de gels est très populaire. En médecine humaine, les organogels ont aussi leur place comme véhicule pour l'application cutanée ou unguéale

de médicaments (anti-inflammatoires, antibiotiques ou anticancéreux) (Dreher, Walde, *et al.* 1997; Murdan 2002). Le défi consiste à favoriser la pénétration du PA dans le SC selon la composition du gel (Schmalfuß, Neubert, *et al.* 1997). Ainsi, la scopolamine, le broxotérol (Willimann, Walde, *et al.* 1992) et le propranolol (Bhatnagar et Vyas 1994) ont été incorporés dans des OBM à base de lécithine. *In vitro*, l'utilisation du gel a augmenté d'un facteur de dix la perméabilité de la peau comparativement aux solutions dans les solvants seulement. Cependant, Dreher *et al.* (Dreher, Walde, *et al.* 1997) ont obtenu des résultats contradictoires avec l'indométhacine et le diclofénac, deux médicaments anti-inflammatoires, dissous dans des gels de lécithine/IPP/eau. En effet, l'utilisation du gel a diminué la pénétration des PA par rapport à l'IPP seulement (coefficient de perméabilité inférieur). Les auteurs expliquent ce phénomène par une mauvaise solubilité des drogues dans les formulations ainsi que par un coefficient de partage formulation/SC meilleur avec l'IPP seul. Par ailleurs, Nastruzzi et Gambari (Nastruzzi et Gambari 1994) ont effectué des tests d'efficacité *in vivo* chez des souris porteuses de mélanomes à la suite de l'application topique d'un gel de lécithine/IPP/eau (\pm cosolvant) contenant une tétra-amidine comme médicament anticancéreux. Ils ont observé que la taille des tumeurs demeurait stable lorsque le gel était appliqué tous les 2 jours sur la tumeur, alors que les tumeurs continuaient de croître si le gel était appliqué sur un autre site. Plus récemment, certains auteurs ont proposé de remplacer 80% à 90% de la lécithine par du poloxamer pour favoriser la pénétration du PA. Ces gels ont été évalués pour la libération transdermique d'amitriptyline, de buspirone (Mealey, Peck, *et al.* 2004) et de dexaméthasone chez le chat (Willis-Goulet, Schmidt, *et al.* 2003). Les résultats se sont avérés décevants, puisque les concentrations plasmatiques en PA se situaient sous le seuil de détection après une application. Ainsi, les organogels sont pour le moment peu efficaces pour l'administration topique de médicaments. Jibry et Murdan ont par ailleurs proposé un nouveau type d'organogel, qu'ils qualifient ici d'amphiphilogel, puisqu'il est exclusivement constitué de surfactifs (20 % *p/p* de monostéarate de sorbitan dans le polysorbate 20 ou 80) (Jibry et Murdan 2004). Après 5 jours d'application sur la peau, aucune irritation n'a été observée chez des humains. Cependant, aucune étude de pénétration et de libération de médicament n'est encore publiée à ce jour.

1.3.4.2.2. Administration parentérale extravasculaire

En dépit des performances décevantes des organogels pour la libération transdermique de PA, ils ont aussi été évalués comme IAI pour injection dans le tissu s.c. ou i.m. Gasco *et al.* ont mis au point un OBM injectable à base de lécithine/OE/eau pour la libération d'un analogue de la LHRH (Gasco, Pattarino, *et al.* 1990). Bien que la concentration plasmatique du médicament n'ait pas été mesurée chez le rat, une injection unique de la formulation a entraîné une diminution de la concentration plasmatique de testostérone du 4^{ième} au 21^{ième} jour aussi importante qu'une injection quotidienne d'une solution de médicament.

Par ailleurs, des systèmes constitués de lipides et d'eau ont aussi été proposés comme IAI. Avant l'injection, la proportion en eau est inférieure à 15% et le système est injectable. Lors de l'injection, la concentration en eau augmente dans le système suite au contact avec les tissus. Ceci entraîne une réorientation des lipides et la formation d'une phase cubique (voir section 1.3.3.2). La cinétique de formation de la phase cubique doit être rapide, afin de limiter l'effet « *burst* ». Chang et Bodmeier (Chang et Bodmeier 1997) ont étudié les propriétés de libération d'un système de MOG. La libération *in vitro* de guafénésine (PM : 200 g/mol) s'est avérée rapide, avec plus de 60% de la dose libérée en 24 h dans un tampon phosphate salin. Sadhale et Shah (Sadhale et Shah 1999) ont évalué la libération d'insuline après l'injection s.c. d'un système de MOG à des rats. Après environ 4 jours, 100% de la dose était libérée. Ainsi, ce type de système requiert encore plusieurs ajustements avant d'envisager son utilisation pour la libération prolongée de médicaments.

Finalement, le dernier type d'organogel est constitué uniquement d'une molécule gélifiante dissoute dans un solvant organique. En 1989, un brevet relatif à l'utilisation d'un gel oléagineux, constitué d'huile d'arachide et de 2.5% *p/v* d'aluminium monostéarate comme agent gélifiant, a été déposé (Yim, Zupon, *et al.* 1989). Ce gel peut être injecté dans les tissus pour soutenir la libération de macromolécules hydrosolubles, telles que les interférons (INF), qui sont incorporées dans le gel sous la forme d'une émulsion E/H. La libération d'INF- α a été maintenue pendant une vingtaine de jours après l'injection du gel à des cobayes. De même, Gao *et al.* (Gao, Crowley, *et al.* 1995;

Gao, Shukla, *et al.* 1995) ont mis au point un gel à base d'huile végétale (Labrafil 1944 C^B) et de palmitostéarate de glycérol pour la libération prolongée de lévonorgestrel et d'éthinyl estradiol, deux hormones contraceptives liposolubles. *In vitro*, ils ont observé que l'ajout de l'agent gélifiant à une concentration supérieure à 10% *p/p* ralentissait significativement la libération de lévonorgestrel par rapport à l'huile seule. *In vivo*, une seule injection de la formulation à des rats a permis d'obtenir une suppression de l'œstrus durant 20 à 41 jours, selon la dose injectée. Un système d'organogel comprenant une émulsion E/H a aussi été évalué par Murdan *et al.* (Murdan, van den Bergh, *et al.* 1999) pour la libération d'ASB radiomarquée. Le gel a été préparé en dissolvant les surfactifs (monostéarate de sorbitan 10% *p/v* et polysorbate 20 2% *p/v*) dans l'IPM et la solution aqueuse contenant la protéine a été émulsifiée dans le gel. Le système a été injecté dans le tissu i.m. chez la souris. Le gel n'a pas su retenir significativement l'ASB puisque seulement 20% de la dose subsistait encore dans le gel, 48 h après l'injection.

En résumé, les organogels comme LAI semblent prometteurs. Cependant, il s'agit de systèmes peu caractérisés qui sont habituellement étudiés pour la libération prolongée de macromolécules. La libération des petites molécules à partir des matrices lipidiques reste donc peu explorée.

CHAPITRE 2. La biocompatibilité des implants autoformants *in situ*

2.1. Introduction

L'introduction d'un corps étranger dans l'organisme déclenche une série de réactions inflammatoires et immunologiques qui ont pour but de protéger l'hôte et d'éliminer l'intrus. La technologie pharmaceutique est confrontée à ce phénomène et doit s'assurer que les dispositifs d'administration des médicaments implantés sont biocompatibles. La biocompatibilité est définie comme « *la capacité d'un matériau à provoquer une réponse appropriée dans une application spécifique* » (Williams 1999). On ne peut donc qualifier un matériel de biocompatible sans préciser l'application et le tissu visés. Les systèmes de libération prolongée de médicaments sont en contact pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois, avec le tissu s.c. ou i.m. dans lequel ils sont implantés. La réponse de l'hôte doit donc être évaluée précisément par rapport à cette situation. Plusieurs polymères utilisés dans les IAI ont démontré leur innocuité et sont maintenant reconnus comme biocompatibles. Les plus répandus sont les polymères d'acide lactique et/ou glycolique, ce qui explique leur quasi omniprésence dans les systèmes de libération prolongée actuellement commercialisés (Brady, Cuthright, *et al.* 1973; Laurencin et Elgandy 1994). Cependant, en plus du matériau comme tel, il faut démontrer l'innocuité du médicament incorporé, de ses métabolites et des produits de dégradation des constituants de l'implant, qui peuvent aussi avoir une toxicité locale ou systémique. Afin d'évaluer la biocompatibilité d'un IAI biodégradable, il est essentiel de comprendre la réaction inflammatoire qui survient normalement à la suite de l'injection de l'implant. De plus, il faut connaître les normes élaborées par les instances autoritaires ainsi que les méthodes d'analyse communément utilisées.

2.2. La réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire survient normalement après une lésion dans un tissu vascularisé (Park et Park 1996). La rougeur, l'enflure et la douleur sont les signes associés à une réaction inflammatoire aiguë. Ces signes sont accompagnés de l'invasion du site lésé par diverses cellules, dont le rôle est de phagocyter les débris présents et de réparer les tissus. Dans les minutes qui suivent la lésion, l'histamine, qui est libérée à

partir de granules situées principalement dans les mastocytes, entraîne une vasodilatation des artérioles, ce qui accroît le flux sanguin (Baud 1992). De plus, l'histamine augmente la perméabilité des parois endothéliales, ce qui entraîne la formation d'un exsudat de protéines qui constitue l'œdème (Black 1999). Enfin, l'histamine exerce un effet chimiotactique sur les neutrophiles éosinophiles, ou leucocytes polymorphonucléés (PMN) (Baud 1992). Ainsi, les premières cellules présentes sur le site de la lésion sont les PMN, qui adhèrent à l'endothélium des capillaires sanguins pour pénétrer dans le tissu par diapédèse. La réaction inflammatoire est amplifiée par les cytokines, qui sont des médiateurs sécrétés par plusieurs types de cellules afin de permettre la communication de ces dernières entre elles et avec les organes (Baud 1992). Les cytokines regroupent différentes molécules, telles que les interleukines (IL), les INF et les facteurs de croissance. Par exemple, le « *tumor necrosis factor α* » (TNF- α ou cachectine), produit entre autres par les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, possède diverses activités immunorégulatrices et métaboliques; il stimule l'expression des molécules d'adhésion sur les leucocytes et sur les cellules endothéliales (Anderson 2001), il stimule la phagocytose et il induit la fièvre. De manière générale, la réaction inflammatoire aiguë dure de quelques minutes à quelques jours, selon l'intensité de la lésion. Graduellement, les neutrophiles sont remplacés par les monocytes et les lymphocytes, lesquels sont responsables de la réaction inflammatoire chronique. Les lymphocytes produisent les IL-3 et/ou 4, qui induisent l'adhésion des monocytes, la différenciation en macrophages, puis éventuellement, leur fusion en cellules géantes à corps étrangers (CGCE). Les macrophages sont probablement les cellules les plus importantes de l'inflammation chronique, non seulement à cause de leur rôle de phagocyte, mais aussi à cause de la quantité de médiateurs de l'inflammation qu'ils produisent (Anderson 2001). Ils sécrètent divers facteurs de croissance (p. ex. facteur de croissance des plaquettes et des fibroblastes) de même que l'IL-1 et le TNF- α , qui contribuent à la prolifération des fibroblastes, la néoangiogénèse et la régénération des cellules épithéliales. Ainsi, les macrophages éliminent les particules d'implant et initient la réparation tissulaire par la formation du tissu de granulation (Anderson et Langone 1999). Ce dernier est constitué de fibroblastes, de collagène et de nouveaux capillaires sanguins. Selon la sévérité de la blessure, le tissu de granulation, qui est considéré

comme la guérison de la plaie, peut apparaître autour de l'implant et dans les interstices du matériau dans les 3 à 5 jours suivant l'injection (Anderson 2001). Enfin, si la réaction persiste suffisamment longtemps, l'implant sera isolé de l'organisme par la formation d'une capsule fibreuse, constituée de tissu conjonctif. Ce tissu est formé de collagène, de fibronectine, de laminine et de glycosaminoglycans sécrétés principalement par les fibroblastes. L'épaisseur de la capsule fibreuse est importante puisqu'elle peut modifier la diffusion d'un PA, et donc, la performance d'un système de libération prolongée (Ratner 2002; Sharkawy 1997).

Anderson et Shive (Anderson et Shive 1997) ont établi la séquence normale d'événements survenant à la suite de l'implantation d'un biomatériau injectable dans le tissu i.m. et s.c. (fig. 2.1 et tableau I). Elle dépend des propriétés de l'implant (taille, forme, propriétés physicochimiques), mais aussi de l'organe et de l'espèce en cause. La composante aiguë de l'inflammation est habituellement minime, puisque le système est injecté avec une aiguille, ce qui n'entraîne qu'un léger traumatisme aux tissus par rapport à une chirurgie. Yamaguchi et Anderson ont observé cette série d'événements (fig. 2.1) pendant 150 jours après l'injection s.c. de microsphères constituées de PLA/PLGA (65:35) actuellement commercialisées pour la libération de diverses molécules (p. ex. Risperdal Consta[®]).

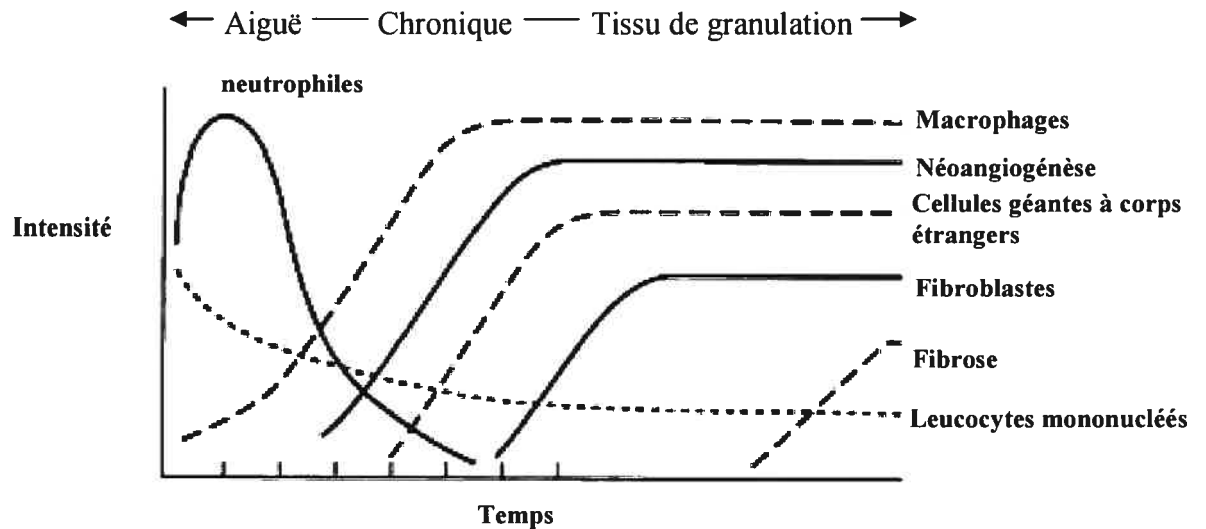


Figure 2.1. Évolution dans le temps des réactions inflammatoires aiguë et chronique, avec le développement de tissu de granulation et la réaction à corps étrangers à la suite de l'implantation d'un biomatériau. Leucocytes mononucléés : monocytes, lymphocytes. Adapté de (Anderson et Shive 1997) et reproduit avec l'autorisation de Elsevier.

Tableau I : Séquence d'événements locaux à la suite de l'injection d'un biomatériau : le continuum de la réponse tissulaire. Adapté de (Anderson et Shive 1997)

-
1. Lésion : injection
 2. Inflammation aiguë : leucocytes polymorphonucléés (neutrophiles)
 3. Inflammation chronique : monocytes et lymphocytes
 4. Réaction à corps étrangers : macrophages et cellules géantes multinucléées^a
 5. Tissu de granulation : fibroblastes et nouveaux capillaires^a
 6. Fibrose : capsule fibreuse
-

^a Les événements 4 et 5 se produisent simultanément

2.3. Caractéristiques d'un IAI biocompatible

Pour qu'un matériau soit biocompatible, il doit être inerte et n'entraîner aucune réaction spécifique lors de son administration. Certains matériaux ont démontré un effet pro-inflammatoire *in vivo*. Mi *et al.* (Mi, Tan, *et al.* 2002) ont observé que l'injection de microsphères de chitosan dans le tissu i.m. de rats a causé une réaction inflammatoire aiguë intense pendant les 3 premiers jours, avec une accumulation importante de neutrophiles et de monocytes. Cet effet chimiotactique du chitosan a aussi été noté par d'autres auteurs (VandeVord, Matthew, *et al.* 2002). En plus du matériau, il faut tenir compte du PA incorporé dans le système. L'ajout du médicament dans le dispositif de libération prolongée en fait une nouvelle entité, dont la biocompatibilité doit être confirmée indépendamment (Anderson et Langone 1999). Kranz *et al.* ont comparé l'influence du véhicule sur la toxicité musculaire de la bupivacaïne et de la busérelina 72 h après l'injection i.m. chez le rat (Kranz, Brazeau, *et al.* 2001). La formulation mise au point était constituée d'une solution de PLGA dans un solvant organique (p. ex., la NMP), dispersée dans l'huile d'arachide. Lors de l'injection, le solvant organique diffuse dans les tissus, ce qui entraîne la formation de microparticules de PLGA dans une phase externe huileuse. La libération de créatine kinase (enzyme indiquant la dégradation musculaire) a été de 60% supérieure avec la solution de médicaments par rapport à la formulation de microparticules autoformantes. Les auteurs expliquent ce résultat par un effet protecteur de l'huile sur le tissu musculaire. Cet exemple illustre le fait que le PA peut être toxique en lui-même et avoir un impact sur la biocompatibilité du système. De plus, il souligne que le dispositif de libération prolongée peut atténuer une éventuelle toxicité, comme il pourrait l'augmenter selon sa composition.

Les IAI doivent être biodégradables afin d'éviter une chirurgie pour le retrait. Les produits de dégradation de tous les constituants doivent être éliminés par l'organisme, incluant ceux provenant de la molécule gélifiante (polymère, lipide, etc.), de l'activateur, du solvant et du PA. En général, la molécule active est libérée localement puis se rend dans la circulation sanguine. Elle subit un métabolisme dont la toxicité est étudiée indépendamment du dispositif d'administration utilisé.

Finalement, le système doit être stérile afin de minimiser les risques d'infection. Les méthodes de stérilisation sont diverses et peuvent entraîner une dégradation des constituants de l'implant ou la formation de métabolites toxiques. Si les constituants de la préparation sont liquides, ils peuvent être stérilisés par filtration sur un filtre 0.2 μm , puis mélangés en conditions stériles. Cette méthode ne risque pas d'entraîner de modification des propriétés, mais des pertes peuvent survenir au cours du processus de filtration. Par ailleurs, la stérilisation par la chaleur (humide ou sèche) peut être utilisée pour les matériaux solides ou liquides. Avec la chaleur humide, le matériau est exposé à la vapeur pendant 15 à 20 minutes pour éliminer les bactéries présentes. Avec la chaleur sèche, la température à atteindre est 120°C à 180°C pendant 1 à 6 h. Ces températures extrêmes peuvent être difficiles à supporter pour une molécule fragile. Pour ces molécules, la stérilisation par irradiation γ est une autre alternative. Dans ce cas, l'irradiation ne doit entraîner aucune modification des propriétés des composants (Black 1999). Ainsi, le processus de stérilisation doit être adapté à chaque nouvelle formulation et la biocompatibilité d'un matériau dépend de la méthode de stérilisation utilisée.

2.4. Méthodes pour étudier la biocompatibilité des systèmes de libération prolongée de médicaments

L'étude de la biocompatibilité d'un nouveau matériau dépend principalement de la nature et de la durée du contact avec un tissu spécifique (Anderson 2001). Les systèmes de libération prolongée de médicaments injectables sont difficiles à classer parmi les biomatériaux. Pour le moment, ils sont considérés comme des dispositifs médicaux implantables en contact prolongé avec les tissus (> 24h, < 30 jours) par les organismes « *International Standard Organization* » (ISO) et FDA, qui n'ont pas établi de catégorie particulière pour ces systèmes (FDA 1995; ISO 1993). En fait, il n'existe, pour le moment, aucune définition claire de la biocompatibilité des IAI (Ratner 2002). Mallapragada et Narasimhan (Mallapragada et Narasimhan 1999) ont établi divers tests qui devraient être effectués sur un système de libération prolongée avant de pouvoir le qualifier de biocompatible (tableau II). La norme ISO 10 993 et les lignes directrices de la FDA recommandent aussi divers tests *in vitro* et *in vivo* sur le dispositif final,

contenant le médicament. Cependant, dans une démarche de développement de la formulation, il est judicieux de vérifier la biocompatibilité du véhicule, avant l'incorporation du PA, lorsque celle-ci n'est pas connue. Généralement, une première évaluation de la biocompatibilité tissulaire (histologie) est effectuée après l'injection du dispositif dans le tissu s.c. ou i.m. (Anderson 2001). La durée de l'évaluation doit être proportionnelle à la période de libération du médicament envisagée.

Tableau II : Tests de biocompatibilité que doit subir un implant à libération contrôlée selon le tissu dans lequel il est implanté. (+) requis; (-) non-requis. Adapté de (Mallapragada et Narasimhan 1999).

Test	Site d'implantation du dispositif		
	Tissus mous et fluides	Tissus osseux	Sang
Cytotoxicité <i>in vitro</i>	+	+	+
Implantation intramusculaire	+	-	+
Hémocompatibilité	-	-	+
Hémolyse	-	-	+
Carcinogénicité	+	+	+
Implantation long terme	+	+	+
Injection systémique	+	+	+
Injection intracutanée	+	-	+
Sensibilisation	+	+	+
Mutagénicité	+	+	+
Pyrogénicité	+	+	+

2.5. Conclusion

Les matériaux utilisés pour former les IAI doivent être biocompatibles et biodégradables. La méthode de stérilisation doit être adaptée pour chaque dispositif selon sa composition et le médicament incorporé. Une fois injectés, les IAI entraînent une réaction inflammatoire aiguë puis chronique, qui évolue dans le temps selon la forme et la taille de l'implant, la sévérité de la lésion et les propriétés du matériau. Une première évaluation de l'histocompatibilité d'un implant est un bon indicateur du potentiel de développement d'un matériau et demeure la méthode la plus utilisée pour évaluer la biocompatibilité des IAI.

2.6. But du projet

Récemment, Couffin-Hoarau *et al.* (Couffin-Hoarau et Leroux 2002; Couffin-Hoarau, Motulsky, *et al.* 2004) ont proposé un nouvel organogel comme IAI, composé d'un OG dérivé de la L-alanine, d'une huile végétale et d'un solvant hydrophile. Pour le moment, aucune étude de libération *in vivo* n'a été publiée. Cependant, les résultats préliminaires *in vitro* ont démontré que moins de 6% du dextran (PM : 9500 g/mol) incorporé dans le gel est libéré après 20 jours. Le but de ce projet de maîtrise a été de caractériser ce système afin d'obtenir une formulation injectable à température ambiante qui forme un implant après une injection s.c. chez le rat. La préparation doit être stable, et le gel, biocompatible et biodégradable. Tout d'abord, la synthèse de six OG a été réalisée et les gels formés dans différentes huiles pharmaceutiques ont été caractérisés. Ensuite, les meilleurs candidats ont été sélectionnés pour la mise au point d'une formulation injectable à température ambiante. Finalement, la biocompatibilité des implants a été testée *in vivo* chez le rat.

CHAPITRE 3. Article

Characterization and biocompatibility of organogels based on L-alanine for parenteral drug delivery implants

Aude Motulsky¹, Michel Lafleur², Anne-Claude Couffin-Hoarau¹, Didier Hoarau³,
Frank Boury⁴, Jean-Pierre Benoit⁴ and Jean-Christophe Leroux^{1*}.

¹Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, ²Department of
Chemistry, University of Montreal, C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montréal, QC, H3C
3J7, CANADA

³Ethypharm Inc., 200 boul. Armand Frappier, Laval, QC, H7V 4A6, CANADA

⁴INSERM U 646, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Immeuble IBT, 10 Rue André
Boquel, Angers, 49 100, FRANCE

*: To whom correspondence should be addressed.

Email address: Jean-Christophe.Leroux@umontreal.ca

Fax number: (1) 514-343-7738

Running head: Organogel-based implants

Submitted to: Biomaterials

ABSTRACT

The development of simple and efficient drug delivery systems for the sustained release of peptides/proteins and low molecular weight hydrophilic molecules is an ongoing challenge. The purpose of this work was to prepare and characterize novel biodegradable *in situ*-forming implants obtained *via* the self-assembly of L-alanine derivatives in pharmaceutical oils. Six different amphiphilic organogelators based on L-alanine were synthesized. These derivatives could successfully gel various vegetable and synthetic oils approved for parenteral administration. Gelation was thermoreversible, and phase transition temperatures depended on gelator structure, concentration and solvent. Hydrogen bonds and van der Waals interactions were shown to be the main forces implicated in network formation. Selected formulations were then injected subcutaneously in rats for preliminary assessment of biocompatibility. Histopathological analysis of the surrounding tissues revealed mild, chronic inflammation and an overall good biocompatibility profile of the implants over the 8-week evaluation period. This study demonstrates that *in situ*-forming organogels represent a potentially promising platform for sustained drug delivery.

KEYWORDS

in situ-forming implant, biocompatibility, controlled drug release, organogel

3.1. Introduction

In recent years, there has been a great deal of interest in developing parenteral sustained-release drug delivery systems. Advances in biotechnology have led to the emergence of new therapeutic entities, such as oligonucleotides, peptides and proteins, which are poorly absorbed *via* the digestive tract because of their large size and physicochemical susceptibility to degradation. Use of the parenteral route represents the easiest and most common way to circumvent gastrointestinal degradation and first-pass effect. Moreover, formulations that enable the release of an active compound over a certain period of time enhance patient compliance in chronic treatment [1]. Accordingly, biodegradable, injectable, controlled-release implants are attractive platforms since they offer the advantages of simplifying the dosing schedule while protecting fragile, active compounds from enzymatic degradation, without any surgical procedure for insertion. To date, microparticles represent one of the most studied parenteral systems for the long-term delivery of drugs [2].

Formulations based on microspheres of poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) are approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the sustained release of peptides (*e.g.* leuprolide acetate) [3] and small molecules (*e.g.* risperidone) [4]. However, the use of microspheres has some disadvantages, such as the need for reconstitution before injection and a relatively complex manufacturing technique to yield a sterile, stable and reproducible product [5]. Moreover, the small size of microspheres and their possible migration from the injection site can be problematic should the system need to be quickly removed from the body. With these shortcomings

in mind, research has focused on developing *in situ*-forming implants. They consist of low-viscosity formulations that solidify after *in vivo* injection in response to modifications in their environment [6]. Their lower specific surface area compared to particulate systems may help reduce burst release, which is common with microspheres [7]. Also, the active compound is generally incorporated by simple mixing with the constituents. The most studied *in situ*-forming implants are polymeric, temperature-sensitive hydrogels [8]. At room temperature, the aqueous polymer solution behaves as a viscous liquid, whereas at body temperature (37°C) the solution is transformed into a semi-solid gel. Injectable implants can also be obtained through the *in situ* precipitation of a water-insoluble, biodegradable polymer, such as PLGA, initially dissolved in organic solvents like *N*-methyl pyrrolidone (NMP) [9]. This approach has led to the recent commercialization of a PLGA-based injectable implant (Eligard[®], Sanofi-Synthelabo Inc.) that releases leuprolide for up to 6 months [10]. However, the high proportion of organic solvent in the formulation may result in high burst release, since the active compounds can diffuse with the solvent in the surrounding tissue prior to polymer precipitation. Moreover, the hydrolysis of lactide/glycolide copolymers generates acidic metabolites that can be detrimental to labile, active compounds [11].

Recently, it was hypothesized that a hydrophobic environment such as that found in oil-based gels (organogels) would constitute an adequate matrix for the sustained release of hydrophilic molecules [12]. Many studies have reported that some non-polymeric, low-molecular mass compounds, referred to as organogelators, can form network structures in hydrophobic solvents as a result of non-covalent interactions [13]. The liquid solutions are prepared by dissolving the organogelator in a hydrophobic solvent at

high temperature. Upon cooling, the decrease in gelator-solvent affinity results in network formation through self-assembly of the gelator molecules, entrapping the solvent. We recently demonstrated the gelation ability of lauroyl L-alanine derivatives in soybean oil and medium chain triglycerides [14]. To disrupt physical interactions between organogelator molecules and permit injection at room temperature, ethanol was added to the formulation. Upon injection, this solvent diffused into the surrounding tissues and allowed *in situ* formation of the implant.

The objective of the present study was to characterize these novel, injectable, *in situ*-forming implants. Six derivatives of L-alanine were synthesized, and their gels in different parenteral oils were characterized with respect to their transition temperature and gelation mechanism. Finally, the biocompatibility of selected formulations was assessed by histological evaluation of the tissues adjacent to the implants.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Materials

L-alanine methyl ester hydrochloride, L-alanine ethyl ester hydrochloride, lauroyl chloride, stearyl chloride, triethylamine and NMP were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada) and used as received. Super Refined safflower oil was kindly provided by Croda Inc. (Toronto, ON, Canada).

3.2.2. Synthesis of ester derivatives

Fatty acid modified L-alanine esters were synthesized by reacting acyl chloride with esterified L-amino acid. This reaction led to the formation of an amide bond linking the alkyl chain to the amino acid derivative [15, 16]. Triethylamine (0.25-0.30 M, 2.2 eq.) was added to a chloroform solution of L-alanine methyl or ethyl ester hydrochloride (0.13-0.15 M, 1.1 eq.), and the mixture was stirred for 15 min. Then, lauroyl (C₁₂) or stearoyl (C₁₈) chloride (0.11-0.13 M, 1 eq.) dissolved in chloroform was added dropwise, and the solution was stirred under an argon atmosphere until complete reaction of the amine group (~5 h). Progression of the reaction was monitored by thin layer chromatography. The solution was successively washed twice with water, a saturated aqueous solution of NaCl, a saturated solution of NaHCO₃, HCl (1 N) and again water. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude oil obtained was purified either by repeated recrystallization or by adsorption chromatography over a silica column to yield white solids. All samples were analyzed by liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry (MS) and diode array detectors (DAD). A mixture of methanol and water containing 0.1% v/v formic acid was used as mobile phase. The MS detector was a Sciex Q-Trap 2000 (Applied Biosystems, Foster City, CA), which was set to 5.2 and 4.2 keV in positive and negative mode, respectively. The DAD detector was an Agilent Model G1315B (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) using a wavelength range from 190 to 400 nm. The purity levels were determined from the DAD chromatogram obtained. ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker ARX-400 spectrometer (400 MHz) (Bruker, Milton, ON, Canada) in deuterated chloroform,

unless otherwise stated. Data are reported as follows: chemical shift in ppm with multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, qt=quintet, m=multiplet) and integration values in parenthesis.

N-Lauroyl L-alanine methyl ester (LAM) mp = 58°C. ¹H NMR: 0.87 (t, 3H), 1.29 (m, 16H), 1.40 (d, 3H), 1.61 (qt, 2H), 2.19 (t, 2H), 3.75 (s, 3H), 4.61 (qt, 1H), 5.98 (d, 1H). Elemental analysis (EA) (% w/w) calculated for C₁₆H₃₁NO₃: C, 67.33; H, 10.95; N, 4.91. Found: C, 67.36; H, 11.25; N, 4.93. Yield: 70%. Purity: 98%+.

N-Lauroyl L-alanine ethyl ester (LAE) mp = 44°C. ¹H NMR: 0.87 (t, 3H), 1.29 (m, 19H), 1.40 (d, 3H), 1.62 (qt, 2H), 2.19 (t, 2H), 4.20 (q, 2H), 4.59 (qt, 1H), 6.00 (d, 1H). EA (% w/w) calculated for C₁₇H₃₃NO₃: C, 68.19; H, 11.11; N, 4.68. Found: C, 68.14; H, 11.57; N, 4.69. Yield: 65%. Purity: 98%+.

N-Stearoyl L-alanine methyl ester (SAM) mp = 85°C. ¹H NMR: 0.88 (t, 3H), 1.25 (m, 32H), 1.40 (d, 3H), 1.63 (qt, 2H), 2.20 (t, 2H), 3.75 (s, 3H), 4.61 (qt, 1H), 5.97 (d, 1H). EA (% w/w) calculated for C₂₂H₄₃NO₃: C, 71.49; H, 11.72; N, 3.79. Found: C, 71.53; H, 11.73; N, 3.82. Yield: 80%. Purity: 98%+.

N-Stearoyl L-alanine ethyl ester (SAE) mp = 73°C. ¹H NMR: 0.88 (t, 3H), 1.25 (m, 32H), 1.40 (d, 3H), 1.63 (qt, 2H), 2.20 (t, 2H), 4.20 (q, 2H), 4.58 (qt, 1H), 5.97 (d, 1H). EA (% w/w) calculated for C₂₃H₄₅NO₃: C, 72.01; H, 11.82; N, 3.65. Found: C, 71.91; H, 12.39; N, 3.66. Yield: 60%. Purity: 98%+.

3.2.3. Synthesis of acid derivatives

N-lauroyl L-alanine (LA) and *N*-stearoyl L-alanine (SA) were obtained after alkaline hydrolysis of the methyl ester derivatives [16]. LAM or SAM was dissolved in a minimal volume of tetrahydrofuran, and an aqueous solution of NaOH (1 N) was added to reach a pH of 10. The solution was stirred under an argon atmosphere until completion of the hydrolysis and then acidified with HCl. The acid derivative was extracted with chloroform and purified by column chromatography over silica gel.

LA. mp = 97°C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.85 (t, 3H), 1.23 (m, 16H), 1.46 (qt, 2H), 2.07 (t, 2H), 4.16 (qt, 1H), 8.06 (d, 1H), 8.88 (s, 1H). EA (% w/w) calculated for C₁₅H₂₉NO₃: C, 66.38; H, 10.77; N, 5.16. Found: C, 66.45; H, 11.02; N, 5.16. Yield: 86%. Purity: 95%+.

SA. mp = 116°C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.85 (t, 3H), 1.23 (m, 28H), 1.46 (qt, 2H), 2.07 (t, 2H), 4.15 (qt, 1H), 8.06 (d, 1H), 8.03 (d, 1H). EA (% w/w) calculated for C₂₁H₄₁NO₃: C, 70.94; H, 11.62; N, 3.94. Found: C, 70.44; H, 11.66; N, 3.92. Yield: 65%. Purity: 95%+.

3.2.4. Gelation temperature and gel characterization

Inverse flow method - The organogelators were examined for their ability to gel safflower oil. Sol-gel phase transition diagrams were first obtained by the inverse flow method. The temperature of gel formation corresponds to the temperature at which no sample flow is observed when vertically inverting the tube containing the sample [17]. In a test tube, a weighed amount of the gelator was dissolved in a measured volume of oil to produce concentrations ranging from 0.5 to 30% (w/v). The mixture was gently heated in a water bath, vortexed until dissolution of the organogelator, and was then

allowed to cool overnight at 4°C. Sol-gel phase transition temperature (T_{SG}) was determined as follows: the gels were placed in a temperature-controlled water bath ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) at 80°C and left to rest for 15 min. The temperature was then lowered in decrements of 2°C down to $\sim 0^\circ\text{C}$ (ice bath). The system was allowed to equilibrate for 15 min after each decrease in temperature, and phase transition (flow/no flow) was assessed by inverting the tube vertically. T_{SG} is defined as the midpoint of the temperature range above which gelation occurs [18]. Gel-sol phase transition temperature (T_{GS}) was measured by heating the sample stepwise up to 80°C, following the same procedure.

Differential scanning calorimetry (DSC). Because the inverse flow method is a relatively subjective technique, phase transition diagrams were also established by DSC. Thermograms of oils, bulk gelators and gels were recorded on a Mettler Toledo TC15 (Mettler Toledo, Virolay, France) calorimeter interfaced with a TA thermal analysis controller. The instrument was calibrated with indium. The oil was weighed in a Mettler M3 microbalance ($\pm 1 \mu\text{g}$) (Mettler Toledo) in an aluminum pan, and the organogelator was added at concentrations ranging from 2 to 30% (w/v). After sealing the cup, the temperature was stabilized for 10 min at 20°C above the gelator melting point. At least 2 heating and cooling scans per sample were recorded at a temperature ramp of 10°C/min. Loss of solvent during the scans was verified by weighing the cup before and after the measurement.

Thermal Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Infrared spectra of the bulk solids were recorded on a Spectrum One FTIR spectrometer (Perkin Elmer, Shelton, CT) using a Golden Gate Diamond ATR accessory. The spectra of pure safflower oil and gels were recorded as a function of temperature on a BioRad FTS-25 spectrometer (BioRad Laboratories, Randolph, MA) equipped with a water-cooled globar source, a KBr Beam splitter, and a deuterated triglycine sulfate detector. The concentration of the gelator was selected to obtain a transition temperature (T_1) between 20 and 70°C, *i.e.* between 2.5 and 10% (*w/v*) for LA, SA, SAM and SAE, and 30% (*w/v*) for LAM and LAE. An aliquot of the organogelator solution in oil was deposited between 2 CaF₂ windows separated by a 5- μ m Teflon spacer. This assembly was placed in a brass sample holder whose temperature was controlled by Peltier thermopumps. A first spectrum of the gel-state sample was obtained at room temperature. The sample was heated to 80°C with 5 to 10°C increments, except around the T_1 where the increment was of 2°C. At each temperature, the sample was equilibrated 10 min before data acquisition and each spectrum was the average of 80 scans with a nominal resolution of 2 cm⁻¹. Reverse transitions were also examined by cooling down the samples, and the changes were found to be reversible. Pure safflower oil spectra were recorded at room temperature and at 80°C. The spectra were analyzed with GRAMS software (Galactic Industry, Salem, NH). FTIR spectra of the organogelator dissolved in chloroform were also obtained at room temperature, with NaCl windows.

3.2.5. Biocompatibility studies

All animal care and studies, carried out in accordance with current guidelines for investigations and experiments in conscious animals, were approved by the Animal Welfare and Ethics Committee of the University of Montreal. The formulations were prepared under aseptic conditions after the sterilization of each constituent. Male Wistar rats (225-250 g) (Charles River, St. Constant, QC, Canada) were randomly assigned to 4 groups (n=3/group), *i.e.* SAE 10% (w/v) or SAM 7.5% (w/v) in safflower oil with 10% (v/v) NMP, and 2 negative controls, *i.e.* oil only and oil with 10% (v/v) NMP. Animals were injected s.c. in both hind paws with 250 μ L of the formulation *via* a 25-G needle. After injection, the needle was held in place for 3 s to allow time for gel formation and to prevent the solution from leaking out of the injection site. After 3 days, 7 days, 2, 4, 6 and 8 weeks, the animals were sacrificed by asphyxiation with CO₂. Tissues adjacent to the injection site were collected and fixed with 10% neutral-buffered formalin. The tissue sections were processed and embedded in paraffin. Glass slides with 4- μ m tissue sections were prepared using a Leica 2155 microtome (Leica Microsystems Inc., Richmond Hill, ON, Canada). Slides of each implant were stained according to a hematoxylin-phloxin-safran (HPS) standard procedure, employing hematoxylin (nucleus coloration) and phloxin (cytoplasmic coloration) for cellularity and cell number, and safran for collagen deposition and fibrous tissue formation [19]. The local inflammatory response was assessed by histological evaluation of the surrounding tissues for signs of acute inflammation (neutrophils and eosinophils) and chronic inflammation (histiocytes, plasmocytes, lymphocytes, multinucleated giant cells, fibroblasts, neoangiogenesis, and collagen deposition) [20]. The intensity of the response was graded on a scale of 0 to 5,

depending on the number of cells and general aspect of the tissue (absent, minimal, mild, moderate, significant and severe).

3.3. Results and discussion

3.3.1. Characterization of the gels

Six organogelators were synthesized and evaluated with respect to their gelling ability in safflower oil to identify the best candidates for the development of *in situ*-forming implants (Fig. 1). Super refined oil was selected to improve the stability of the formulation. Super refining processes offer the highest purity triglycerides by removing any polar substance from the oil, thus minimizing oxidation and hydrolysis. Addition of acid or ester derivatives (methyl or ethyl) of L-alanine grafted with either C₁₂ or C₁₈ alkyl chains gelled safflower oil depending on concentration. Figure 2 shows the variation of T_t (obtained by the inverse flow method) as a function of gelator concentration in safflower oil. Transitions were fully reversible, and the gels were turbid or opaque. The temperature at which transition occurred increased with gelator concentration, and then leveled off. Stearoyl derivatives presented higher T_t than lauroyl derivatives. Gels prepared with ester derivatives exhibited lower T_t than their acid counterparts. This difference in T_t was more pronounced for gels prepared with the more hydrophobic ethyl esters than for gels prepared with the methyl esters. Similarly, Battacharya and Krishnan-Gosh observed that methylation of the -CO₂H group of LA hindered the gelation of different organic solvents at an organogelator concentration below 1.2% (w/v) [16]. As observed previously by our group in soybean oil [14], lauroyl derivatives exhibited strong hysteretic behavior with T_{GS} exceeding T_{SG} by at least 10°C

for gels containing more than 10% (w/v) gelator. The gelled samples did not revert to the sol state, even when stored for 6 months at a temperature between T_{SG} and T_{GS} (data not shown). Conversely, the T_i curves of stearyl derivatives were almost superimposed irrespective of their concentration. LC-MS analysis of the organogelators revealed that the ester derivatives contained less than 2% (w/w) of residual L-alanine. It was verified that the gelling properties of the organogelator and the phase transition temperatures were not affected by L-alanine even when the gel was doped with this impurity at a concentration largely exceeding that found in the system (data not shown). SA and LA were found to contain less than 3% of residual ester derivatives SAM and LAM, respectively.

To gain information on the enthalpy changes (ΔH) occurring during gel formation, DSC experiments were performed on pure safflower oil and on safflower oil gels (Figs. 3 and 4). No thermal event was observed in the pure oil scan from -20 to 110°C. Figure 3A presents thermograms of SAM, SAE and LAM solutions. Peaks associated with endothermic gel-sol transitions were broader than those associated with exothermic sol-gel transitions. The enthalpies of lauroyl derivatives were lower than those of stearyl derivatives, for both exothermic and endothermic transitions (Fig. 3B). The T_{SG} of gels in safflower oil are plotted in Figure 4A as a function of concentration. The curve profiles paralleled those obtained with the inverse flow method, with SA exhibiting the highest T_i . However, the diagrams were not superimposable, as exemplified in Figure 4B for methyl ester derivatives. T_{SG} values ascertained by the inverse flow method were higher than those measured by DSC, especially at

organogelator concentrations exceeding 10% (*w/v*). As reported previously by George and Weiss [21], each method measures a different phenomenon. T_i measured by DSC corresponds to the temperature at which the tri-dimensional network melts, whereas the inverse flow method reports the temperature at which the network disrupts, letting the oil flow under the force of gravity. Therefore, T_i measured by the inverse flow method is either lower or higher than T_i obtained by DSC, depending on whether the system is heated (T_{GS}) or cooled (T_{SG}), respectively.

Hydrogen bond formation in the gel network was monitored by FTIR spectroscopy and compared to molecular interactions in the bulk state. Table I presents the characteristic wavenumbers of stretching vibrations of the NH groups (3,500-3,300 cm^{-1}), carbonyl of amide groups (amide I bands; 1,690-1,600 cm^{-1}), carbonyl of ester or acid groups (1,750-1,700 cm^{-1}) and the wavenumbers of bending vibrations of the NH groups (amide II bands; 1,640-1,550 cm^{-1}) [22] in solid state (powder form), gel state (in safflower oil) and in chloroform solution. As both the organogelators and the triglyceride oils possess ester bonds (Fig. 1), peaks in the 1,750-1,720 cm^{-1} region could not be used for characterization of the gel network. Moreover, the pure safflower oil spectrum could not be subtracted from the gel spectrum because interactions between the ester groups of both components with the NH groups of the organogelator alter the position and band shape of the peaks. Generally, the organogelator spectra in solid state were similar to those in the gel state. They were characterized by sharp bands indicative of intermolecular hydrogen bonding between amide groups, *i.e.* 3,310-3,325 cm^{-1} (νNH), 1,643-1,645 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$) and 1,555-1,525 cm^{-1} (amide II band) [15, 23]. In

addition, no νNH peak indicative of free NH groups ($\sim 3,430\text{ cm}^{-1}$) was detected in solid or gel samples of the 6 gelators, whereas it appeared in chloroform solutions. The amide II bands were shifted to lower wavenumbers in chloroform, indicating stronger hydrogen bonding of the NH groups in the solid or gel state [24]. For LA and SA, peaks locating at $\sim 1,705\text{ cm}^{-1}$ in the bulk or gel state were assigned to $\nu\text{C}=\text{O}$ of the H-bonded $-\text{CO}_2\text{H}$ groups, characteristic of the formation of carboxylic acid dimers, as demonstrated previously by others for LA in different organic solvents [15, 16]. Such dimerization was not observed in chloroform as the $\nu\text{C}=\text{O}$ peak was shifted up by 20 to 30 cm^{-1} .

To gain further insight into the participation of H-bonding in the gelation process, FTIR spectra of gels in safflower oil were recorded at increasing temperatures. The intensity of νNH stretching, $\nu\text{C}=\text{O}$ (ester), and amide I and II bands varied during transition. Figure 5 shows the FTIR spectra of the amide I and II regions and the NH stretching region of stearyl ester derivatives at different temperatures. In the $1,550\text{--}1,700\text{ cm}^{-1}$ region, 2 isosbestic points were observed, indicating the presence of 2 different absorbing species during phase transition: C=O groups of amide functions implicated in hydrogen bonding in the gel state ($1,649\text{ cm}^{-1}$), and free in the liquid state ($1,686\text{ cm}^{-1}$) [23]. It was possible to probe the evolution of the proportion of these 2 C=O groups as a function of temperature, assuming that there was only 1 species at extreme temperatures (only the H-bonded form at 20°C and only the free form at 80°C for SAE). The proportion of free amide groups, assessed by their contribution centered at $1,686\text{ cm}^{-1}$, is presented in Figure 6 as a function of temperature. As the temperature rose, the proportion of free amide groups increased progressively. For SAE, spectra

recorded over 70°C were very similar, indicating that the transition was complete. However, for SAM, the proportion of free amide groups did not level off, suggesting that transition was still partial at 80°C. Comparison of the spectrum recorded at 80°C with the high-temperature spectra recorded with SAE indicated that about 83% of the SAM amide groups were free at this temperature. The results showed that most of the H-bonds were broken upon heating, from 55 to 70 °C for SAE and from 55 to 75°C for SAM. In the NH stretching region, the intensity of the peak centered at 3,323 cm⁻¹, which is associated with H-bonded NH groups, decreased progressively with rising temperature. It was also noted that the intensity of the peak due to the free NH groups increased, even though this band overlapped with the pure oil peak centered at 3,470 cm⁻¹. The range of temperature over which the shifts were observed paralleled the phase transition temperatures determined by DSC. The same pattern was seen for lauroyl derivatives (data not shown). Our results indicate that gelation occurs through the self-assembly of organogelator molecules driven by H-bond formation between L-alanine polar groups and that the gel-sol transition observed upon heating can be directly associated with the destruction of the H-bond network. Regarding SA, it was not possible to examine phase transition to the sol state since T_t was above the temperature accessible with the FTIR system (Fig. 4A).

Van der Waals interactions may also be involved in the self-assembling process. Indeed, an increase in alkyl chain length from C₁₂ to C₁₈ resulted in gels with both higher T_t and enthalpies of phase transition. The observed ΔH of sol-gel transitions for 10% (w/v) gels in safflower oil were approximately -35 kJ/mol and -55 kJ/mol for lauroyl and stearoyl derivatives, respectively (Fig. 3B). The enthalpic contribution

associated with interactions between the methylene groups of the alkyl chains was estimated to be ~ 3.3 kJ/CH₂, assuming that both types of derivatives were involved to the same extent in H-bonding. This value is consistent with van der Waals interaction forces (0.8-8 kJ/mol [25]). Moreover, since the enthalpy of transition is higher than H-bond energy for the self-association of 2 amide groups (8-25 kJ/mol [26]), forces other than hydrogen bonding must be involved in gelation [18]. This observation is also supported by the fact that a simple *n*-alkanes molecule bearing no H-donor or acceptor groups can gel organic solvents [27].

3.3.2. Biocompatibility of *in situ*-forming implants

Gels prepared with stearyl methyl and ethyl ester derivatives in safflower oil presented T_{GS} above body temperature (37°C) at relatively low concentrations (7.5 and 10% (w/v), respectively). Accordingly, they were selected for evaluation of their biocompatibility in an 8-week study after s.c. injections in rats. The corresponding acid was not evaluated since it was demonstrated previously that ester derivatives were more suitable for the development of a depot formulation [14]. In order to inject the formulation, an oil-miscible organic solvent that partially disrupts interactions between organogelator molecules at room temperature was added to the formulation [14, 16]. After s.c. administration, such a solvent can freely diffuse in the surrounding tissues, allowing network arrangement and implant hardening *in situ*. NMP was chosen because it showed adequate inhibition of gelation at a concentration below 10% (v/v), and is used in pharmaceutical formulations [28]. To evaluate the biocompatibility of the *in situ*-forming implants, the injection sites were observed, and the surrounding tissues were

harvested for histopathological analysis. Macroscopic evaluation of the injection site revealed no inflammatory reaction (redness or swelling). Tissue response was evaluated three days after injection of negative controls (safflower oil with 10% (v/v) NMP formulation or pure safflower oil), and three days, one, two, four, six and eight weeks after injection of SAE or SAM formulations. Mononuclear leukocytes encircled both the pure and NMP-containing oily solutions (data not shown). Some polymorphonuclear cells (PMN) were observed around the injection site. The chronic inflammatory reaction was graded between 1 (minimal) and 2 (mild) for both preparations. Concerning the organogelator-based formulations, the size of the implants decreased progressively with time and almost disappeared after 8 weeks. Figures 7 and 8 show representative histology photomicrographs of the s.c. implant sites at different time points. The standard HPS procedure does not stain the implants, and thus the latter appear as empty vacuoles on the pictures. Generally, the inflammatory reaction was located in the hypoderm. In all cases, the response was limited to the immediate area around the gel, with the surrounding tissues appearing normal. A typical granulomatous inflammatory reaction was observed for both SAM and SAE formulations, and characterized by the presence of mononuclear leukocytes, particularly macrophages and foreign body giant cells (FBGC) [20]. The acute inflammatory reaction was minimal, since very few PMN were present around the gel 3 and 7 days post-injection, and had completely disappeared after 4 weeks (Fig. 7). This was expected since physical injury to the tissue is limited after injection of a liquid formulation compared to a surgical insertion procedure. From the 7th day, discrete granulation tissue developed, with fibroblast proliferation, collagen deposition and new capillary formation, indicating healing of the implant sites [29, 30]. The tissue responses for both formulations were similar over time, with average tissue

response scores considered to be moderate (3) after 2 weeks, gradually decreasing to mild (2) after 4 weeks, and minimal (1) after 6 and 8 weeks. At that time, there were few inflammatory cells present in the surrounding tissue, with very few FBGC surrounding the remaining vacuoles (Fig. 8).

Overall, the inflammatory reaction observed around the organogel implants was in accordance with the well-known foreign body reaction described extensively by Anderson and Shive as the normal wound healing response to biocompatible and biodegradable material [20, 30, 31]. These results demonstrate the good biocompatibility of an *in situ*-forming implant consisting of stearyl ester L-alanine derivatives, safflower oil and NMP. Yamagushi and Anderson observed the same sequence of events after the s.c. injection of PLGA microspheres in rats [29]. Copolymers of lactide and glycolide are well-known to be biodegradable and biocompatible [30], and many of them have been FDA-approved as part of parenteral injectable products, such as microspheres for the sustained release of risperidone, naltrexone and leuprolide acetate. Few studies investigating the biocompatibility of lipid-containing formulations have been published. Reithmeier *et al.* evaluated the biocompatibility of 5-mg glyceryl tripalmitate microparticles implanted s.c. in mice [32]. The particles triggered an inflammatory reaction similar to 50/50 PLGA microparticles. However, the study was conducted over a period of only 7 days. Gao *et al.* observed good biocompatibility of *in situ*-forming gels from glyceryl ester of fatty acids dissolved in a vegetable oil (Labrafil 1944 CS), but histological evaluation of the injection site was not described [33]. The main component of the organogel formulations used in the present study was safflower oil.

Vegetable oils are recognized as safe pharmaceutical excipients and differ mainly by triglyceride chain length and the extent of unsaturation [34]. The results obtained in the present study are encouraging and warrant further investigation to confirm the biocompatibility of *in situ*-forming implants based on L-alanine derivatives after repeated injections.

3.4. Conclusion

In conclusion, this study revealed that L-alanine derivatives were able to gel safflower oil, depending on gelator structure and concentration. Stearoyl derivatives were found to be more effective gelators than lauroyl derivatives since their T_t was higher. Formulations containing 7.5%-SAM or 10% (*w/v*) SAE and 10% (*v/v*) NMP in safflower oil were easily injected s.c. in rats and showed good biocompatibility with surrounding tissues for 8 weeks. Further testing is needed to evaluate the influence of an incorporated active compound on biocompatibility with s.c. tissue. Pharmacokinetics studies will also be carried out to establish *in vivo* release patterns. Organogel-based *in situ*-forming implants appear to be promising systems for the sustained release of active compounds over several weeks and offer simple and safe alternatives to polymeric systems.

3.5. Acknowledgements

This project was funded in part by the Canada Research Chair Program and by the Canadian Institutes of Health Research. Christiane Girard is acknowledged for

histopathological analysis and François Plourde for animal handling. Ecopia Inc. is acknowledged for LC-MS analysis.

3.6. References

1. Cramer MP, Saks SR. Translating safety, efficacy and compliance into economic value for controlled release dosage forms. *Pharmacoeconomics* 1994;5:482-504.
2. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Controlled Release* 2003;90:261-280.
3. Okada H, Doken Y, Ogawa Y, Toguchi H. Sustained suppression of the pituitary-gonadal axis by leuprorelin three-month depot microspheres in rats and dogs. *Pharm Res* 1994;11:1199-1203.
4. Kane JM, Eerdeken M, Lindenmayer JP, Keith SJ, Lesem M, Karcher K. Long-acting injectable risperidone: efficacy and safety of the first long-acting atypical antipsychotic. *Am J Psychiat* 2003;160:1125-1132.
5. Hatefi A, Amsden B. Biodegradable injectable *in situ* forming drug delivery systems. *J Controlled Release* 2002;80:9-28.
6. Matschke C, Isele U, van Hoogevest P, Fahr A. Sustained-release injectables formed *in situ* and their potential use for veterinary products. *J Controlled Release* 2002;85:1-15.
7. Tipton AJ, Dunn RL. *In situ* gelling systems. In: Senior J, Radomsky M. Sustained-release injectable products. Englewood: Interpharm Press 2000; p. 241-278.
8. Ruel-Gariepy E, Leroux JC. *In situ*-forming hydrogels - Review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57:53-63.
9. Ravivarapu HB, Moyer KL, Dunn RL. Sustained suppression of pituitary-gonadal axis with an injectable, *in situ* forming implant of leuprolide acetate. *J Pharm Sci* 2000;89:732-741.
10. Sartor O. Eligard: leuprolide acetate in a novel sustained-release delivery system. *Urology* 2003;61:25-31.
11. Mäder K, Bittner B, Li Y, Wohlauf W, Kissel T. Monitoring microviscosity and microacidity of the albumin microenvironment inside degrading microparticles from poly(lactide-*co*-glycolide) (PLG) or ABA-triblock polymers containing hydrophobic poly(lactide-*co*-glycolide) A block and hydrophilic poly(ethyleneoxide) B blocks. *Pharm Res* 1998;15:787-793.

12. Couffin-Hoarau AC, Leroux JC. Composition with gelling properties intended for the sustained delivery of bioactive substances. US Pat Appl 2002;60/405,720.
13. Terech P, Weiss RG. Low molecular mass gelators of organic liquids and the properties of their gels. *Chem Rev* 1997;97:3133-3159.
14. Couffin-Hoarau AC, Motulsky A, Delmas P, Leroux JC. *In situ*-forming pharmaceutical organogels based on the self assembly of L-alanine derivatives. *Pharm Res* 2004;21:454-457.
15. Luo X, Liu B, Liang Y. Self-assembled organogels formed by mono-chain L-alanine derivatives. *Chem Commun* 2001;17:1556-1557.
16. Bhattacharya S, Krishnan-Gosh Y. First report of phase selective gelation of oil from oil/water mixture. Possible implications toward containing oil spills. *Chem Commun* 2001;2:185-186.
17. van der Laan S, Feringa BL, Kellogg RM, van Esch J. Remarkable polymorphism in gels of new azobenzene bis-urea gelators. *Langmuir* 2002;18:7136-7140.
18. George M, Weiss R. Low molecular-mass gelators with diyne functional groups and their unpolymerized and polymerized gel assemblies. *Chem Mater* 2003;15:2879-2888.
19. Luna LG. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw-Hill; 1960.
20. Anderson JM. Biological responses to materials. *Ann Rev Mater Res* 2001;31:81-110.
21. George M, Weiss RG. Chemically reversible organogels via latent gelators. Aliphatic amines with carbon dioxide and their ammonium carbamates. *Langmuir* 2002;18:7124-7135.
22. Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons; 1994.
23. Schmidt R, Schmutz M, Michel M, Decher G, Mesini PJ. Organogelation properties of a series of oligoamides. *Langmuir* 2001;18:5668-5672.
24. Hafkamp RJ, Feiters MC, Nolte RJM. Organogels from carbohydrate amphiphiles. *J Org Chem* 1999;64:412-426.
25. Suard M, Praud B, Praud L. *Eléments de chimie générale*. Paris: Flammarion; 1977.

26. Joesten MD, Schaad LJ. Hydrogen bonding. New York: Marcel Dekker; 1974.
27. Abdallah DJ, Weiss RG. *n*-Alkanes gel *n*-alkanes (and many other organic liquids). *Langmuir* 2000;16:352-355.
28. Royals MA, Fujita SM, Yewey GL, Rodriguez J, Schultheiss PC, Dunn RL. Biocompatibility of a biodegradable *in situ* forming implant system in rhesus monkeys. *J Biomed Mater Res* 1999;45:231-239.
29. Yamaguchi K, Anderson JM. *In vivo* biocompatibility studies of medisorb 65/35 D,L-lactide/glycolide copolymer microspheres. *J Controlled Release* 1993;24:81-93.
30. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;28:5-24.
31. Anderson JM. *In vivo* biocompatibility of implantable delivery systems and biomaterials. *Eur J Pharm Biopharm* 1994;40:1-8.
32. Reithmeier H, Herrmann J, Gopferich A. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *J Controlled Release* 2001;73:339-350.
33. Gao ZH, Crowley WR, Shukla AJ, Johnson JR, Reger JF. Controlled release of contraceptive steroids from biodegradable and injectable gel formulations - *in vivo* evaluation. *Pharm Res* 1995;12:864-868.
34. Svendsen O. Local muscle damage and oily vehicles: a study on local reactions in rabbits after intramuscular injection of neuroleptic drugs in aqueous or oily vehicles. *Acta Pharmacol Toxicol* 1983;52:298-304.

Table I. Positions (wavenumbers in cm^{-1}) of the characteristic bands of organogelators in the solid state, gel state in safflower oil and in chloroform solution

Organogelator	Sample state	NH stretching vibration	Amide groups		Acid groups
			Amide I (C=O stretching vibration)	Amide II (NH bending vibration)	C=O stretching vibration
SAM	Solid	3,316	1,644	1,540	<i>a</i>
	Gel	3,316	1,646	1,541	
	CHCl ₃ solution	3,433	1,669	1,509	
SAE	Solid	3,311	1,645	1,528	<i>a</i>
	Gel	3,323	1,649	1,540	
	CHCl ₃ solution	3,432	1,665	1,509	
LAM	Solid	3,318	1,645	1,539	<i>a</i>
	Gel	3,316	1,643	1,540	
	CHCl ₃ solution	3,433	1,667	1,508	
LAE	Solid	3,325	1,649	1,525	<i>a</i>
	Gel	3,325	1,647	1,539	
	CHCl ₃ solution	3,432	1,665	1,509	
SA	Solid	3,310	1,643	1,552/1,535	1,702
	Gel	3,325	1,645	1,555/1,537	1,704
	CHCl ₃ solution	3,320	1,650	1,540	1,732/1,705
LA	Solid	3,310	1,644	1,552/1,535	1,702
	Gel	3,313	1,645	1,553/1,536	1,705
	CHCl ₃ solution	3,428	1,666	1,519	1,723

^aThe ester bands could not be investigated due to their severe overlap with the strong absorption of ester groups from the oil.

3.7. Figure Captions

Fig. 1: Structure of amphiphile organogelators derived from L-alanine amino acid (framed).

Fig. 2: T_{GS} (dotted lines, open symbols) and T_{SG} (solid lines and symbols) as a function of gelator concentration in safflower oil obtained by the inverse flow method. SA phase diagram was not measured by the inverse flow method since its T_t exceeded 80°C. SAM (\circ, \bullet), SAE (\diamond, \blacklozenge), LAM (\square, \blacksquare), LAE ($\triangle, \blacktriangle$) and LA ($\nabla, \blacktriangledown$).

Fig. 3: (A) Representative thermograms of stearyl methyl (1) and ethyl (2) ester derivatives and lauroyl methyl ester derivative (3) in safflower oil. (B) Enthalpies of endothermic (open columns) and exothermic (closed columns) transitions of 10% (w/v) gels of L-alanine derivatives in safflower oil. Mean enthalpy \pm S.D. ($n=4$).

Fig. 4: (A) Exothermic transition temperature T_{SG} of safflower gels as a function of the organogelator concentration obtained from cooling DSC scans. SAM (\circ), SAE (\diamond), SA (\star), LAM (\square), LAE (\triangle) and LA (∇). (B) Comparison of T_{SG} of methyl ester derivative gels in safflower oil obtained by the inverse flow method (solid symbol) and DSC (open symbol). SAM (\circ, \bullet) and LAM (\square, \blacksquare). For DSC experiments, transition temperature was defined as the peak maximum.

Fig. 5: Thermal evolution, as probed by FTIR spectroscopy of (A) SAE and (B) SAM 10% (w/v) gel in safflower oil. Changes in amide I and II bands and in the NH stretching region from 20 to 80°C. Arrows indicate changes from the gel (low temperatures) to the liquid (high temperatures) state.

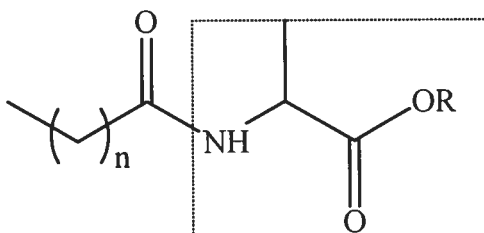
Fig. 6: Proportion of free amide bonds, as determined from the relative intensity of the amide I component located at 1,686 cm^{-1} of SAM (\bullet) and SAE (\blacklozenge), as a function of

temperature. The transition temperatures observed by DSC were 69 and 59°C for SAM and SAE, respectively.

Fig. 7: Optical micrographs of s.c. sites injected with 7.5% (w/v) SAM in safflower oil formulation as a function of time. (A) Day 3 post-injection, a band of mononuclear leukocytes encircles the gel, and small vessels are observed (small arrow). (C) Higher magnification shows some PMN and FBGC beginning to form (arrow head). (B, D) Day 7 post-injection, the gel gradually degrades and fragments into discrete multifocal areas. Vacuoles are surrounded by mononuclear leukocytes (large arrow) and FBGC (arrow head), engulfing the gel. Neoangiogenesis, fibroblasts and collagen are also observed. (E, G) Two weeks and (F, H) 4 weeks after injection, the tissue response evokes a granulomatous inflammatory reaction, with active phagocytosis around vacuoles (arrow). The majority of cells surrounding the vacuoles are macrophages and FBGC (arrow head). Original magnification (A, B, E and F) 25 X and (C, D, G and H) 100 X.

Fig. 8: Optical micrographs of s.c. sites injected with 7.5% (w/v) SAM in safflower oil formulation after (A, C) 6 and (B, D) 8 weeks. The inflammatory reaction is almost complete. The remaining vacuoles are separated by fibroplasia (arrow). Mononuclear leukocytes and inactive FBGC (arrow head) are still observed. Original magnification (A, B) 25 X and (C, D) 100 X.

Figure 1.



- R=CH₃, n=10: *N*-lauroyl L-alanine methyl ester (LAM)
R=CH₂CH₃, n=10: *N*-lauroyl L-alanine ethyl ester (LAE)
R=CH₃, n=16: *N*-stearoyl L-alanine methyl ester (SAM)
R=CH₂CH₃, n=16: *N*-stearoyl L-alanine ethyl ester (SAE)
R=H, n=10: *N*-lauroyl L-alanine acid (LA)
R=H, n=16: *N*-stearoyl L-alanine acid (SA)

Figure 2.

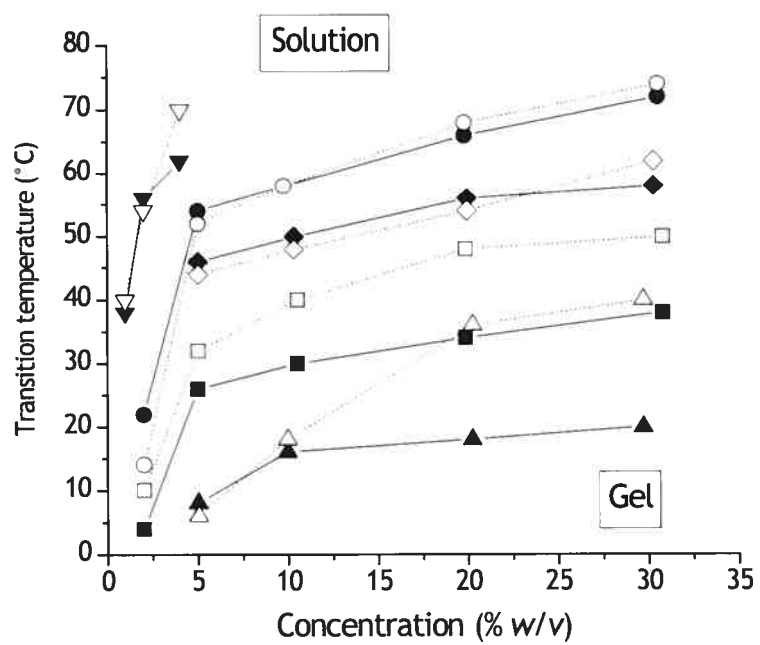


Figure 3.

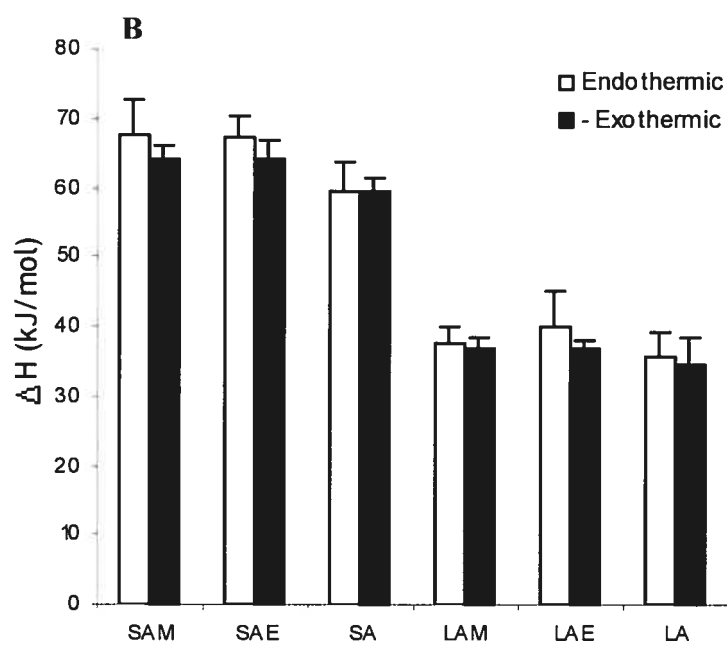
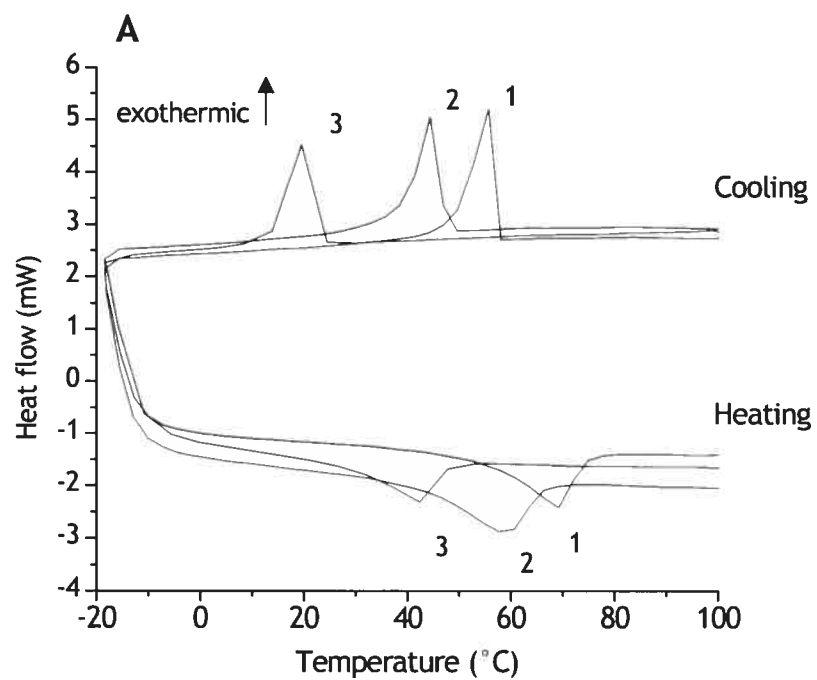


Figure 4.

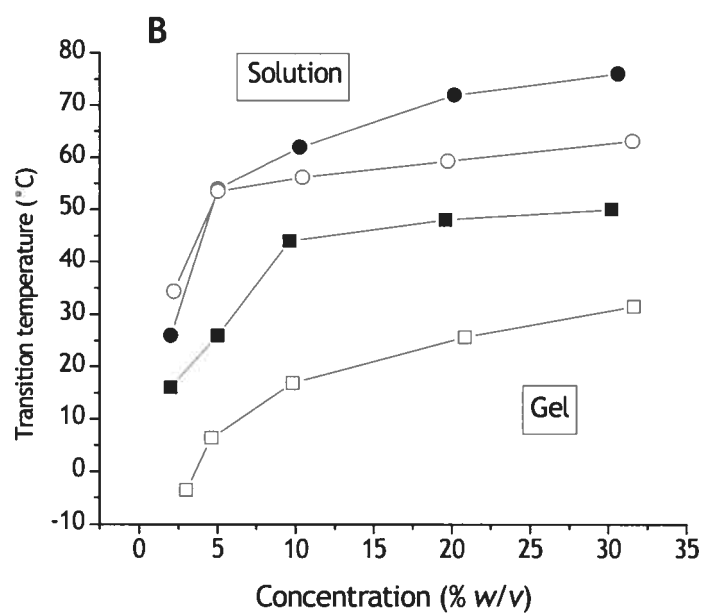
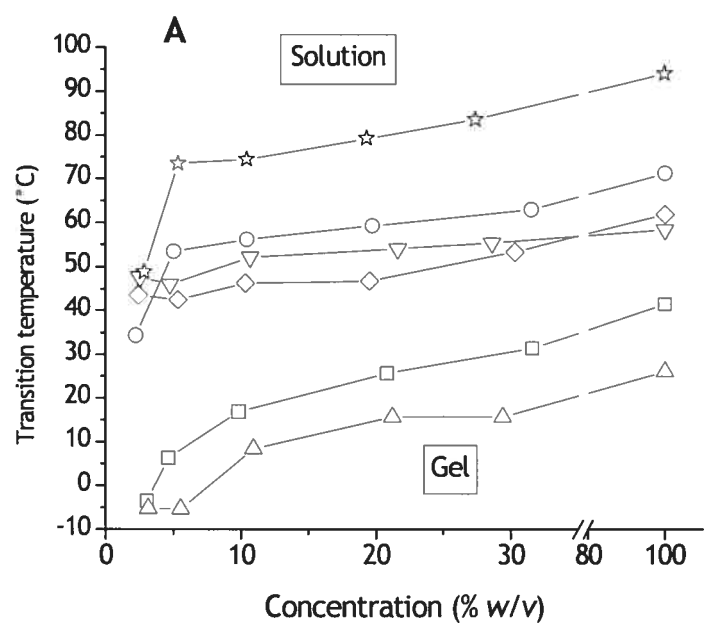


Figure 5.

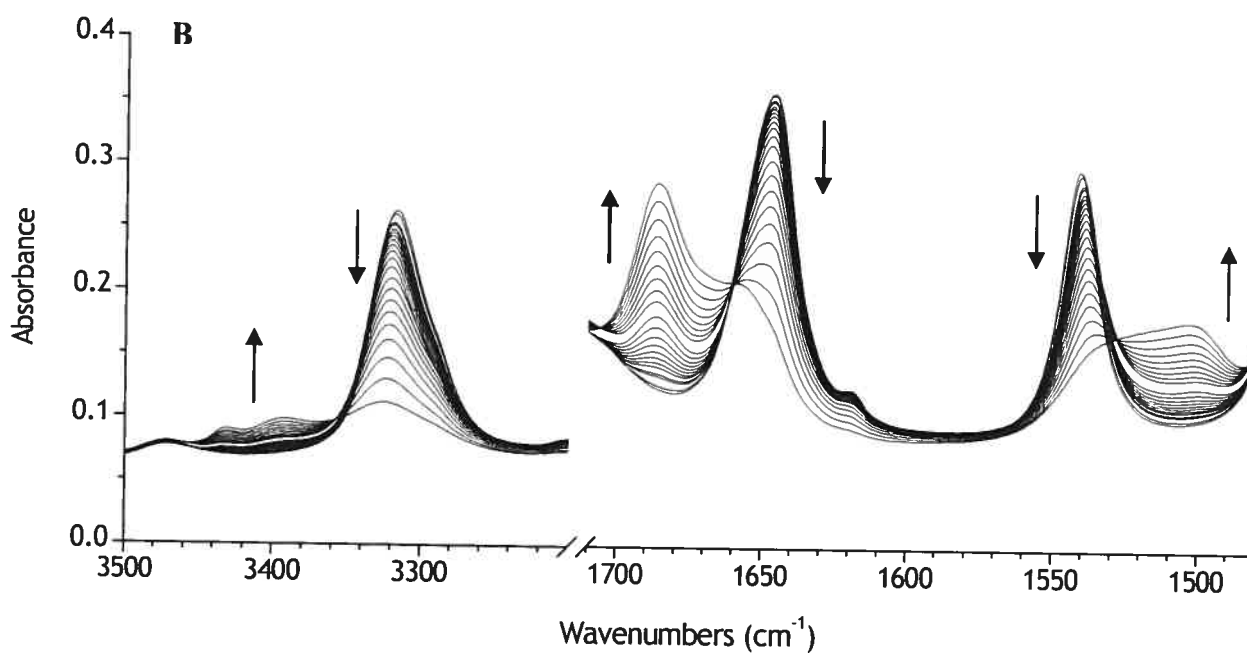
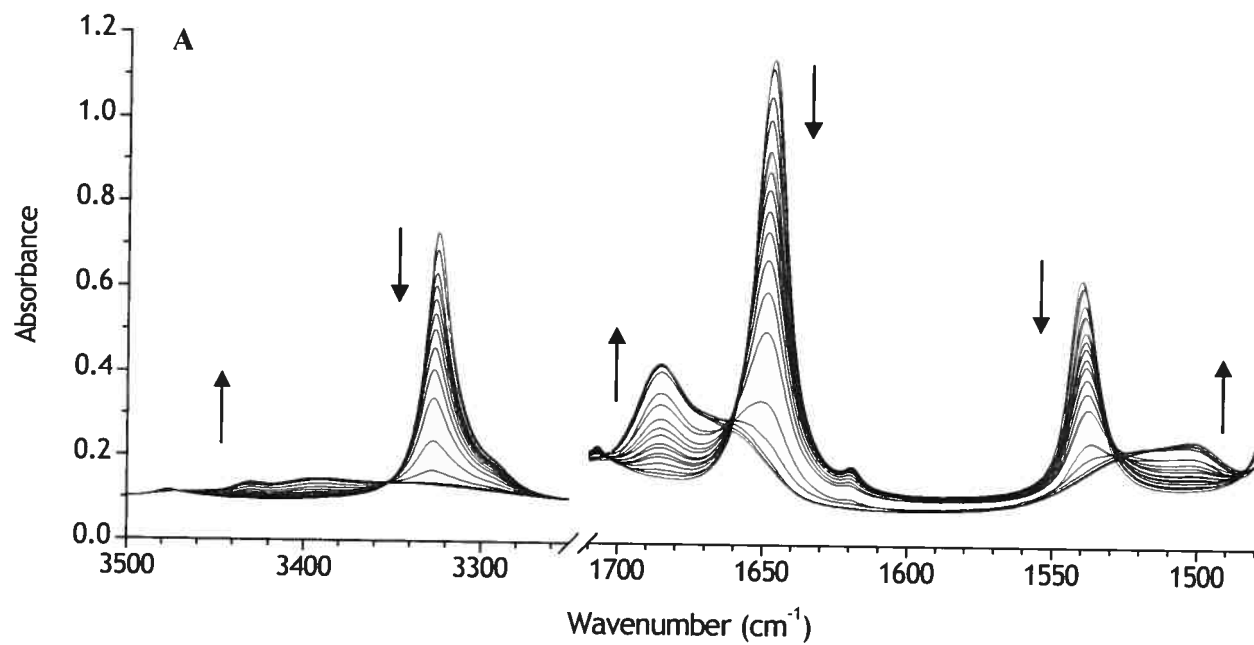


Figure 6.

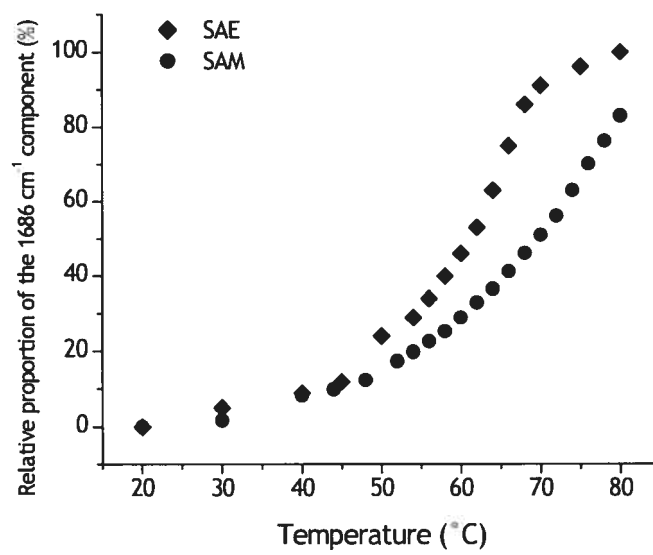


Figure 7.

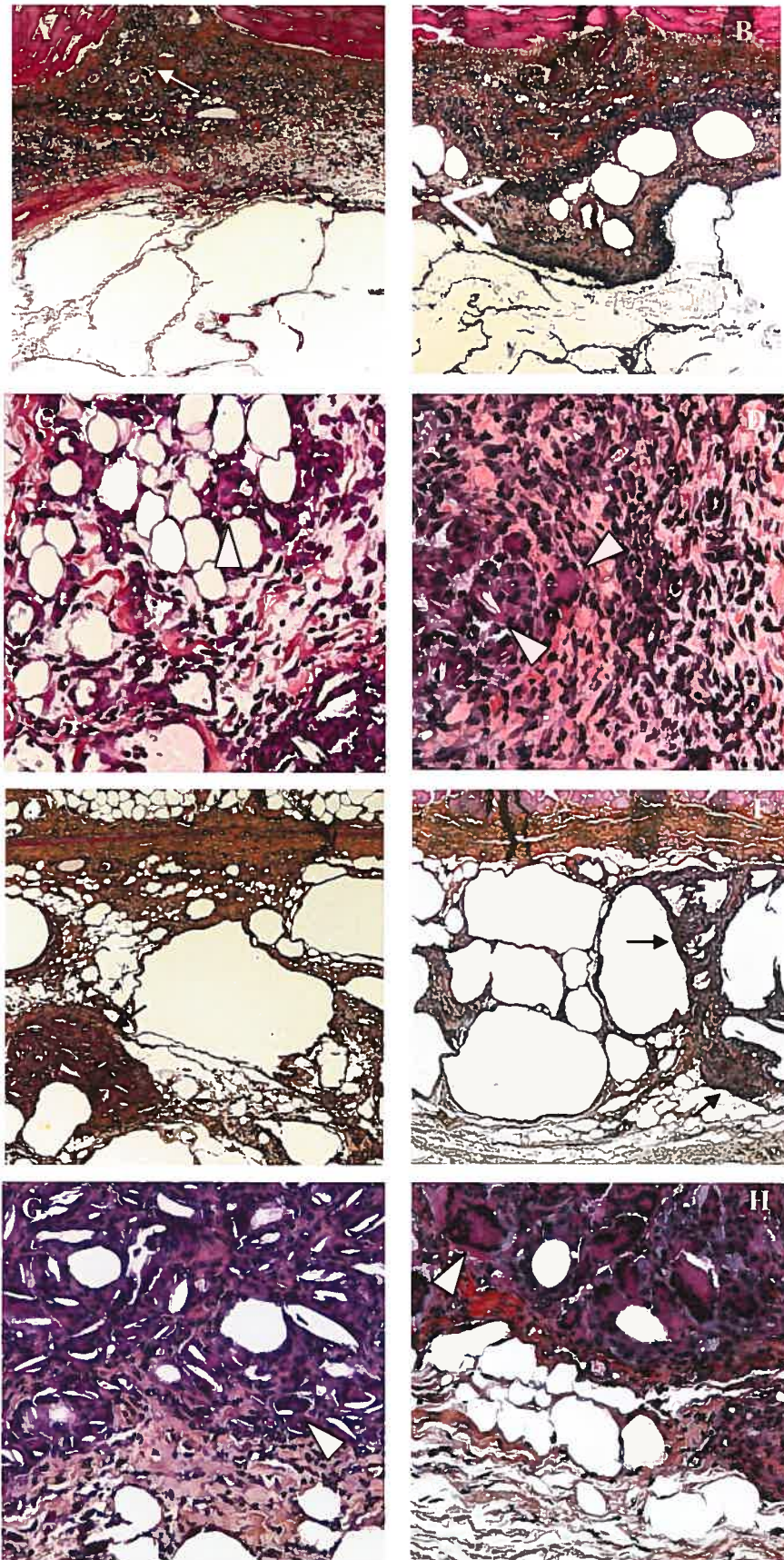
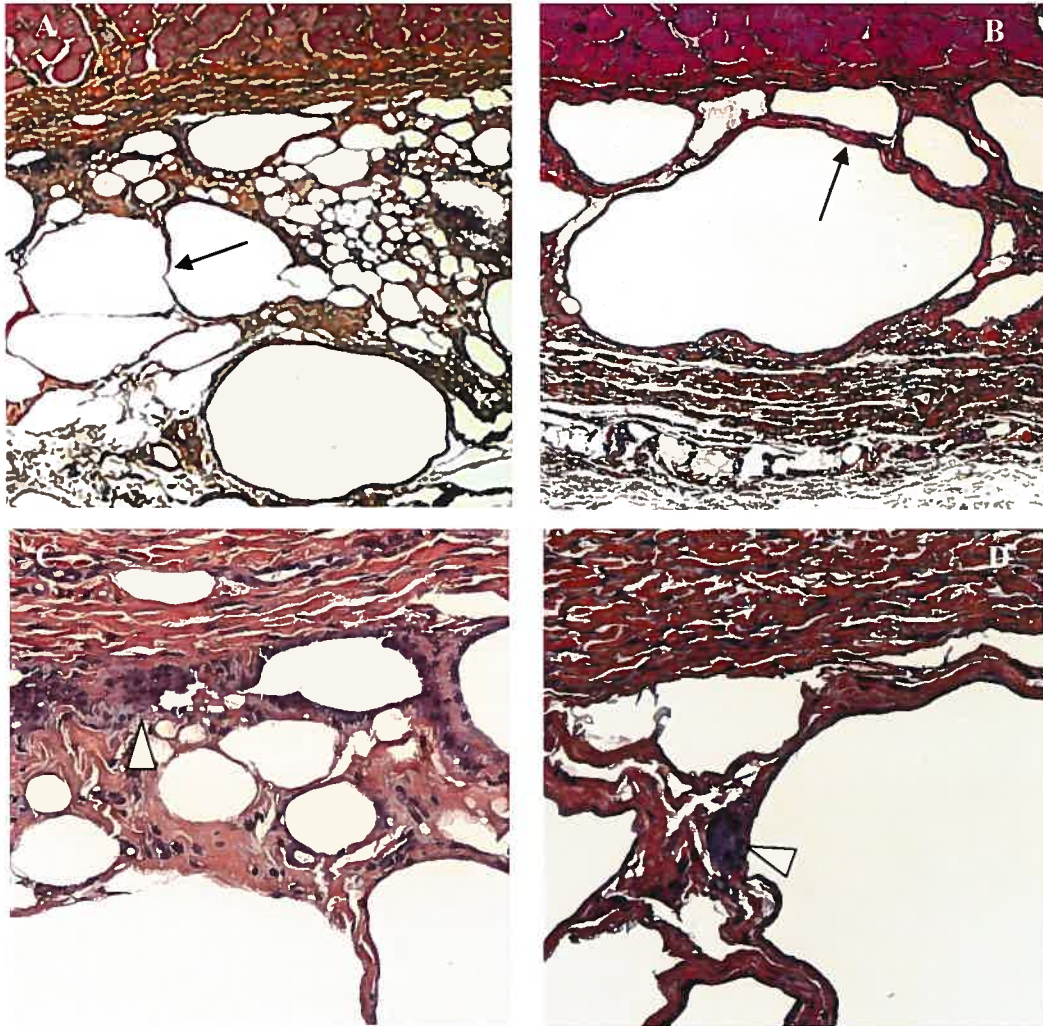


Figure 8.

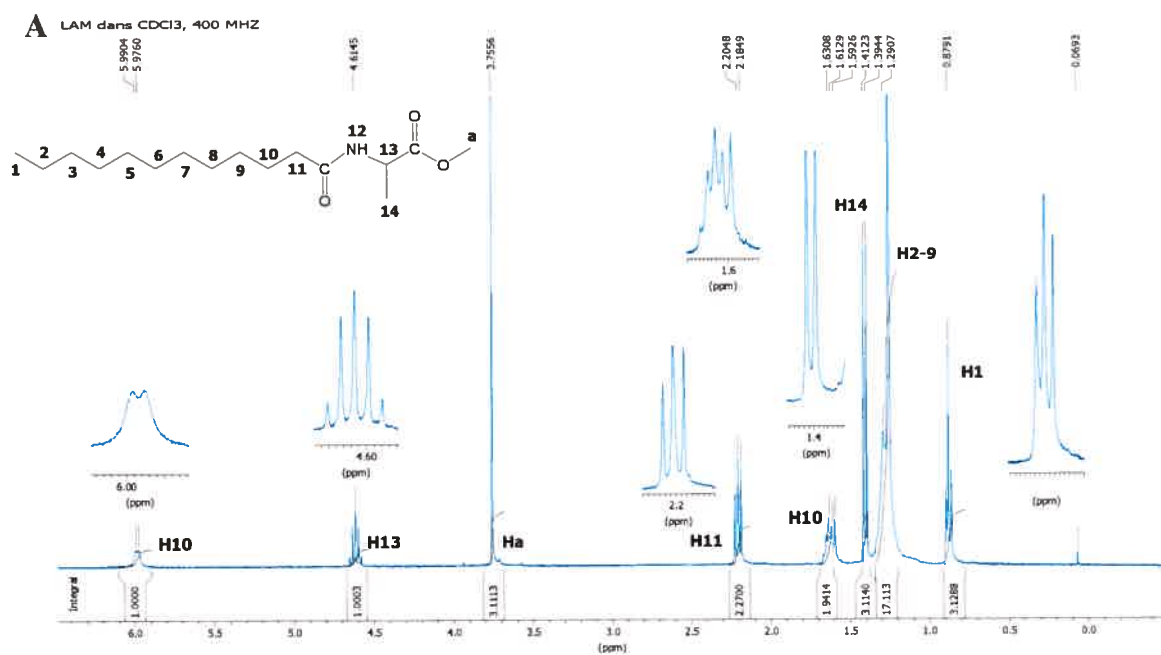


CHAPITRE 4. Discussion

Les IAI ont été développés comme systèmes injectables permettant la libération prolongée de PA. Parmi ceux-ci, les organogels, formés d'une phase continue oléagineuse, ont été proposés pour la libération de médicaments hydrophobes et hydrophiles (Couffin-Hoarau, Motulsky, *et al.* 2004; Rees et Robinson 1993). Les organogels peuvent être constitués de petites molécules réunies par des liaisons de faible énergie en un réseau tridimensionnel, immobilisant le solvant. Ce principe a été exploité pour diverses applications, dont quelques-unes sont décrites au chapitre 1. Par exemple, un OG pourrait servir à nettoyer les déversements de pétrole dans l'océan, puisqu'il gélifie uniquement les solvants hydrophobes (Bhattacharya et Krishnan-Gosh 2001). En se basant sur les propriétés des OG, Couffin-Hoarau *et al.* ont mis au point un IAI à base de *N*-lauroyle L-alanine sous la forme acide ou estérifiée (Couffin-Hoarau, Motulsky, *et al.* 2004). L'OG est dissous à chaud dans une huile végétale et la solution gélifie lors du refroidissement. À température ambiante, la gélification peut être inhibée par l'ajout d'un solvant organique afin d'obtenir une formulation injectable. Lors de l'injection dans les tissus s.c. ou i.m., on observe la formation d'un implant solide *in situ* à la suite de la diffusion du solvant organique dans les tissus environnants. L'objectif de ce projet consistait à caractériser des organogels obtenus à partir des différents dérivés de la L-alanine dissous dans une huile végétale. Ensuite, nous avons évalué la biocompatibilité d'un organogel injectable dans lequel un solvant organique a été ajouté pour permettre l'injection à température ambiante. L'article soumis à Biomaterials résume les travaux effectués durant cette maîtrise. Les résultats non publiés seront présentés au cours de la discussion.

4.1. Synthèse des organogélifiants et caractérisation des gels

La synthèse des OG a été effectuée par estérification du chlorure d'acyle (lauroyle ou stéaroyle) avec la méthoxy ou l'éthoxy-L-alanine. Il s'agit d'une synthèse simple menée en condition anhydre qui a été optimisée pour obtenir un rendement de 60% à 80%. Les dérivés acides ont été synthétisés par l'hydrolyse des dérivés ester méthylique. Les six molécules dérivées de la L-alanine ont été caractérisées par RMN du proton (fig. 4.1A) et du carbone (fig. 4.1B), et par analyse élémentaire afin de confirmer leur structure amphiphile. Afin de vérifier les propriétés gélifiantes des dérivés de la L-alanine, chaque molécule a été dissoute à chaud dans différentes huiles pharmaceutiques approuvées pour l'administration parentérale (tableau I, chapitre 3). La méthode du tube inversé a été utilisée pour déterminer l'état (gel ou solution) du système en fonction de la température. Avec cette méthode, un échantillon est considéré sous la forme gel si aucun liquide ne s'écoule lorsque le tube est inversé verticalement (van der Laan, Feringa, *et al.* 2002). Si les molécules s'unissent en un réseau tridimensionnel, la force de gravité n'est pas suffisante pour entraîner le solvant, qui est retenu par le réseau. Nous avons démontré que les six dérivés de la L-alanine peuvent former des organogels dans les huiles en fonction de la concentration. La figure 4.2 présente les diagrammes de phase des organogels dans l'huile de soya, l'huile de maïs, un triglycéride saturé d'acide caprique et caprylique (TGCM) et un ester éthylique d'acide oléique (les résultats pour l'huile de carthame sont présentés à la fig. 2 du chapitre 3). Nous avons démontré que la structure de la molécule a une influence sur la T_t de gel à liquide (T_{GL}) et de liquide à gel (T_{LG}). En effet, une estérification de la fonction acide de la molécule diminue les T_t des gels. Cette diminution est d'autant plus importante que le nombre d'atomes de carbone augmente (LA>LAM>LAE) (voir structure des molécules à la fig. 1 du chapitre 3). Inversement, un allongement de la chaîne alkyle de 12 à 18 carbones entraîne une augmentation de la T_t (SAM, SAE > LA, LAM, LAE).

**B**

Separate Plot

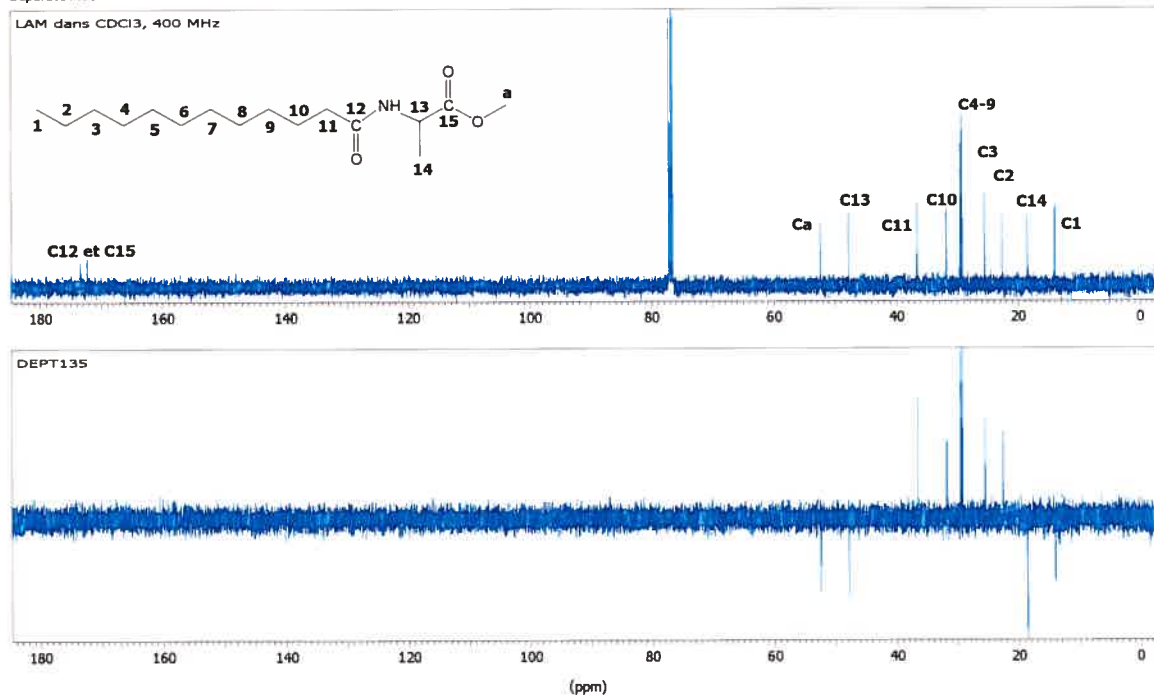


Figure 4.1. Spectre de RMN ¹H (A) et ¹³C (B) du LAM dans le CDCl₃.

Les T_i des gels préparés avec l'huile de carthame ont été mesurées par ATD. Cette analyse nous a permis de confirmer les informations obtenues par la méthode du tube inversé. Cependant, les deux méthodes ne mesurent pas le même phénomène et les courbes ne sont pas superposables (fig. 4B, chapitre 3) (George et Weiss 2002). Avec la méthode du tube inversé, la T_{LG} est la température à partir de laquelle le réseau tridimensionnel est suffisamment rigide pour empêcher le liquide de s'écouler sous la force de la gravité. La T_{LG} déterminée par ATD est la température au pic de la transition de phase qui débute lorsque les jonctions entre les fibres d'OG commencent à se briser et qui se termine lorsque toutes les liaisons entre les molécules sont rompues. Ainsi, la T_{LG} obtenue en refroidissant ou la T_{GL} obtenue en chauffant sont respectivement plus basses ou plus élevées lorsque mesurées par ATD (fig. 4B, chapitre 3).

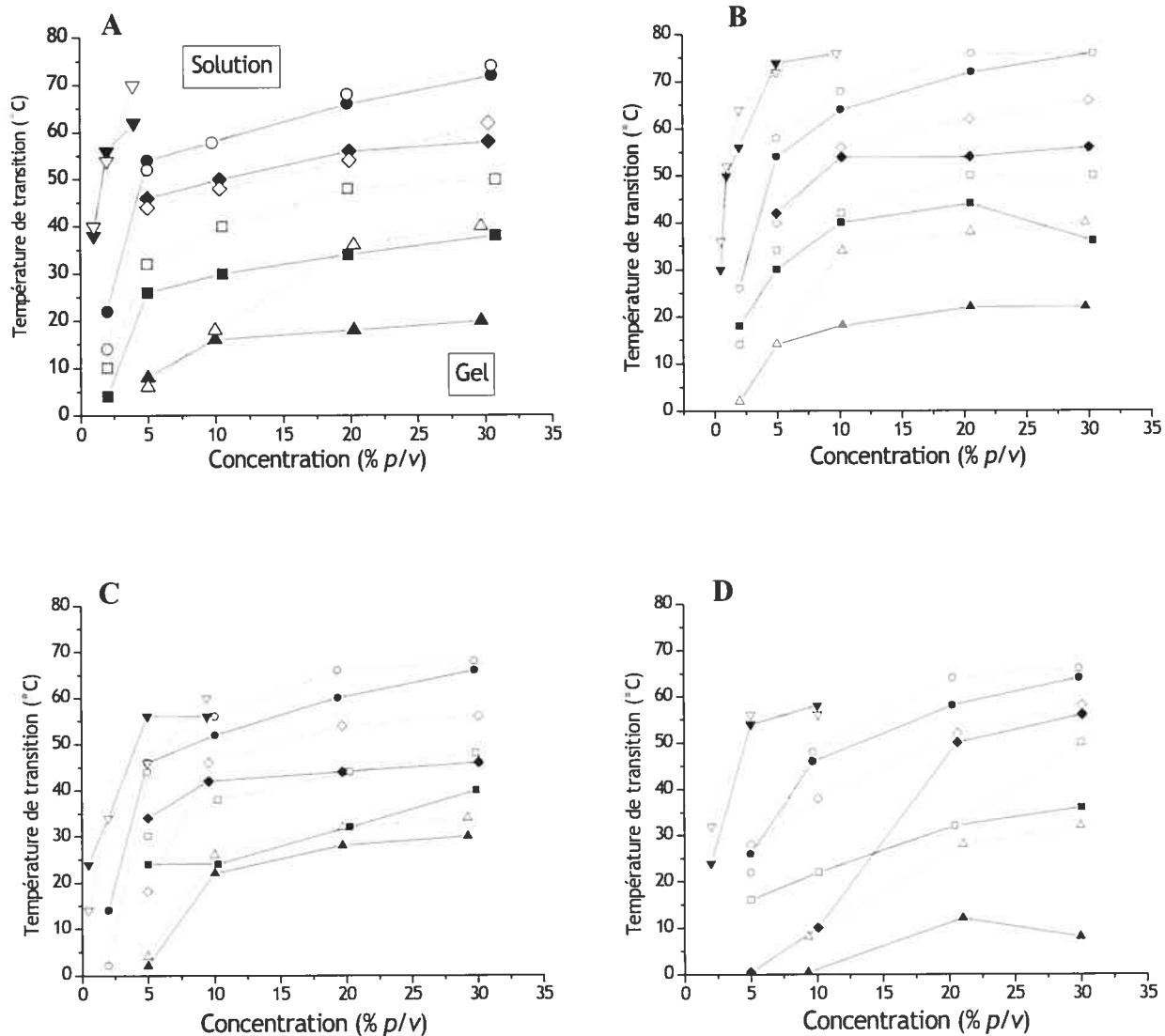


Figure 4.2. Diagrammes de phase des OG dans l'huile de soya (A), l'huile de maïs (B), l'oléate d'éthyle (C) et les TGCM (D) déterminés par la méthode du tube inversé. T_{GL} (ligne pointillée) ou T_{LG} (ligne pleine) de LAM (carré), LAE (triangle), SAM (cercle), SAE (losange) et LA (triangle inversé). Le SA n'est pas représenté sur ces courbes, puisque ses T_i étaient supérieures aux températures accessibles avec le système (80°C).

La gélification au moyen des OG requiert la formation de liaisons non covalentes entre les molécules gélifiantes. Selon la structure des OG dérivés de la L-alanine, les ponts H, impliquant le groupement amide et/ou carboxylique, et les forces de van der Waals, impliquant la chaîne alkyle, interviennent dans la gélification. Luo *et al.* ont déterminé qu'un OG dérivé de la L-alanine, le LA, pouvait gélifier des solvants organiques grâce à la formation de ponts H entre les groupements amide et carboxylique de la molécule (Luo, Liu, *et al.* 2001). Pour démontrer le rôle des liaisons hydrogène dans l'autoassemblage des OG synthétisés, nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Les fréquences de vibration des liaisons N-C, N-H et C=O de l'ester et de l'amide sont modifiées d'une manière caractéristique lorsqu'elles sont impliquées dans des ponts H. Nous avons tout d'abord comparé les spectres des molécules à l'état gel et à l'état solide afin de distinguer les groupements impliqués dans des ponts H. Le tableau I du chapitre 3 présente les différents nombres d'onde associés aux fréquences de vibration des liaisons des OG selon leur état physique. Les spectres à l'état solide et gel sont superposables et caractérisés par la présence de bandes étroites aux nombres d'onde indiquant l'existence de ponts H entre les groupements amide, *i.e.* $3310\text{-}3325\text{ cm}^{-1}$ (νNH), $1643\text{-}1645\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C=O}$) et $1555\text{-}1525\text{ cm}^{-1}$ (bande amide II). Aucune bande de vibration caractéristique de groupements NH libres ($\sim 3430\text{ cm}^{-1}$) n'était visible, alors qu'une telle bande est apparue lorsque les molécules étaient en solution dans le chloroforme. De plus, pour les dérivés acide LA et SA, le pic situé autour de 1705 cm^{-1} à l'état gel et solide peut être attribué à la vibration de la liaison C=O du groupement CO_2H lié par des ponts H. Cette liaison est caractéristique de la formation de dimères entre les acides carboxyliques, qui a été démontrée précédemment pour le LA dans divers solvants organiques (Bhattacharya et Krishnan-Gosh 2001; Luo, Liu, *et al.* 2001). Cette dimérisation n'a pas été observée pour les molécules en solution dans le chloroforme, puisque le pic de $\nu\text{C=O}$ était augmenté de 20 à 30 cm^{-1} . Ces résultats ont confirmé que l'autoassemblage des molécules d'OG impliquait la formation de liaisons hydrogène entre les groupements amide et/ou carboxylique.

Pour obtenir plus d'information sur la participation des ponts H dans le processus de gélification, les spectres FT-IR des gels ont été mesurés à différentes températures. Au début de la mesure (20° C), l'échantillon est sous la forme de gel, puis se liquéfie graduellement avec l'augmentation de la température. L'intensité des bandes de νNH , $\nu\text{C=O}$ (ester) et des bandes amide I et II a varié au cours de la transition. Par exemple, dans la portion 1700 à 1550 cm^{-1} du spectre du SAM (fig. 5C, chapitre 3), deux points isobestiques ont été observés, ce qui indique la présence de deux espèces différentes pendant la transition de phase, d'où l'observation des bandes de vibrations pour les C=O des groupements amide impliqués dans des ponts H à l'état gel (1649 cm^{-1}) avec celle des groupements libres à l'état liquide (1686 cm^{-1}) (Schmidt, Schmutz, *et al.* 2001). Dans la région des nombres d'onde reliés à l'élongation de la liaison NH (fig. 5D, chapitre 3), l'intensité du pic centré à 3323 cm^{-1} , associé aux groupements liés par des liaisons hydrogène, a diminué progressivement lors du passage de l'état gel à l'état liquide. La majorité des ponts H ont été brisés en augmentant la température de 55°C à 70°C, ce qui est cohérent avec la T_i obtenue par ATD. Pour les autres dérivés ester (LAM, LAE et SAE) et le LA, l'apparence des spectres était semblable. Ces résultats ont démontré non seulement que la gélification grâce aux OG dérivés de la L-alanine est principalement due à la formation de ponts H entre les groupements polaires de la molécule, mais également que la rupture de ces liaisons entraîne la destruction du réseau tridimensionnel qui empêche le solvant de s'écouler.

Étant donné la présence d'une chaîne alkyle sur les molécules gélifiantes, il est possible que des interactions de van der Waals participent à leur autoassemblage. Abdallah *et al.* (Abdallah et Weiss 2000) ont démontré que ces forces peuvent être les seules responsables de la gélification de solvants organiques par un OG. Plusieurs *n*-alcane se sont avérés de bons agents gélifiants. Cette habilité à gélifier est d'autant plus importante que la chaîne alkyle est longue. Afin de confirmer l'existence de telles forces pour la formation du réseau tridimensionnel entre les dérivés lauroyle ou stéaroyle de la L-alanine, nous avons mesuré les enthalpies (ΔH) des transitions gel-liquide et liquide-gel par ATD (fig. 3, chapitre 3). Les dérivés lauroyle ont des valeurs de ΔH endothermiques et exothermiques inférieures aux dérivés stéaroyle. Telles que

présentées à la figure 3 du chapitre 3, les ΔH des transitions endothermiques (gel-liquide) des gels à 10% p/v atteignent 30-35 kJ/mol et 58-77 kJ/mol pour les dérivés lauroyle et stéaroyle, respectivement. Ces valeurs sont supérieures à la quantité d'énergie nécessaire à la rupture de ponts H entre deux groupements amide, qui se situe entre 8 et 25 kJ/mol (Joesten et Schaad 1974). Ainsi, il est probable qu'en plus des liaisons hydrogène, les interactions de van der Waals entre les chaînes alkyles contribuent à la gélification.

Afin d'obtenir un implant solide à température corporelle, le système doit être gélifié à 37°C. Nous avons sélectionné les OG capables de former un gel qui demeurerait solide à 37°C à une concentration relativement faible (<10% p/v). Les gels constitués de 5% à 10% p/v de dérivés stéaroyle ont des T_{GL} supérieures à 45°C, alors que ces températures sont inférieures à 30°C pour les dérivés lauroyle (fig. 4.2). Pour la poursuite de l'étude *in vivo*, nous avons sélectionné des gels à base de SAM et SAE, à des concentrations de 7.5% et 10% p/v , respectivement. Le SA n'a pas été retenu puisqu'il avait été démontré précédemment par Couffin-Hoarau *et al.* que les dérivés acide sont moins appropriés que les dérivés ester pour le développement d'un système de libération prolongée (Couffin-Hoarau, Motulsky, *et al.* 2004). Nous avons choisi l'huile de carthame après avoir évalué l'aspect macroscopique du gel, *i.e.* sa solidité, son homogénéité et la présence de cristaux, en fonction de la concentration en OG. Afin d'inhiber la gélification à température ambiante, il a été démontré qu'un solvant organique qui perturbe les ponts H entre les molécules peut être ajouté au mélange (Couffin-Hoarau, Motulsky, *et al.* 2004). L'éthanol, le benzoate de benzyle, le diméthylacétamide et la NMP ont été testés à des concentrations de 15% à 40% v/v . Des formulations homogènes et injectables à température ambiante ont été obtenues avec 20% v/v de NMP. La stabilité de ces formulations a été évaluée par viscosimétrie après 1 et 7 jours, 1, 3 et 6 mois de conservation à température ambiante ou à 4°C (voir Annexe 1 pour matériels et méthodes). La figure 4.3 présente les résultats obtenus au jour 1 et après 6 mois de conservation pour les formulations à base de SAM et de SAE. On observe que la viscosité de la formulation est stable pendant au moins 6 mois et ce, quelle que soit la température de conservation.

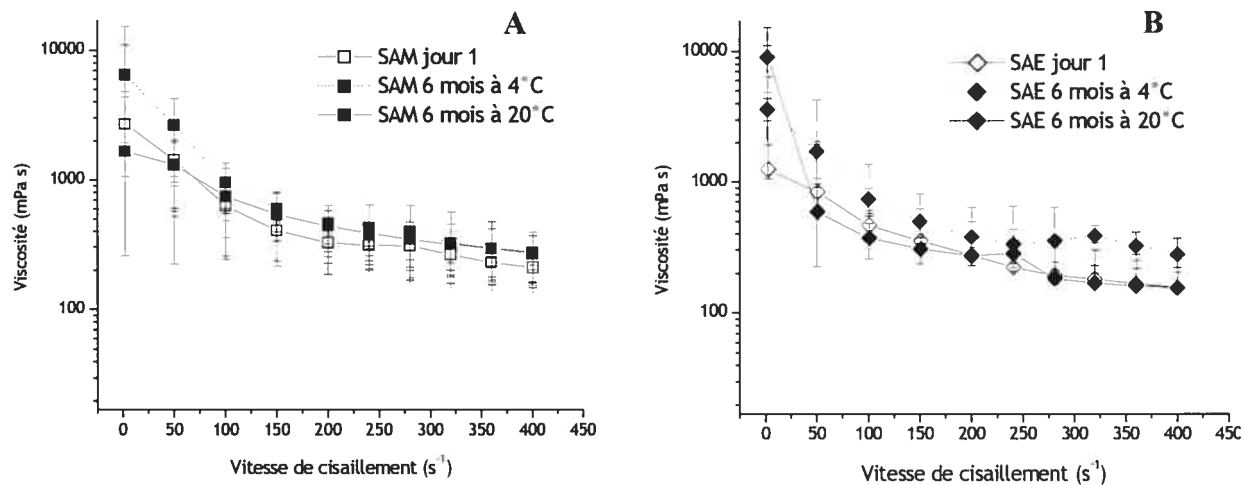


Figure 4.3. Viscosité de formulations de 7.5% p/v de SAM (A) et de 10% p/v de SAE (B) dans l'huile de carthame avec 20% v/v de NMP après 1 jour (symboles vides) et 6 mois de conservation (symboles pleins) à 4°C (lignes pleines) et 20 °C (lignes pointillées). Moyenne \pm écart-type (n=3). Vitesse de cisaillement croissante.

Par ailleurs, la force des gels a été mesurée par texturométrie (voir Annexe 1 pour matériels et méthodes). Selon les résultats présentés à la figure 4.4, celle-ci augmente avec la concentration en OG. Par contre, même si les T_i des gels de SAM sont supérieures à celles des gels de SAE, aucune différence entre la force des gels n'a été décelable par texturométrie. Après 30 jours de conservation à température ambiante, il semble que la force du gel diminue pour les gels à 10% *p/v*. Cependant, ces résultats sont difficiles à interpréter puisque la méthode d'échantillonnage n'était pas optimale (Khalid 2002). En effet, pour que la force mesurée par la sonde ne dépende que de l'échantillon, il faut s'assurer que le rapport entre le rayon de la sonde (R) et le diamètre du tube de l'échantillon (D) soit inférieur à 0.1. De plus, le rapport entre R et la hauteur de l'échantillon (h) doit aussi être inférieur à 0.1. Pour cette analyse effectuée avec une sonde ayant un rayon de 0.16 cm, il aurait fallu utiliser des tubes avec un diamètre supérieur à 1.6 cm et une hauteur de gel supérieure à 1.6 cm. Or, les tubes utilisés avaient un diamètre de 1 cm (voir Annexe 1).

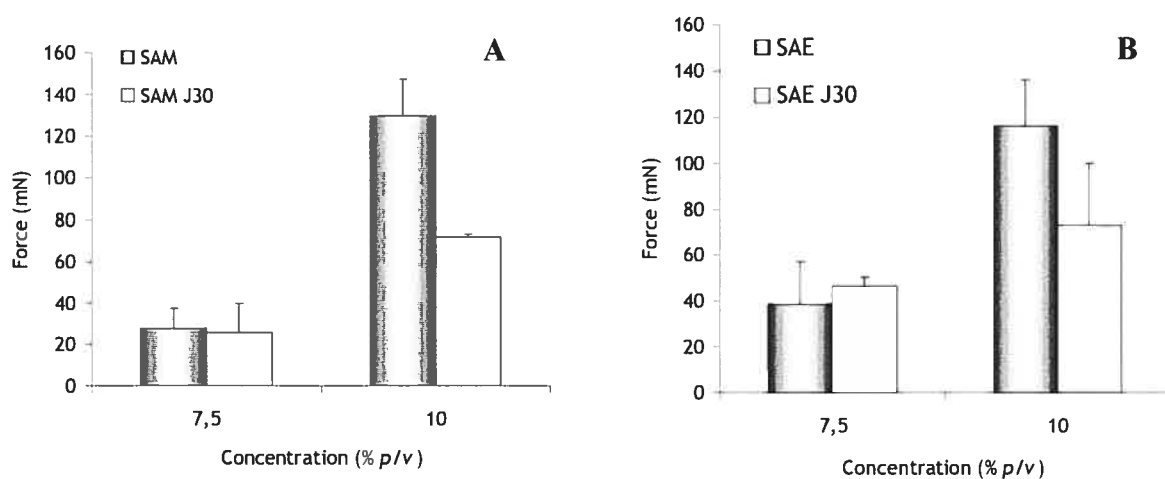


Figure 4.4. Analyse de texture de gels de SAM (A) et SAE (B) dans l'huile de carthame en fonction de la concentration en OG. Moyenne \pm écart-type (n=3).

En conclusion, nous avons mis au point une synthèse simple et efficace des OG dérivés de la L-alanine. Il a été démontré que la gélification des huiles est possible grâce à l'autoassemblage des OG *via* différentes liaisons de faible énergie, soit les ponts H entre les groupements amide et/ou carboxylique et les interactions de van der Waals entre les chaînes alkyle. La gélification est thermoréversible, et la T_t du gel dépend à la fois de la structure de la molécule et de la concentration en OG. Selon les T_t et l'apparence des gels dans différentes huiles pharmaceutiques, le SAM et le SAE respectivement à 7.5% et 10% *p/v* dans l'huile de carthame ont été sélectionnés pour l'injection *in vivo*, avec 20% *v/v* de NMP pour inhiber la gélification à température ambiante.

4.2. Biocompatibilité

Nous avons évalué la biocompatibilité des préparations en injectant 250 μL dans le tissu s.c. de rats. Une première étude a été réalisée avec 20% *v/v* de NMP et 7.5% *p/v* de SAM ou 10% *p/v* de SAE dans l'huile de carthame. Après 3 jours, 1, 2 et 4 semaines, une analyse histologique des tissus autour du site d'injection a été effectuée afin d'évaluer la réaction inflammatoire. Macroscopiquement, aucun signe d'inflammation (rougeur, enflure) n'a été observé sur la peau, si ce n'est une légère masse due à l'implant. Dans le tissu, la taille du gel a diminué graduellement avec le temps, mais l'implant était encore visible 28 jours après l'injection des formulations (fig. 4.5). Une analyse qualitative a été effectuée par un pathologiste sur les coupes histologiques des tissus colorés à l'hématoxyline, la phloxine et le safran. Cette étude a révélé une réaction inflammatoire granulomateuse de type à corps étranger avec néoangiogénèse, causée par les globules graisseux de l'implant. À partir du 7^{ème} jour, nous avons observé la formation d'un tissu de granulation, constitué de fibroblastes, de collagène et de nouveaux vaisseaux (fig. 4.5). Aucune différence majeure n'a été notée entre les formulations. Cette étude préliminaire a permis de déterminer que les organogels à base de L-alanine peuvent former un IAI biodégradable.

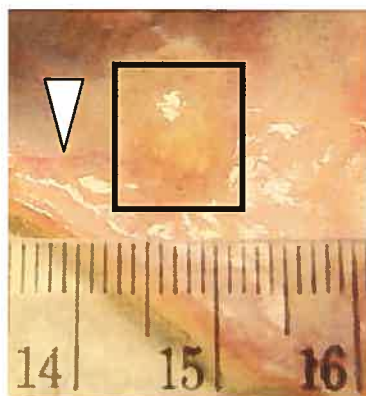


Figure 4.5. Coupe histologique du tissu s.c. d'un rat 28 jours après l'injection de 250 μL d'un organogel constitué de 7.5% *p/v* de SAM dans l'huile de carthame avec 20% *v/v* NMP (encadré). Aucune rougeur autour du gel. Néoangiogénèse (pointeur).

L'utilisation de la NMP comme inhibiteur de la gélification peut être questionnée puisqu'il s'agit d'un solvant de classe 2 selon la classification de la FDA (CEDR 2003). Bien que des formulations contenant jusqu'à 60% v/v de NMP aient été commercialisées (Royals, Fujita, *et al.* 1999), il est judicieux d'en minimiser la concentration. Ainsi, une nouvelle formulation injectable a été préparée avec seulement 10% v/v de NMP. Une deuxième étude de biocompatibilité a été menée pendant 8 semaines avec les formulations contenant seulement 10% v/v de NMP et 7.5% p/v de SAM ou 10% p/v de SAE dans l'huile de carthame. De manière générale, la réaction inflammatoire était localisée dans l'hypoderme, sous le muscle cutané. Elle était restreinte à la région limitrophe du gel, et les tissus environnants sont demeurés d'apparence normale. Une réaction inflammatoire granulomateuse caractérisée par la présence de leucocytes, particulièrement des macrophages et des CGCE, a été observée pour les deux types d'implants (Anderson 2001). La composante aiguë de l'inflammation demeurait minimale, puisque très peu de neutrophiles entouraient le gel après 3 et 7 jours (fig. 7, chapitre 3). Cette réaction de faible intensité était prévisible, puisque l'injection au moyen d'une aiguille 25G entraîne peu de dommages aux tissus. À partir du 7^{ème} jour, un tissu de granulation a commencé à se former avec des fibroblastes, du collagène et de la néoangiogénèse, indiquant la guérison du site d'implantation (Anderson et Shive 1997; Yamaguchi et Anderson 1993). La réponse tissulaire aux deux formulations a été similaire; la réaction inflammatoire était modérée après 2 semaines, et a diminué graduellement avec le temps. Après 4 semaines, elle était légère, puis minimale après 6 et 8 semaines. À la fin de l'étude, quelques CGCE étaient toujours présentes autour des vacuoles de gel restantes (fig. 8, chapitre 3).

Lors de l'injection, la majorité de la NMP devrait diffuser rapidement dans les tissus environnants, ce qui peut entraîner de l'irritation locale (Becci, Gephart, *et al.* 1983). Afin de vérifier l'innocuité de la formulation, un contrôle contenant uniquement de la NMP dans l'huile de carthame a été comparé à une injection d'huile de carthame. Après 3 jours, les deux formulations ont entraîné une inflammation chronique légère, selon une échelle qualitative mise au point par un pathologiste (absent, minimal, léger, moyen, important, sévère) (Victor Kokta, MD, Dermatopathologie, Hôpital Ste-Justine). Ainsi, la NMP n'a pas causé de toxicité locale, ce qui démontre qu'il s'agit d'un solvant

sécuritaire pour l'injection dans le tissu s.c. En ce qui a trait à la toxicité systémique, elle est peu probable. En effet, Becci *et al.* ont déterminé que l'administration subchronique (90 jours) de moins de 0.25 g/kg de NMP *per os* (biodisponibilité près de 100%) (VMEU 1999) à des chiens n'entraînait pas d'effet secondaire (Becci, Gephart, *et al.* 1983). Or, dans cette étude, les rats ont reçu uniquement 0.10 g/kg de NMP, et n'ont présenté aucun signe de toxicité systémique (vomissement, diarrhée, perte de poids). Ceci indique que l'utilisation de la NMP dans cet IAI est sécuritaire.

De manière générale, la réaction inflammatoire observée autour des implants d'organogel correspond à la réaction à corps étrangers bien décrite par Anderson et Shive à la suite de l'injection de microsphères de PLA/PLGA (Anderson 1994, 2001; Anderson et Shive 1997). Nous avons démontré que les organogels à base de dérivés stéaroyle de la L-alanine, d'huile de carthame et de NMP sont biocompatibles et biodégradables lorsque injectés dans le tissu s.c. De même, Royals *et al.* ont démontré la biocompatibilité d'un IAI constitué de PLC dissous à 60% *p/p* dans la NMP (Royals, Fujita, *et al.* 1999). Quatre semaines après l'injection s.c. ou i.m. de la formulation à des singes, une réaction inflammatoire légère a été observée par microscopie autour de l'implant, avec quelques lymphocytes et macrophages ainsi que des CGCE. Par ailleurs, très peu d'études ont été publiées sur la biocompatibilité des implants formés de lipides. Reithmeier *et al.* ont évalué la biocompatibilité de microparticules de tripalmitate de glycérol implantées dans le tissu s.c. de souris (Reithmeier, Herrmann, *et al.* 2001). Ces particules ont entraîné une réaction inflammatoire comparable aux microparticules de PLA/PLGA durant les 7 jours de l'étude. Gao *et al.* qualifient de biocompatibles des gels formés de monoglycérides dissous dans une huile végétale, bien que l'histologie du site d'injection n'ait pas été décrite (Gao, Crowley, *et al.* 1995). Notre organogel contient principalement de l'huile de carthame (environ 80% *p/p*). Les huiles végétales sont reconnues comme étant des excipients pharmaceutiques sécuritaires (Svendsen 1983). Plusieurs huiles végétales, telles que l'huile de sésame ou de noix de coco, sont utilisées pour l'injection i.m. de neuroleptiques à longue action (Luo, Hubbard, *et al.* 1997; Svendsen 1983). Kranz *et al.* ont déterminé que la présence de l'huile peut diminuer la toxicité tissulaire du PA (Kranz, Brazeau, *et al.* 2001). En plus de maintenir

une libération prolongée, le système à base d'un organogel pourrait permettre de limiter le contact direct avec les tissus et ainsi, diminuer la toxicité locale du PA.

Finalement, les études de biocompatibilité indiquent que les préparations à base d'organogels dérivés de la L-alanine n'ont pas de toxicité sur les tissus *in vivo*. Nous avons démontré que l'injection de 250 μL de la formulation entraîne la formation d'un implant semi-solide, qui persiste pendant au moins 6 semaines selon sa composition. Tout comme les microsphères de PLA/PLGA actuellement commercialisées, les implants huileux induisent une réaction inflammatoire granulomateuse, qui évolue en réaction à corps étrangers selon la durée du contact. Même si les propriétés de libération n'ont pas été évaluées au cours de cette étude, des résultats préliminaires *in vitro* suggèrent que l'effet « *burst* » est faible (Couffin-Hoarau, Motulsky, *et al.* 2004). Cependant, la libération de médicaments doit être évaluée *in vivo* afin de déterminer l'impact de la diffusion du solvant lors de l'injection. Les résultats prometteurs obtenus pour la biocompatibilité justifient la poursuite du projet pour évaluer les propriétés de libération de ce type d'IAI.

CHAPITRE 5. Conclusion

Au cours de ce projet, nous avons mis au point un IAI à base d'un OG amphiphile dérivé de la L-alanine et nous en avons évalué la biocompatibilité. Les dérivés de la L-alanine ont démontré des propriétés gélifiantes dans différentes huiles pharmaceutiques. La méthode du tube inversé et l'ATD ont démontré que la structure de la molécule gélifiante avait une influence sur la température et l'enthalpie de transition de phase. Le mécanisme de gélification a été élucidé par FT-IR; la formation de ponts H entre les groupements amide est principalement responsable de la solidification du système dans les huiles végétales. De plus, les interactions de van der Waals entre les chaînes alkyles sont probablement aussi impliquées dans l'autoassemblage des OG étudiés, tel que démontré par les résultats d'analyse thermique différentielle.

Grâce aux diagrammes de phase établis, les dérivés stéaroylé ont été sélectionnés pour la poursuite de l'étude *in vivo*. En effet, les T_i des gels obtenus avec le SAM et le SAE étaient supérieures à 45°C pour une faible concentration (<10% *p/v*), ce qui devrait assurer la formation d'un implant solide à température corporelle (37°C). Les gels formés dans l'huile de carthame ont été les plus homogènes à température ambiante, qualité pour laquelle cette huile a été choisie comme véhicule. L'ajout de 10% à 20% *v/v* de NMP à des préparations contenant respectivement 7.5% et 10% *p/v* de SAM et de SAE a permis d'inhiber partiellement la gélification à température ambiante, rendant ainsi le système injectable. Les formulations ont pu être administrées au moyen d'une seringue dans le tissu s.c. de rats. Suite à l'injection, la diffusion de la NMP dans les tissus environnants a entraîné la formation d'un implant *in situ*. Avec un volume initial de 250 μL , l'implant a été localisable pendant au moins 8 semaines pour les deux formulations. La taille de l'implant a graduellement diminué au cours de la période de l'étude, sans entraîner de réaction inflammatoire inhabituelle. La région autour du gel a présenté une réaction inflammatoire chronique granulomateuse évoluant vers la guérison de la lésion. Aucune réaction inflammatoire aiguë anormale n'a été observée. Cette étude a confirmé le potentiel de développement des organogels à base de SAM et de

SAE dans l'huile de carthame en tant que véhicules pour la libération prolongée de médicaments.

Actuellement, les systèmes commercialisés sont utilisés principalement pour la libération de macromolécules. Nous proposons ce nouveau type d'IAI formé d'un OG dérivé de la L-alanine pour la libération prolongée de molécules hydrophobes et hydrophiles. Nous pensons que les OG pourraient aussi être adaptés pour les petites molécules hydrophiles en raison de la barrière lipidique qui limite la diffusion et la simplicité de la préparation. En clinique, plusieurs populations peuvent bénéficier d'un système injectable à longue action plutôt qu'une prise quotidienne de comprimés ou de capsules (voir chapitre 1). Parmi celles-ci, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) sont particulièrement vulnérables à un échec de la thérapie dû à une inobservance. C'est pourquoi un IAI qui permettrait la libération prolongée d'un médicament utilisé pour le traitement de la MA aurait le potentiel d'améliorer significativement son efficacité. La poursuite de ce projet pourrait s'orienter vers l'évaluation de la pharmacocinétique d'un inhibiteur des cholinestérases (traitement standard actuel de la MA) à partir d'un IAI constitué d'un organogel. Cette étude pourrait confirmer que les organogels représentent des véhicules adéquats pour la libération prolongée de petites molécules thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdallah, D. J., L. Lu and R. G. Weiss (1999). *Thermoreversible organogels from alkane gelators with one heteroatom*, Chem Mater 10: 2907-2911.
- Abdallah, D. J. and R. G. Weiss (2000). *n-Alkanes gel n-alkanes (and many other organic liquids)*, Langmuir 16: 352-355.
- Abdallah, D. J. and R. G. Weiss (2000). *Organogels and low molecular mass organic gelators*, Adv Mater 12: 1237-1247.
- Abdallah, D. J. and R. G. Weiss (2000). *The quest for the simplest organogelators and some properties of their organogels*, J Braz Chem Soc 11: 209-218.
- Aggeli, A., M. Bell, N. Boden, J. N. Keen, K. P.F., M. T.C.B., M. Pitkeathly and R. S.E. (1997). *Responsive gels formed by the spontaneous self-assembly of peptides into polymeric β -sheet tapes*, Nature 386: 259-262.
- Allen, T. M. and P. R. Cullis (2004). *Drug delivery systems: entering the mainstream*, Science 303: 1818-22.
- An, B. K., D. S. Lee, J. S. Lee, Y. S. Park, H. S. Song and S. Y. Park (2004). *Strongly fluorescent organogel system comprising fibrillar self-assembly of a trifluoromethyl-based cyanostilbene derivative*, J Am Chem Soc 126: 10232-3.
- Anderson, J. M. (2001). *Biological responses to materials*, Ann Rev Mater Res 31: 81-110.
- Anderson, J. M. (1994). *In vivo biocompatibility of implantable delivery systems and biomaterials*, Eur J Pharm Biopharm 40: 1-8.
- Anderson, J. M. and J. J. Langone (1999). *Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems*, J Controlled Release 57: 107-13.
- Anderson, J. M. and M. S. Shive (1997). *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*, Adv Drug Deliv Rev 28: 5-24.
- Appel, L., K. Engle, J. Jensen, L. Rajewski and G. Zenter (1996). *An in vitro model to mimic in vivo subcutaneous monolein degradation*, Pharm Res: S-217.

- Barr, J., K. W. Woodburn, S. Y. Ng, S. H. and J. Heller (2002). *Post surgical pain management with poly(ortho esters)*, Adv Drug Deliv Rev 54: 1041-1048.
- Baud, L. (1992). *Médiateurs. Aspects moléculaires et physiopathologiques*. Paris: Editions Pradel. 345 p.
- Becci, P., L. Gephart, F. Koschier, W. Johnson and L. Burnette (1983). *Subchronic feeding study in beagle dogs of N-methylpyrrolidone*, J Appl Toxicol 3: 83-86.
- Bezwada, R. S. (1995). *Liquid copolymers of epsilon-caprolactone and lactide*. US Patent N° 5,442,033.
- Bhatnagar, S. and S. P. Vyas (1994). *Organogel-based system for transdermal delivery of propranolol*, J Microencapsulation 1994: 431-438.
- Bhattacharya, B. and S. N. Ghanashyam Acharya (1999). *Impressive gelation in organic solvents by synthetic, low molecular mass, self organizing urethane amides of L-phenylalanine*, Chem Mater 11: 3121-3132.
- Bhattacharya, S. and Y. Krishnan-Gosh (2001). *First report of phase selective gelation of oil from oil/water mixture. Possible implications toward containing oil spills*, Chem Commun 2: 185-186.
- Black, J. (1999). *Biological performance of materials. Fundamentals of biocompatibility*. New York: Marcel Dekker. 463 p.
- Bohorquez, M., C. Koch, T. Trygstad and N. Pandit (1999). *A Study of the Temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127*, J Colloid Interface Sci 216: 34-40.
- Brady, J. M., D. E. Cuthright, R. A. Milller and G. C. Battsone (1973). *Resorption rate, route of elimination, and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat*, J Biomed Mater Res 7: 155-166.
- Brinksma, J., B. L. Feringa, R. M. Kellogg, R. Vreeker and J. van Esch (2000). *Rheology and thermotropic properties of bis-urea-based organogels in various primary alcohols*, Langmuir 16: 9249-9255.
- Burkoth, A. K. and K. S. Anseth (2000). *A review of photocrosslinked polyanhydrides: in situ forming degradable networks*, Biomaterials 21: 2395-2404.
- CEDR (2003). *Center for Evaluation and Drug Research. Guidance for industry. Q3C-Tables and List*. FDA. Rockville.

- Chang, C. M. and R. Bodmeier (1997). *Swelling and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems*, J Pharm Sci 86: 747-752.
- Chang, C. M. and R. Bodmeier (1998). *Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase*, Int J Pharm 173: 51-60.
- Chen, S., R. Pieper, D. C. Webster and J. Singh (2005). *Triblock copolymers: synthesis, characterization, and delivery of a model protein*, Int J Pharm 288: 207-18.
- Claxton, A. J., J. Cramer and C. Pierce (2001). *A systematic review of the associations between dose regimens and medication compliance*, Clin Ther 23: 1296-310.
- Cook, T. and W. P. Sheridan (2000). *Development of GnRH antagonists for prostate cancer: new approaches to treatment*, The Oncologist 5: 162-168.
- Couffin-Hoarau, A. C. and J. C. Leroux (2002). *Composition with gelling properties intended for the sustained delivery of bioactive substances*, US Pat Appl 60/405,720:
- Couffin-Hoarau, A. C., A. Motulsky, P. Delmas and J. C. Leroux (2004). *In situ-forming pharmaceutical organogels based on the self assembly of L-alanine derivatives*, Pharm Res 21: 454-457.
- Cui, H. and P. B. Messerlith (1998). Thermally triggered gelation of alginate for controlled release. Dans I. McCulloch and W. Shalaby (Ed.) : *Tailored polymeric materials for controlled delivery systems*, Washington: American Chemical Society. p. 203-211.
- Curran, S. J., R. E. Ayes, A. Afacan, M. C. Williams and P. A. Tanguy (2002). *Properties of carbopol solutions as models for yield-stress fluids*, J Food Sci 67: 176-180.
- Dal Monte, P. R., S. Kathy, E. Rouan and N. B. Bam (2002). Biotechnology-based pharmaceuticals. Dans G. S. Banker and C. T. Rhodes (Ed.) : *Modern Pharmaceutics*, 4th edition. New York: Marcel Dekker.
- Dreher, F., P. Walde, P. Walther and E. Wehrli (1997). *Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport*, J Controlled Release 45: 131-140.

- Duncan, R. (2003). *The dawning era of polymer therapeutics*, Nat Rev Drug Discov 2: 347-60.
- Dunn, R. L., J. P. English, D. R. Cowsar and D. Vanderbilt (1990). *Biodegradable in situ-forming implants and methods of producing the same*. US Patent N° 4,938,763.
- Dunn, R. L., J. P. English, D. R. Cowsar and D. Vanderbilt (1994). *Biodegradable in situ forming implants and methods for producing the same*. US Patent N° 5,340,849.
- Engelkamp, H., S. Middelbeek and R. J. Nolte (1999). *Self-assembly of disk-shaped molecules to coiled-coil aggregates with tunable helicity*, Science 284: 785-8.
- Engström, S. (1990). *Drug delivery from cubic and other lipid-water phases*, Lipid Technol 2: 42-45.
- Engström, S. and L. Engström (1992). *Phase behaviour of the lidocaine-monoolein-water system*, Int J Pharm 79: 113-122.
- Estroff, L. A. and A. D. Hamilton (2004). *Water gelation by small organic molecules*, Chem Rev 104: 1201-18.
- FDA (1995). *FDA Blue Book Memor. G95-1. Biological evaluation of medical devices- Part I: Evaluation and testing*. FDA.
- Ferrari, F., M. Bertoni, C. Caramella and A. Lamanna (1994). *Description and validation of an apparatus for gel strength measurements*, Int J Pharm 109: 115-124.
- Flory, P. (1974). *Introductory lecture*, Disc Faraday Soc 57: 7.
- Fredholt, K., D. H. Larsen and C. Larsen (2000). *Modification of in vitro drug release rate from oily parenteral depots using a formulation approach*, Eur J Pharm Sci 11: 231-7.
- Gao, Z. H., W. R. Crowley, A. J. Shukla, J. R. Johnson and J. F. Reger (1995). *Controlled release of contraceptive steroids from biodegradable and injectable gel formulations - in vivo evaluation*, Pharm Res 12: 864-868.
- Gao, Z. H., A. J. Shukla, J. R. Johnson and W. R. Crowley (1995). *Controlled release of a contraceptive steroid from biodegradable and injectable gel formulations - in vitro evaluation*, Pharm Res 12: 857-863.

- Gasco, M. R., F. Pattarino and F. Lattanzi (1990). *Long-acting delivery system for peptides: reduced plasma testosterone levels in male rats after a single injection*, Int J Pharm 62: 119-123.
- Gelbart, W. M. and A. Ben-Shaul (1996). *The "new" science of "complex fluids"*, J Phys Chem 100: 13169-13189.
- George, M. and R. G. Weiss (2002). *Chemically reversible organogels via latent gelators. Aliphatic amines with carbon dioxide and their ammonium carbamates*, Langmuir 18: 7124-7135.
- Gregson, C. M., S. E. Hill, J. R. Mitchell and J. Smewing (1999). *Measurement of the rheology of polysaccharides gels by penetration*, Carbohydr Polym 38: 255-259.
- Gronwald, O., E. Snip and S. Shinkai (2002). *Gelators for organic liquids based on self-assembly: a new facet of supramolecular and combinatorial chemistry*, Curr Opin Colloid Interface Sci 7: 148-156.
- Gu, W., L. Lu, G. B. Chapman and R. G. Weiss (1997). *Polymerized gels and 'reverse aerogels' from methyl methacrylate or styrene and tetraoctadecylammonium bromide as gelator*, Chem Commun: 543-544.
- Hafkamp, R. J., M. C. Feiters and R. J. M. Nolte (1999). *Organogels from carbohydrate amphiphiles*, J Org Chem 64: 412-426.
- Hafkamp, R. J. H., B. P. A. Kokke, I. M. Danke, H. P. M. Gueurts, A. E. Rowan, M. C. Feiters and J. M. Nolte (1997). *Organogel formation and molecular imprinting by functionalized gluconamides and their metal complexes*, Chem Commun: 545-546.
- Hanabusa, K., M. Matsumoto, M. Kimura, A. Kakehi and H. Shirai (2000). *Low Molecular Weight Gelators for Organic Fluids: Gelation Using a Family of Cyclo(dipeptide)s*, J Colloid Interface Sci 224: 231-244.
- Hanabusa, K., J. Tange, Y. Taguchi, T. Koyama and H. Shirai (1993). *Small molecular gelling agents to harden organic liquids: alkylamide of N-benzyloxycarbonyl-L-valyl-L-valine*, Chem Commun: 390-392.
- Hatefi, A. and B. Amsden (2002). *Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems*, J Controlled Release 80: 9-28.

- Heeres, A., C. van der Pol, M. Stuart, A. Friggeri, B. L. Feringa and J. van Esch (2003). *Orthogonal self-assembly of low molecular weight hydrogelators and surfactants*, J Am Chem Soc 125: 14252-14253.
- Heller, J., J. Barr, S. Ng, H. R. Shen, R. Gurny, K. Schwach-Abdelaoui, A. Rothen-Weinhold and M. van de Weert (2002). *Development of poly(ortho esters) and their application for bovine serum albumin and bupivacaine delivery*, J Controlled Release 78: 133-41.
- Heskins, M. and J. E. Guillet (1968). *Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide)*, J Macromol Sci Chem A2: 1441-1455.
- Hubbell, J. A., C. P. Pathak, A. S. Sawhney, D. N. P and J. L. Hill (1995). *Photopolymerizable biodegradable hydrogels as tissue contacting materials and controlled-release carriers*. US Patent N° 5,410,016.
- Imae, T., N. Hayashi, T. Matsumoto, T. Tada and M. Furusaka (2000). *Structures of fibrous supramolecular assemblies constructed by amino acid surfactants: investigation by AFM, SANS, and SAXS*, J Colloid Interface Sci 225: 285-290.
- Ismail, F. A., J. Napaporn, J. A. Hughes and G. A. Brazeau (2000). *In situ gel formulations for gene delivery: release and myotoxicity studies*, Pharm Dev Technol 5: 391-397.
- ISO (1993). *ISO 10,993. Biological evaluation of medical devices*. International Standard Organisation. Genève.
- Jeong, B., Y. H. Bae and S. W. Kim (2000). *Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers*, J Controlled Release 63: 155-163.
- Jeong, B., Y. H. Bae and S. W. Kim (2000). *In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof*, J Biomed Mater Res 50: 171-177.
- Jeong, B., Y. H. Bae and S. W. Kim (1999). *Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions*, Macromolecules 32: 7064-7069.
- Jeong, B., Y. H. Bae, D. S. Lee and S. W. Kim (1997). *Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems*, Nature 338: 860-862.

- Jibry, N. and S. Murdan (2004). *In vivo investigation, in mice and man, into the irritation potential of novel amphiphilic gels being studied as transdermal drug carriers*, Eur J Pharm Biopharm 58: 107-119.
- Joesten, M. D. and L. J. Schaad (1974). *Hydrogen bonding*. New York: Marcel Dekker. 622 p.
- Jung, J. H., Y. Ono and S. Shinkai (2000). *Sol-gel polycondensation of tetraethoxysilane in a cholesterol-based organogel system results in chiral spiral silica*, Angew Chem Int Ed Engl 39: 1862-1865.
- Kane, J. M., M. Eerdeken, J. P. Lindenmayer, S. J. Keith, M. Lesem and K. Karcher (2003). *Long-acting injectable risperidone: efficacy and safety of the first long-acting atypical antipsychotic*, Am J Psychiat 160: 1125-1132.
- Kantaria, S., G. D. Rees and M. J. Lawrence (1999). *Gelatin-stabilised microemulsion-based organogels: rheology and application in iontophoretic transdermal drug delivery*, J Controlled Release 60: 355-65.
- Katakam, M., W. R. Ravis and A. K. Banga (1997). *Controlled release of human growth hormone in rats following parenteral administration of poloxamer gels*, J Controlled Release 49: 21-26.
- Kawakami, K., T. Yoshikawa, Y. Moroto, E. Kanaoka, K. Takahashi, Y. Nishihara and K. Masuda (2002). *Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. I. Prescription design*, J Controlled Release 81: 65-74.
- Khalid, M. N. (2002). *Synthèse, caractérisation, stérilisation et étude des propriétés de réseaux à base de chitosane. Application à la libération contrôlée pour l'administration orale et comme enrobage pour des prothèses endovasculaires*. Thèse de doctorat, Université Paris XI.
- Kim, Y. J., S. Choi, J. J. Koh, M. Lee, K. S. Ko and S. W. Kim (2001). *Controlled release of insulin from injectable biodegradable triblock copolymer*, Pharm Res 18: 548-550.
- Kissel, T., Y. Li and F. Unger (2002). *ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins*, Adv Drug Deliv Rev 54: 99-134.

- Kranz, H., G. A. Brazeau, J. Napaporn, R. L. Martin, W. Millard and R. Bodmeier (2001). *Myotoxicity studies of injectable biodegradable in-situ forming drug delivery systems*, Int J Pharm 212: 11-18.
- Laurencin, C. T. and H. Elgandy (1994). The biocompatibility and toxicity of degradable polymeric materials : implications for drug delivery. Dans A. J. Domb (Ed.): *Polymeric site-specific pharmacotherapy*, Toronto: John Wiley and Sons. p. 27-46.
- Lawrence, M. J. and G. D. Rees (2000). *Microemulsion-based media as novel drug delivery systems*, Adv Drug Deliv Rev 45: 89-121.
- Lescanne, M., A. Colin, O. Mondain-Monval, F. Fages and J. L. Pozzo (2003). *Structural aspects of the gelation process observed with low molecular mass organogelators*, Langmuir 19: 2013-2020.
- Lescanne, M., P. Grondin, A. d'Aléo, F. Fages, J. L. Pozzo, O. Mondain-Monval, P. Reinheimer and A. Colin (2004). *Thixotropic organogels based on a simple N-hydroxyalkyl amide: rheological and aging properties*, Langmuir 20: 3032-3041.
- Lin, Y. and R. G. Weiss (1987). *A novel gelator of organic liquids and the properties of its gels*, Macromolecules 20: 414-417.
- Lloyd, J. (1926). *Colloid Chemistry*. New York: The Chemical Catalog Co. 767.p.
- Lu, S. and K. S. Anseth (1999). *Photopolymerization of multilaminated poly(HEMA) hydrogels for controlled release*, J Controlled Release 57: 291-300.
- Luo, J. P., J. W. Hubbard and K. K. Midha (1997). *Studies on the mechanism of absorption of depot neuroleptics: fluphenazine decanoate in sesame oil*, Pharm Res 14: 1079-84.
- Luo, X., B. Liu and Y. Liang (2001). *Self-assembled organogels formed by mono-chain L-alanine derivatives*, Chem Commun 17: 1556-1557.
- Mäder, K., B. Bittner, Y. Li, W. Wohlauf and T. Kissel (1998). *Monitoring microviscosity and microacidity of the albumin microenvironment inside degrading microparticles from poly(lactide-co-glycolide) (PLG) or ABA-triblock polymers containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A block and hydrophilic poly(ethyleneoxide) B blocks*, Pharm Res 15: 787-793.

- Mallapragada, S. K. and B. Narasimhan (1999). Drug delivery systems. Dans A. F. Von Recum, J. M. Anderson, S. R. Ash, F. M. Cooke, U. M. Gross, M. Laberge and W. H. Lawrence (Ed.): *Handbook of biomaterials evaluation*, 2^{ième} éd. Philadelphie: Taylor and Francis. p. 425-437.
- Mealey, K. L., K. E. Peck, B. S. Bennett, R. K. Sellon, G. R. Swinney, K. Melzer, S. A. Gokhale and T. M. Krone (2004). *Systemic absorption of amitriptyline and buspirone after oral and transdermal administration to healthy cats*, J Vet Intern Med 18: 43-6.
- Mi, F. L., Y. C. Tan, H. F. Liang and H. W. Sung (2002). *In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant*, Biomaterials 23: 181-191.
- Mukkamala, R. and R. G. Weiss (1995). *Anthraquinone-Steroid Based Gelators of Alcohols and Alkanes*, Chem Commun: 375-376.
- Muller, R. H., K. Mader and S. Gohla (2000). *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*, Eur J Pharm Biopharm 50: 161-77.
- Murdan, S. (2002). *Drug delivery to the nail following topical application*, Int J Pharm 236: 1-26.
- Murdan, S., G. Gregoriadis and A. T. Florence (1999). *Novel sorbitan monostearate organogels*, J Pharm Sci 88: 608-614.
- Murdan, S., B. van den Bergh, G. Gregoriadis and A. T. Florence (1999). *Water-in-sorbitan monostearate organogels (water-in-oil gels)*, J Pharm Sci 88: 615-619.
- Nastruzzi, C. and R. Gambari (1994). *Antitumor activity of (trans)dermally delivered aromatic tetra-amidines*, J Controlled Release 29: 53-62.
- Okumu, F. W., N. Dao le, P. J. Fielder, N. Dybdal, D. Brooks, S. Sane and J. L. Cleland (2002). *Sustained delivery of human growth hormone from a novel gel system: SABER*, Biomaterials 23: 4353-8.
- Orive, G., R. M. Hernandez, A. Rodriguez Gascon, A. Dominguez-Gil and J. L. Pedraz (2003). *Drug delivery in biotechnology: present and future*, Curr Opin Biotechnol 14: 659-64.

- Packhaeuser, C. B., J. Schnieders, C. G. Oster and T. Kissel (2004). *In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview*, Eur J Pharm Biopharm 58: 445-55.
- Park, H. and K. Park (1996). *Biocompatibility issues of implantable drug delivery systems*, Pharm Res 13: 1770-6.
- Pechenov, S., B. Shenoy, M. X. Yang, S. K. Basu and A. L. Margolin (2004). *Injectable controlled release formulations incorporating protein crystals*, J Controlled Release 96: 149-58.
- Placin, F., J. P. Desvergne and J. C. Lassègues (2001). *Organogel electrolytes based on a low molecular weight gelator: 2,3-Bid(n-decyloxy)anthracene*, Chem Mater 13: 117-121.
- Qiu, B., S. Stefanos, J. Ma, A. Laloo, B. A. Perry, M. J. Leibowitz, P. J. Sinko and S. Stein (2003). *A hydrogel prepared by in situ cross-linking of a thiol-containing poly(ethylene glycol)-based copolymer: a new biomaterial for protein drug delivery*, Biomaterials 24: 11-8.
- Ratner, B. D. (2002). *Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems*, J Controlled Release 78: 211-218.
- Ravivarapu, H. B., K. L. Moyer and R. L. Dunn (2000). *Sustained suppression of pituitary-gonadal axis with an injectable, in situ forming implant of leuprolide acetate*, J Pharm Sci 89: 732-741.
- Ray, N. and A. J. Tipton (2001). *SABER Fact Sheet*. DURECT Corporation. Cupertino.
- Rees, G. D. and B. H. Robinson (1993). *Microemulsions and organogels: properties and novel applications*, Adv Mater 5: 608-618.
- Reithmeier, H., J. Herrmann and A. Gopferich (2001). *Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides*, J Controlled Release 73: 339-350.
- Royals, M. A., S. M. Fujita, G. L. Yewey, J. Rodriguez, P. C. Schultheiss and R. L. Dunn (1999). *Biocompatibility of a biodegradable in situ forming implant system in rhesus monkeys*, J Biomed Mater Res 45: 231-239.
- Ryu, S. Y., S. Kim, J. Seo, Y. W. Kim, O. H. Kwon, D. J. Jang and S. Y. Park (2004). *Strong fluorescence emission induced by supramolecular assembly and gelation: luminescent organogel from nonemissive oxadiazole-based benzene-1,3,5-tricarboxamide gelator*, Chem Commun: 70-1.

- Sadhale, Y. and J. C. Shah (1999). *Biological activity of insulin in GMO gels and the effect of agitation*, Int J Pharm 191: 65-74.
- Sakurai, K., Y. Jeong, K. Koumoto, A. Friggeri, O. Gronwald, S. Sakurai, S. Okamoto, K. Inoue and S. Shinkai (2003). *Supramolecular structure of a Sugar-appended organogelator explored with synchrotron X-ray small-angle scattering*, Langmuir 19: 8211-8217.
- Sartor, O. (2003). *Eligard: leuprolide acetate in a novel sustained-release delivery system*, Urology 61: 25-31.
- Schmalfuß, U., R. Neubert and W. Wohlrab (1997). *Modification of drug penetration into human skin using microemulsions*, J Controlled Release 46: 279-285.
- Schmidt, R., M. Schmutz, M. Michel, G. Decher and P. J. Mesini (2001). *Organogelation properties of a series of oligoamides*, Langmuir 18: 5668-5672.
- Schoonbeek, F. (2001). *Making it all stick together. The gelation of organic liquid by small organic molecules*. Thèse de doctorat, Rijksuniversiteit Groningen.
- Shah, J. C., Y. Sadhale and D. M. Chilukuri (2001). *Cubic phase gels as drug delivery systems*, Adv Drug Deliv Rev 47: 229-250.
- Sharkawy, A. A. (1997). *Engineering the tissue which encapsulate subcutaneous implants. I. Diffusion properties*, J Biomed Mater Res 37: 401-412.
- Shi, C., Z. Huang, S. Kilic, J. Xu, R. M. Enick, E. J. Beckman, A. J. Carr, R. E. Melendez and A. D. Hamilton (1999). *The gelation of CO(2): a sustainable route to the creation of microcellular materials*, Science 286: 1540-1543.
- Shirakawa, M., N. Fujita and S. Shinkai (2003). *[60]fullerene-motivated organogel formation in a porphyrin derivative bearing programmed hydrogen-bonding sites*, J Am Chem Soc 125: 9902-3.
- Shirakawa, M., S. Kawano, N. Fujita, K. Sada and S. Shinkai (2003). *Hydrogen-bond-assisted control of H versus J aggregation mode of porphyrins stacks in an organogel system*, J Org Chem 68: 5037-44.
- Singla, A. K., M. Chawla and A. Singh (2000). *Potential applications of carbomer in oral mucoadhesive controlled drug delivery system: a review*, Drug Dev Ind Pharm 26: 913-24.

- Sinha, V. R. and A. Trehan (2003). *Biodegradable microspheres for protein delivery*, J Controlled Release 90: 261-280.
- Smith, D. A. and A. J. Tipton (1996). *A novel parenteral delivery system*, Pharm Res 13: S-300.
- Sosnik, A. and D. Cohn (2004). *Ethoxysilane-capped PEO-PPO-PEO triblocks: a new family of reverse thermo-responsive polymers*, Biomaterials 25: 2851-8.
- Sugiyasu, K., N. Fujita and S. Shinkai (2004). *Visible-light-harvesting organogel composed of cholesterol-based perylene derivatives*, Angew Chem Int Ed Engl 43: 1229-33.
- Suzuki, M., T. Nigawara, M. Yumoto, M. Kimura, H. Shirai and K. Hanabusa (2003). *L-lysine based gemini organogelators: their organogelation properties and thermally stable organogels*, Org Biomol Chem 1: 4124-31.
- Svendsen, O. (1983). *Local muscle damage and oily vehicles: a study on local reactions in rabbits after intramuscular injection of neuroleptic drugs in aqueous or oily vehicles.*, Acta Pharmacol Toxicol 52: 298-304.
- Tamaru, S., M. Takeuchi, M. Sano and S. Shinkai (2002). *Sol-gel transcription of sugar-appended porphyrin assemblies into fibrous silica: unimolecular stacks versus helical bundles as templates*, Angew Chem Int Ed Engl 41: 853-6.
- Taulier, N. (1999). *Boutons-pressure moléculaires dans des phases lamellaires inverses stabilisées par des interactions stériques*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie.
- Terech, P., D. Meerschaut, J. P. Desvergne, M. Colomes and H. Bouas-Laurent (2003). *2,3-di-n-decyloxy-6,7-dichloroanthracene (Cl₂DDOA), a new low-molecular-mass fluorescent organogelator: physical properties and structures*, J Colloid Interface Sci 261: 441-450.
- Terech, P., D. Pasquier, V. Bordas and C. Rossat (2000). *Rheological properties and structural correlations in molecular organogels*, Langmuir 16: 4485-4494.
- Terech, P., C. Rossat and F. Volino (2000). *On the measurement of the phase transition temperatures in physical molecular organogels*, J Colloid Interface Sci 227: 363-370.

- Terech, P. and R. G. Weiss (1997). *Low molecular mass gelators of organic liquids and the properties of their gels*, Chem Rev 97: 3133-3159.
- Tipton, A. J. and R. L. Dunn (2000). *In situ gelling systems*. Dans J. Senior and M. Radomsky (Ed.): *Sustained-release injectable products*, Englewood: Interpharm Press. p. 241-278.
- Trivedi, D. R., A. Ballabh, P. Dastidar and B. Ganguly (2004). *Structure-Property Correlation of a New Family of Organogelators Based on Organic Salts and Their Selective Gelation of Oil from Oil/Water Mixtures*, Chemistry 10: 5311-5322.
- van de Weert, M., M. J. van Steenberghe, J. L. Cleland, J. Heller, W. E. Hennink and D. J. Crommelin (2002). *Semisolid, self-catalyzed poly(ortho ester)s as controlled-release systems: protein release and protein stability issues*, J Pharm Sci 91: 1065-74.
- van der Laan, S., B. L. Feringa, R. M. Kellogg and J. van Esch (2002). *Remarkable polymorphism in gels of new azobenzene bis-urea gelators*, Langmuir 18: 7136-7140.
- van Esch, J. H. and B. L. Feringa (2000). *New functional materials based on self-assembling organogels: from serendipity towards design*, Angew Chem Int Ed 39: 2263-2266.
- van Gorp, J. J., J. A. J. M. Vekemans and E. W. Meijer (2002). *C₃-symmetrical supramolecular architectures: fibers and organic gels from discotic trisamides and trisureas*, J Am Chem Soc 124: 14759-14769.
- VandeVord, P. J., H. W. T. Matthew, S. P. DeSilva, L. Mayton, B. Wu and P. H. Wooley (2002). *Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice*, J Biomed Mater Res 59: 585-590.
- Veyries, M. L., G. Couarraze, S. Geiger, F. Agnely, L. Massias, B. Kunzli, F. Faurisson and B. Rouveix (1999). *Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels*, Int J Pharm 192: 183-193.
- VMEU, Veterinary Medicines Evaluation Unit (1999). *1-methyl-2-pyrrolidone. Summary report*, London: The European Agency for Evaluation of Medicinal Products.

- Wang, R., C. Geiger, L. Chen, B. Swanson and D. G. Whitten (2000). *Direct observation of sol-gel conversion: the role of the solvent in organogel formation*, J Am Chem Soc 122: 2399-2400.
- Wasan (2003). *Poloxamer 407-mediated alterations in the activities of enzymes regulating lipid metabolism in rats*, J Pharm Pharm Sci 6: 189-197.
- Wenzel, J. G., K. S. Balaji, K. Koushik, C. Navarre, S. H. Duran, C. H. Rahe and U. B. Kompella (2002). *Pluronic F127 gel formulations of deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle*, J Controlled Release 85: 51-59.
- Whitesides, G. M., J. P. Mathias and C. T. Seto (1991). *Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures*, Science 254: 1312-9.
- Willemen, H. M., A. T. M. Marcellis, E. J. R. Sudhölter, W. G. Bouwman, B. Demé and P. Terech (2004). *A small-angle neutron scattering study of cholic acid-based organogel systems*, Langmuir 20: 2075-2080.
- Williams, D. F. (1999). *The Williams dictionary of Biomaterials*. Liverpool: U. Press. 343 p.
- Willmann, H. L., P. Walde, P. L. Luisi, A. Gazzaniga and F. Stroppolo (1992). *Lecithin organogels as matrix for the transdermal transport of drugs*, J Pharm Sci 81: 871-874.
- Willis-Goulet, H. S., B. A. Schmidt, C. F. Nicklin, R. Marsella, G. A. Kunkle and I. R. Tebbett (2003). *Comparison of serum dexamethasone concentrations in cats after oral or transdermal administration using pluronic lecithin organogel (PLO): a pilot study*, Vet Dermatol 14: 83-9.
- Winternitz, C. I., J. K. Jackson, A. M. Oktaba and H. M. Burt (1996). *Development of a polymeric surgical paste formulation for taxol*, Pharm Res 13: 368-75.
- Wyatt, D. M. and D. Dorschel (1992). *A cubic-phase delivery system composed of glyceryl monooleate and water sustained release of water-soluble drugs*, Pharm Technol: 116-124.

- Yamaguchi, K. and J. M. Anderson (1993). *In vivo biocompatibility studies of medisorb 65/35 D,L-lactide/glycolide copolymer microspheres*, J Controlled Release 24: 81-93.
- Yewey, G. L., E. G. Duysen, S. M. Cox and R. L. Dunn (1997). *Delivery of protein from a controlled release injectable implant*, Pharm biotechnol 10: 93-117.
- Yi, T., K. Sada, K. Sugiyasu, T. Hatano and S. Shinkai (2003). *Photo-induced colour generation and colour erasing switched by the sol-gel phase transition*, Chem Commun: 344-5.
- Yim, Z., M. Zupon and I. A. Chaudry (1989). *Stable oleaginous gel*. US Patent N° 4,851,220.
- Yun, Y. J., S. M. Park and B. H. Kim (2003). *Novel thymidine-based organogelators and their gelation behaviours*, Chem Commun: 254-5.
- Zentner, G. M., R. Rathi, C. Shih, J. C. McRea, M. H. Seo, H. Oh, B. G. Rhee, J. Mestecky, Z. Moldoveanu, M. Morgan and S. Weitman (2001). *Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs*, J Controlled Release 72: 203-15.
- Zhang, X., J. K. Jackson, W. Wong, W. Min, T. Cruz, W. L. Hunter and H. M. Burt (1996). *Development of biodegradable polymeric paste formulations for taxol: an in vitro and in vivo study*, Int J Pharm 137: 199-208.

ANNEXE 1 : Matériels et méthodes

Complément au chapitre 3

1. Viscosité des formulations

La stabilité des formulations a été évaluée en fonction de la température de conservation (4 ou 20°C) au moyen d'un viscosimètre rotatif Brookfield DV-II muni d'une géométrie cône-plan (cône CP-52 : angle 3°, rayon 1,2 cm) à 20±0,1 °C. Un échantillon de 0,5 mL de gel a été déposé au centre du cône, puis la température a été stabilisée pendant 10 min avant la première mesure. La vitesse de rotation a été modifiée par palier d'une minute de 2 à 100 s⁻¹ en augmentant, puis en diminuant. La viscosité ainsi que la contrainte de cisaillement ont été mesurées toutes les 20 s, ce qui donne donc 3 valeurs pour chaque vitesse de cisaillement. Le test a été répété successivement trois fois sur un même gel.

2. Texturométrie

L'analyse de texture des gels de 7,5 et 10% *p/v* de SAM et SAE dans l'huile de carthame a été effectuée avec un Texture Analyzer TA-XT2, une sonde cylindrique de 0,32 cm de diamètre et une cellule de 5 kg. Les gels (400 µL) ont été préparés dans des tubes de 1 cm de diamètre et une étude en mode de compression a été effectuée. La vitesse d'approche de la sonde a été de 1 mm/s, jusqu'au gel, puis de 0,5 mm/s lors du contact avec l'échantillon. La force de résistance rencontrée par la sonde lors de la pénétration dans le gel a été mesurée sur une distance de 4 mm (aller et retour). La force du gel correspond au maximum du pic de la courbe de force en fonction de la pénétration. Chaque gel a été préparé séparément 3 fois et le test a été effectué une fois sur chaque échantillon. Les échantillons ont été conservés pendant 30 jours à température ambiante et testés à nouveau après cette période.