

2m11.3462.11

Université de Montréal

**Organogel à base d'un dérivé de la L-alanine
pour la libération prolongée de leuprolide :
étude pharmacocinétique et
pharmacodynamique chez le rat**

par

François Plourde

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



Juillet 2006

© François Plourde, 2006



Direction des bibliothèques

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 :

Organogel à base d'un dérivé de la L-alanine pour la libération prolongée de
leuprolide : étude pharmacocinétique et pharmacodynamique chez le rat

présenté par :
François Plourde

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Claude Mailhot, présidente-rapporteuse

Dr Jean-Christophe Leroux, directeur

Dr Huy Ong, co-directeur

Dre Sylvie Marleau, membre du jury

Résumé

Le traitement de maladies chroniques requiert l'administration quotidienne de médicament. Pour contourner ce problème, les formulations à libération prolongée assurent l'acheminement de médicament sur une longue période et maintiennent des concentrations plasmatiques dans une fenêtre thérapeutique efficace pour le traitement de la maladie. De façon générale, les gels utilisés dans le domaine pharmaceutique (hydrogels et organogels) permettent de libérer des médicaments pendant quelques jours. Dans cette optique, l'accroissement du temps de libération du médicament par la formulation s'avère avantageux. Récemment, de nouvelles molécules dérivées de l'acide aminé L-alanine (organogélifiants) ont démontré une capacité à former des gels biocompatibles dans des huiles pharmaceutiques; de plus, ces gels persistent pendant plusieurs semaines suite à leur administration sous-cutanée chez des rats. Des gels de *N*-stéaroyl (m)éthoxy-L-alanine (SAM et SAE) dans l'huile de carthame ont donc été préparés. Le leuprolide, un nonapeptide hydrophile utilisé dans le traitement palliatif du cancer de la prostate, de l'endométriose et de la puberté précoce d'origine centrale, a été incorporé aux gels sous la forme d'une émulsion. Les gels ont été administrés à des rats par la voie sous-cutanée. Les concentrations plasmatiques de leuprolide et de testostérone ont démontré une libération continue de médicament pendant une durée de 14 à 25 jours et une castration chimique pouvant durer près de 50 jours. Les organogels à base de dérivés de L-alanine représentent donc une avenue intéressante aux formulations de gel pour assurer une libération de médicament sur une longue période.

Mots clés : organogélifiant, organogel, libération prolongée de médicament, insert auto-formant *in situ*, leuprolide

Abstract

The treatment of chronic diseases necessitates daily administration of drugs. Sustained release formulations circumvent this problem by providing a continuous delivery of drug over a prolonged period of time. Drug plasma levels are maintained within the therapeutic window for an efficient treatment of the disease. Generally, pharmaceutical gels (hydro- and organogels) only permit a drug release over a few days; an increase in release time is therefore desirable and advantageous. Recently, new L-alanine-derived organogelator molecules were shown to form biocompatible gels when mixed with pharmaceutical oils. When subcutaneously injected to rats, the organogel implants retained their integrity for several weeks. As part of this project, gels with N-steroyl (m)ethoxy-L-alanine (SAM and SAE, respectively) as the organogelators were prepared using safflower oil. Leuprolide, a hydrophilic nanopeptide used in the palliative treatment of prostate cancer, endometriosis, and central precocious puberty, was incorporated in the gels as an emulsion. The gels were subcutaneously administered to rats. Plasma levels of the drug and testosterone showed a sustained release of the active molecule lasting between 14 and 25 days and a chemical castration lasting up to 50 days. The L-alanine organogels therefore illustrate an interesting option in the array of long-term drug release formulations.

Keywords : organogelator, organogel, controlled drug delivery, *in situ*-forming implant, leuprolide

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et des abréviations.....	x
Remerciements	xii

CHAPITRE 1. Les solutions gélifiantes injectables pour la libération prolongée de médicament 1

1.1. Introduction sur les gels	1
1.1.1. Définition d'un gel	1
1.1.2. Les mécanismes de gélification.....	2
1.1.3. Les différents types de solutions gélifiantes.....	2
1.2. Les hydrogels dans le domaine pharmaceutique	3
1.2.1. Les polysaccharides.....	3
1.2.2. Le poly (<i>N</i> -isopropylacrylamide)	5
1.2.3. Les poloxamers et leurs dérivés	6
1.2.4. Les copolymères de poly(éthylène glycol) et poly(acide α -hydroxycarboxylique)	8
1.3. Les organogels dans le domaine pharmaceutique	10
1.3.1. Les différentes classes d'organogélifiants.....	10
1.3.2. Les applications des organogels pour la libération prolongée de médicament	13

CHAPITRE 2. Le leuprolide en tant qu'agent thérapeutique 16

2.1. Notions d'endocrinologie : les hormones sexuelles	16
2.1.1. L'hypothalamus et l'hypophyse : un rappel anatomique et endocrinien	16
2.1.2. Les hormones sexuelles chez l'homme et la femme : terminologie et fonctions	19
2.1.2.1. Les rôles de la testostérone dans le développement des caractères sexuels chez l'homme	22
2.1.2.2. L'action moléculaire de la testostérone.....	23
2.1.2.3. Les rôles des œstrogènes et de la progestérone chez la femme... 24	
2.2. Le leuprolide en tant qu'agent thérapeutique	26
2.2.1. Description du leuprolide	27

2.2.2.	Les propriétés pharmacologiques du leuprolide.....	28
2.2.2.1.	Le mécanisme d'action du leuprolide.....	28
2.2.2.2.	Les effets secondaires d'un traitement au leuprolide	30
2.2.2.2.1.	Les effets du leuprolide chez l'homme	30
2.2.2.2.2.	Les effets du leuprolide chez la femme.....	31
2.2.2.2.3.	Les effets du leuprolide chez l'enfant	32
2.2.3.	Les utilisations thérapeutiques du leuprolide	33
2.2.3.1.	Le cancer de la prostate hormono-dépendant.....	33
2.2.3.1.1.	L'étiologie du cancer de la prostate.....	33
2.2.3.1.2.	Le développement de la prostate et d'une tumeur prostatique ..	34
2.2.3.1.3.	Les différents traitements contre un cancer de la prostate	35
2.2.3.2.	L'endométriose.....	36
2.2.3.3.	La puberté précoce d'origine centrale	38
2.2.3.4.	Les autres utilisations thérapeutiques du leuprolide.....	39
2.2.3.4.1.	Les léiomyomata utérins.....	39
2.2.3.4.2.	Les problèmes de fertilité et la fertilisation <i>in vitro</i>	40
2.2.3.4.3.	Le traitement des paraphilies avec le leuprolide	41
2.2.4.	Les différents systèmes commercialisés pour la libération prolongée de leuprolide.....	42
2.2.4.1.	Lupron ^{MC} dépôt	42
2.2.4.2.	Eligard ^{MC}	43
2.2.4.3.	Viadur ^{MC}	45
CHAPITRE 3. Article		48
3.1.	Introduction	50
3.2.	Materials and methods.....	52
3.2.1.	Materials.....	52
3.2.2.	Preparation of implants	52
3.2.3.	<i>In vitro</i> release of leuprolide.....	53
3.2.4.	High performance liquid chromatography (HPLC) method	53
3.2.5.	Pharmacokinetic study	54
3.2.6.	Leuprolide and testosterone radioimmunoassays (RIA)	54
3.2.7.	Statistical analysis	55
3.3.	Results and discussion.....	55
3.4.	Conclusion.....	58
3.5.	Acknowledgements	59
3.6.	References	59
3.7.	Figure captions	64
CHAPITRE 4. Discussion		69
4.1.	Le développement de formulations d'organogélifiant pour la libération prolongée de leuprolide	70
4.2.	Les études de libération prolongée <i>in vitro</i>	72

4.3. Les études pharmacocinétiques chez le rat.....	74
CHAPITRE 5. Conclusion.....	77
Bibliographie.....	78
ANNEXE 1 : Matériels et Méthodes.....	xiii

Liste des tableaux

CHAPITRE 1

Tableau 1. La comparaison de la structure moléculaire de la GnRH et du leuprolide.....27

CHAPITRE 3

Table I. Pharmacokinetic parameters of the different formulations injected in rats.63

Liste des figures

CHAPITRES 1, 2 ET 4

Figure 1.1. Le mécanisme de gélification des polysaccharides. Sous l'action de la chaleur, les polysaccharides (A) adoptent la forme d'hélice (B) puis des cristallites (C) avec des points de jonctions.	4
Figure 1.2. La structure moléculaire du poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide).	5
Figure 1.3. Le diagramme de phase du copolymère tribloc PEO-PLGA-PEO (550-2810-550) en solution dans l'eau	8
Figure 2.1. A. La localisation de l'hypophyse et de l'hypothalamus et B. les différentes parties du cerveau.	17
Figure 2.2. Le système porte hypothalamo-hypophysaire.	18
Figure 2.3. La régulation des hormones sexuelles chez la femme et chez l'homme.	21
Figure 2.4. La structure chimique des androgènes et de leurs précurseurs (acétyl-CoA et cholestérol)	24
Figure 2.5. La structure chimique des principaux œstrogènes.	25
Figure 2.6. L'action moléculaire du leuprolide dans la cellule hypophysaire.	29
Figure 2.7. L'implant d'acétate de leuprolide Viadur ^{MC}	45
Figure 4.1. La structure moléculaire de la SAM et de la SAE, deux organogélifiants dérivés de la L-alanine.	71
Figure 4.2. L'influence de la proportion de solvant organique dans une formulation de LAM dans l'huile de soja sur la diffusion du leuprolide hors de l'implant, <i>in vitro</i>	72

CHAPITRE 3

Fig. 1. Top panel. Schematic representation of the preparation and administration of the *in situ*-forming implants. The formulations were prepared by simple mixing of the organosol with a w/o emulsion containing dissolved leuprolide at 60°C. Gelation was partially inhibited by adding 10% v/v of NMP. Upon subcutaneous injection of the system, NMP diffuses into the surrounding medium allowing solidification of the implant. The drug is released by diffusion through the network and slow degradation of the gel. **Bottom panel.** Subcutaneous implant of 10% w/v SAM in safflower oil 24 hours after injection (right) and photomicrograph of the gel revealing entrapped water droplets (shown by white arrows) (magnification: 100 X).

Fig. 2. *In vitro* release profiles of leuprolide from w/o emulsion (squares), 7.5% SAM (open circles), 10% SAM (solid circles), and 10% SAE (triangles) organogels. Mean \pm SD (n = 3).

Fig. 3. Plasma concentrations of leuprolide after the administration of w/o emulsion (squares), 7.5% SAM (open circles), 10% SAM (solid circles), and 10% SAE (triangles) organogels. Mean \pm SEM (n = 5-6).

Fig. 4. Plasma concentrations of testosterone after the administration of w/o emulsion (squares), 7.5% SAM (open circles), 10% SAM (solid circles), and 10% SAE (triangles) organogels. Mean \pm SEM (n = 5-6). The dotted line represents the chemical castration threshold.

Liste des sigles et des abréviations

ϕ_m	Fraction micellaire
ACS	Anthraquinone-chaîne alkyle-stéroïde
ACTH	Hormone corticotrope
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANS	Antiandrogène non-stéroïdien
AP	Acide phosphatidique
ARN	Acide ribonucléique
AS	Antiandrogène stéroïdien
C_{max}	Concentration plasmatique maximale
CMC	Concentration micellaire critique
CRH	Corticolibérine
DAG	Diacylglycérol
DHT	Dihydrotestostérone
DMAc	<i>N, N</i> -diméthyle acétamide
DMO	Densité minérale osseuse
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E/H	Eau/Huile
E2/T	Rapport 17 β -œstradiol/testostérone
FDA	<i>Food & Drug Administration</i>
FSH	Folliculostimuline
FSH/LH-RH ou GnRH	Gonadolibérine
GEx	Gonadotrophines exogènes
GH	Hormone de croissance
GHRH	Sécrétagogue de l'hormone de croissance
GLP-1	« <i>glucagon-like peptide-1</i> »
HPMC	Hydroxypropyl méthylcellulose
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate

LA	<i>N</i> -lauroyle L-alanine
LAE	<i>N</i> -lauroyle éthoxy-L-alanine
LAM	<i>N</i> -lauroyle méthoxy-L-alanine
LH	Hormone lutéinisante
LT	Leucotriène
MAP	« <i>Mitogen activated protein</i> »
MAPK	« <i>Mitogen activated protein kinase</i> »
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone
PEO-PLGA-PEO	Copolymères triblocs de poly(oxyde d'éthyle- <i>b</i> -L-acide lactique- <i>co</i> -acide glycolique- <i>b</i> -oxyde d'éthyle)
PEO-PLLA-PEO	Copolymères triblocs de poly(oxyde d'éthyle- <i>b</i> -L-acide lactique- <i>b</i> -oxyde d'éthyle)
PEO-PPO-PEO	Copolymères blocs poly(oxyde d'éthylène- <i>b</i> -oxyde de propylène- <i>b</i> -oxyde d'éthylène)
PKC	Protéine kinase C
PLA	Poly(acide lactique)
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLD	Phospholipase D
PLGA	Poly(acide lactique- <i>co</i> -acide glycolique)
PNIPAAM	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)
PSA	Antigène spécifique de la prostate
SA	<i>N</i> -stéaroyle L-alanine
SAE	<i>N</i> -stéaroyle éthoxy-L-alanine
SAM	<i>N</i> -stéaroyle méthoxy-L-alanine
SNC	Système nerveux central
TRH	Thyréolibérine
TSH	Thyrotrophine

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeur et co-directeur, les professeurs Jean-Christophe Leroux et Huy Ong, pour leur dévouement et leur support inestimable jusqu'au dernier moment de la rédaction de ce mémoire. Mon affection professionnelle envers eux ne saurait témoigner suffisamment de la considération et du respect que j'éprouve à leur égard. Merci aussi à Anne-Claude Couffin-Hoarau sur qui j'ai toujours pu compter, ainsi qu'à Didier Hoarau pour son implication dans le projet. Je remercie également la compagnie Ethypharm pour son soutien financier.

Je remercie les Dres Mailhot et Marleau d'avoir généreusement accepté d'assumer les tâches de présidente-rapporteuse et membre du jury, respectivement.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes collègues de laboratoire, notamment Aude Motulsky qui m'a servi de modèle à plusieurs reprises et qui m'a aidé bien plus souvent qu'à mon tour. Merci aussi à Ève Ruel-Gariépy, Mylène Beaudoin, Petra Pohankova, Claire Jarry, Ève-Marie Charbonneau, Marie-Hélène Dufresne et David Ghattas pour leur généreuse disponibilité. Pour leur soutien moral, je remercie chaleureusement Geneviève Gaucher et Joanna Rossi.

Je tiens à remercier aussi mes parents et ma famille pour leur appui si précieux et leur présence irremplaçable, du début jusqu'à la toute fin de mes études. Merci enfin à Alexandre Bélisle pour son infinie compréhension, à Geneviève Taquet et Mario Mercier pour leur affection, leur présence et leurs encouragements dans les moments moins faciles, à Annie Giard, François Tremblay, Virginie Poisson, Stéphanie Roumy, Philippe Cantin et Mansouria Merad Boudia pour leur amitié. Et un merci tout spécial à mes deux anges Marie-Ève Perron et Anda Vintiloïu, qui veillent sur moi et qui m'aident à devenir quelqu'un de mieux à tous les jours.

CHAPITRE 1. Les solutions gélifiantes injectables pour la libération prolongée de médicament

1.1. Introduction sur les gels

Le traitement de maladies chroniques nécessite l'administration de médicaments sur une base quotidienne. Pour contourner ce problème et favoriser l'observance des patients, les formulations à libération prolongée permettent de maintenir des taux sanguins de médicaments dans une fenêtre thérapeutique efficace. De nombreuses formulations assurent une libération sur plusieurs jours, voire plusieurs mois, notamment les inserts constitués de gels (hydrogels et organogels). L'utilisation de solutions gélifiantes injectables s'avère avantageuse dans le cadre de tels traitements, notamment en raison de leur biocompatibilité et de leur dégradation *in situ*, ce qui permet d'éviter une intervention chirurgicale pour retirer l'insert. Dans le présent chapitre, nous passons en revue les différentes solutions gélifiantes thermosensibles utilisées dans le monde pharmaceutique pour assurer la libération prolongée de médicament.

1.1.1. Définition d'un gel

En 1926, Dorothy Jordan Lloyd écrivait que les gels sont des systèmes colloïdaux plus faciles à reconnaître qu'à définir (1), mais elle se trompait. En effet, les recherches effectuées sur les gels ont montré qu'il ne s'agit pas toujours de systèmes colloïdaux comme nous le verrons dans ce chapitre. Actuellement, aucun consensus scientifique n'a été obtenu sur la définition appropriée d'un gel (2). La définition la plus généralement acceptée provient de Flory (1974) qui définit un gel comme un matériau dont la structure est continue et dont les dimensions macroscopiques demeurent stables dans le temps (contrairement à un liquide) (3). Les gels sont des systèmes constitués d'une petite quantité de solide (molécule gélifiante ou polymère) et d'une grande quantité de liquide (eau ou solvant organique), mais leurs caractéristiques s'apparentent davantage aux solides qu'aux

liquides. Les propriétés physiques des hydrogels sont similaires à celles du tissu vivant en raison de leur haute teneur en eau et de leur consistance caoutchouteuse.

En 1960, Wichterle et Lím ont proposé une application biomédicale aux hydrogels (4). Leurs travaux suggéraient pour la première fois l'utilisation d'un gel constitué d'un réseau hydrophile de poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) dans les verres de contact. Depuis, les hydrogels ont trouvé plusieurs applications dans les domaines pharmaceutique (5,6) et biomédical (6).

En présence de liquide, les matériaux polymères gonflent pour former un gel. Le médicament emprisonné dans le gel est relâché principalement par diffusion, résultant en une libération rapide (quelques heures généralement) de la totalité de du médicament. Dans le domaine médical, les gels sont utilisés pour l'acheminement des médicaments par différentes voies d'administration : orale, nasale, buccale, rectale, vaginale, oculaire et parentérale.

1.1.2. Les mécanismes de gélification

La formation d'un gel se fait par un processus d'auto-assemblage des molécules gélifiantes. La réticulation des gels peut être covalente, avec des liaisons covalentes s'établissant entre les molécules gélifiantes sous l'action d'un stimulus, telle la lumière (7). La réticulation des gels peut aussi être non covalente. Des interactions intermoléculaires physiques sont créées entre les molécules, notamment des ponts hydrogène, des interactions électrostatiques, des empilements π - π et des forces de Van der Waals. Les formes que peuvent adopter les molécules gélifiantes sont assez variées : fibres, rubans, brins ou encore microlamelles (2).

1.1.3. Les différents types de solutions gélifiantes

Les études récentes sur les gels ont permis le développement d'une multitude de systèmes qui répondent à des stimuli externes ou internes au corps humain, notamment suite à une variation de pH (8), la force ionique du milieu environnant (9) (internes), à l'application d'un champ magnétique (10) ou d'ultrasons (11) (externes). Ces derniers affectent la capacité de gonflement, la structure du réseau, la perméabilité ou encore la force mécanique du gel, ce qui se répercute sur le réseau

intermoléculaire et enfin sur la libération du médicament. Plusieurs gels forment des systèmes réversibles : ils retournent à l'état liquide lors de l'arrêt de l'application du stimulus.

Récemment, les solutions thermogélifiantes ont fait l'objet d'un intérêt croissant pour des applications pour la libération prolongée de médicament. Certains systèmes sont à l'état gel à température élevée alors que d'autres le sont à basse température. La suite de ce chapitre portera sur les grandes classes d'hydrogels et d'organogels.

1.2. Les hydrogels dans le domaine pharmaceutique

1.2.1. Les polysaccharides

Les polysaccharides font partie de la classe des glucides. Au niveau moléculaire, ils sont constitués d'un grand nombre d'unités saccharides (le glucose, le galactose et le mannose par exemple). Ce sont des molécules dites naturelles, car elles sont extraites d'éléments végétaux et animaux. Il existe une grande variété de ces biopolymères, mais seuls les polysaccharides thermosensibles seront abordés.

Pour certaines molécules (dont les polysaccharides), une augmentation de la température environnante provoque des changements abrupts de leur solubilité (point de trouble). À basse température, les interactions (ponts hydrogène et autres liaisons chimiques) entre les molécules de polysaccharides et le liquide sont dominantes. Une augmentation de la température (au-delà du point de trouble) brise ces interactions et les interactions polysaccharide-polysaccharide et liquide-liquide deviennent dominantes. Les molécules gélifiantes changent de conformation et repoussent le liquide dans lequel elles sont dissoutes.

En solution aqueuse, les polysaccharides forment un gel. À température élevée, ces polysaccharides adoptent une conformation aléatoire (figure 1.1. A). Lorsque la température est diminuée, les molécules vont se positionner les unes contre les autres de façon à former des hélices (figure 1.1. B) puis des cristallites, c'est-à-dire des régions microscopiques de matériau dans lequel des segments s'arrangent de façon parallèle (figure 1.1. C). Des points de jonction s'établissent dans les cristallites et le gel se forme par nucléation (12). La formation de tels gels est réversible.

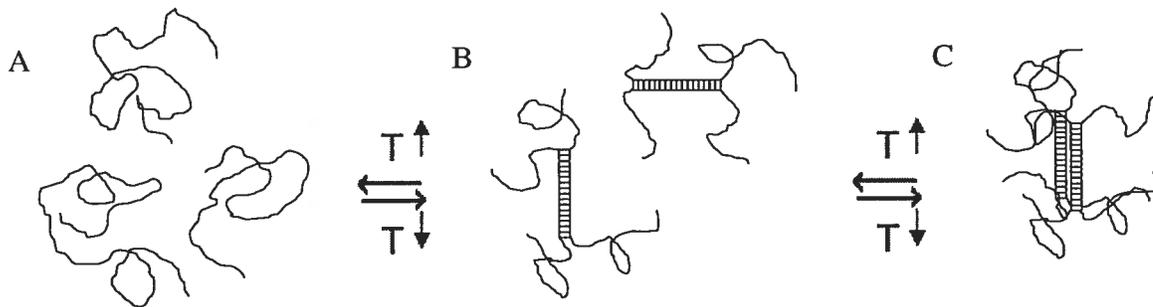


Figure 1.1. Le mécanisme de gélification des polysaccharides. Sous l'action de la chaleur, les polysaccharides (A) adoptent la forme d'hélice (B) puis des cristallites (C) avec des points de jonctions. Adapté de (13) avec la permission d'Elsevier.

La plupart des solutions aqueuses de polysaccharides forment des gels à basse température. Par contre, la cellulose et ses dérivés adoptent le comportement inverse (*i.e.* gel à température élevée, liquide à basse température). La cellulose est très peu soluble dans l'eau. Pour accroître sa solubilité, des fonctions hydrophiles sont ajoutées au cours de la synthèse de dérivés de cellulose. Lorsque la température de la solution augmente, le polymère est de moins en moins soluble dans l'eau et les interactions intermoléculaires deviennent dominantes, permettant de cette façon la formation d'un gel à température élevée. Par conséquent, l'ajout de fonctions hydroxyle sur la cellulose accroît sa solubilité et influence la température de transition liquide-gel. La méthyl cellulose et l'hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC) sont deux exemples typiques de polymères qui sont liquides à basse température, mais qui forment un gel à température plus élevée.

Paavola *et coll.* (1995) ont développé différentes formulations thermogélifiantes injectables à partir de dérivés de cellulose (méthylcellulose, HPMC, carboxyméthylcellulose) et de poloxamer 407 chargés en lidocaïne afin d'induire une anesthésie du nerf sciatique chez le rat (14). Parmi les différentes formulations évaluées, les gels de méthylcellulose ont offert le meilleur blocage moteur complet.

Le xyloglucan est un polysaccharide extrait des graines de tamarin. Il s'agit d'un mélange d'hepta/octa/nonasaccharides constitués d'unités glycane, xylose et galactoxylose. Le point de trouble d'une solution aqueuse de xyloglucan se situe entre 22 et 27°C ce qui rend sa manipulation parfois compliquée à température ambiante. Différentes voies d'administration ont été évaluées avec les gels de

xyloglucan : rectale, orale, oculaire et intrapéritonéale (15). En 1998, Suisha *et coll.* ont rapporté que des gels de xyloglucan chargés en mitomycine C (antibiotique antinéoplasique) pouvaient permettre le maintien des taux plasmatiques stables de ce médicament pendant trois heures par rapport à une solution de mitomycine (pic plasmatique étroit et clairance rapide, c'est-à-dire deux heures) (16).

1.2.2. Le poly (*N*-isopropylacrylamide)

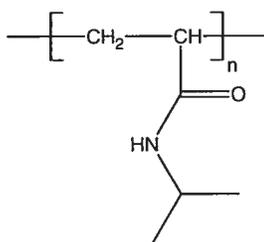


Figure 1.2. La structure moléculaire du poly(*N*-isopropylacrylamide).

Le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAM) est un polymère dont le point de trouble en solution aqueuse est de 32°C (figure 1.2). Cette solution peut facilement être injectée à température ambiante et former un gel à température corporelle, lequel peut servir de réservoir pour contenir un médicament qui sera libéré de façon prolongée. À l'inverse des polysaccharides, le PNIPAAM n'est pas biodégradable.

La température critique d'une solution de PNIPAAM peut être modulée en modifiant la structure chimique du polymère, notamment en incorporant des monomères qui ont une hydrophobie/hydrophilie différente du PNIPAAM tels l'alkyl méthacrylate, l'acrylamide, le *N*, *N'*-diméthylacrylamide et la *N*-acryloylpyrrolidine (17). Plus les monomères incorporés sont hydrophobes, plus la température critique de la solution diminue alors que les monomères hydrophiles exercent l'effet inverse.

En 1998, Han et Bae ont publié les résultats de leurs recherches sur un copolymère de poly(NIPAAM-*co*-acide acrylique) (18). En solution aqueuse, contrairement au NIPAAM qui précipite à température élevée, ce copolymère forme un gel opaque (entre 32 et 43°C). Ce gel s'avère thermoréversible. La gélification de la solution est attribuée à deux phénomènes : l'enchevêtrement des chaînes de polymères entre elles et des interactions physiques faibles. Par la suite, la même

équipe de recherche a proposé d'utiliser ce système pour en faire un pancréas artificiel rechargeable (19) : le gel est capable d'emprisonner des cellules d'îlots de Langerhans. Deux avantages sont tout de suite observés. Premièrement, le gel de poly(NIPAAM-co-acide acrylique) ne s'avère pas cytotoxique pour les cellules pancréatiques. Deuxièmement, le gel est très perméable au glucose du milieu externe et à l'insuline sécrétée par les cellules emprisonnées, assurant une réponse rapide en fonction du taux de glucose en circulation. Par contre, une telle application *in vivo* supposerait de remplacer régulièrement les cellules encapsulées dans le gel. Encore aujourd'hui, aucune étude n'a encore rapporté l'évaluation d'un tel système *in vivo*.

1.2.3. Les poloxamers et leurs dérivés

Les copolymères blocs poly(oxyde d'éthylène-*b*-oxyde de propylène-*b*-oxyde d'éthylène) (PEO-PPO-PEO) portent le nom de poloxamer et sont commercialisés sous le nom de Pluronic^{MC} (BASF). Ils sont d'ailleurs disponibles en une vaste gamme de masses molaires et de rapports PEO/PPO. Leur utilisation en tant que tensioactif non ionique est largement répandue dans le domaine de la libération prolongée. Les solutions aqueuses à base de poloxamer présentent un comportement thermogélifiant : elles sont à l'état liquide à basse température, mais forment un gel à température corporelle. De la même façon que le PNIPAAM, les poloxamers ne sont pas biodégradables.

Les molécules de poloxamer forment des micelles lorsque leur concentration excède la concentration micellaire critique (CMC). Au début des années 1990, des études ont permis d'élucider partiellement le mécanisme de gélification des poloxamers qui est demeuré longtemps controversé (20). En effet, à basse température, lorsque la concentration de tensioactif est supérieure à la CMC, les molécules qui forment les micelles sont en équilibre avec les unimères en solution. Par contre, lorsque cette solution est chauffée, l'équilibre tend à se déplacer vers la formation de micelles, de façon à réduire le nombre d'unimères seuls. Ainsi, le volume de la fraction micellaire (ϕ_m) augmente. Lorsqu'il atteint une valeur supérieure à 0.53, la solution devient à l'état gel en raison du compactage des micelles (21,22). Lorsque le système est chauffé davantage, le gel retourne à l'état

liquide, un phénomène dont le mécanisme demeure encore incompris. Selon Li *et coll.* (1997), ceci pourrait être dû à une contraction du bloc PEO de la couronne de la micelle et à une interaction de la chaîne de PEO avec le bloc PPO (23). Une autre hypothèse émise est que la liquéfaction du gel serait provoquée par un changement de la structure de la micelle en raison de la chaleur, passant d'une forme sphérique à cylindrique, libérant de ce fait les contraintes de compression (24).

Les propriétés de transition liquide-gel des solutions de poloxamer en font des systèmes injectables intéressants pour la formation de dépôt *in situ* assurant une libération prolongée de médicament. La plupart des matrices de ce type sont constituées de poloxamer 407 et assurent une libération de médicament pendant quelques heures. De façon générale, plus le gel est concentré en poloxamer, plus la libération est prolongée. D'autre part, l'ajout d'excipients permet de prolonger de quelques heures seulement le temps de libération du médicament.

En 2000, Lin et Sung ont évalué différents gels de poloxamer 407 et de carbomère (polymère d'acide polyacrylique), seuls ou en combinaison pour la libération intraoculaire de pilocarpine (25). *In vitro*, les gels de poloxamer-carbomère ont permis une libération prolongée de médicament supérieure à celle des gels de poloxamer ou de carbomère seul. *In vivo*, la pilocarpine administrée dans le gel de poloxamer-carbomère a induit une réponse pharmacologique (diminution du diamètre pupillaire) plus importante et une biodisponibilité supérieure par rapport à son administration dans les deux autres formulations, mais la durée d'action s'est avérée comparable. Malgré l'intérêt porté à ces gels, ils s'avèrent toxiques à concentration élevée (20%) en raison de leur pouvoir détersif résultant en une diminution de la pression intraoculaire et une destruction de la rétine (26).

D'autres voies ont été étudiées pour l'administration des gels de poloxamer : sous-cutanée, intra-musculaire, intra-péritonéale. Ricci *et coll.* (2005) ont étudié différents gels de poloxamer 407 pour la libération de lidocaïne et ont montré la biocompatibilité de ces gels en administration sous-cutanée chez le rat (27). Les études *in vitro* ont montré que l'ajout de poly(éthylène glycol) 400 accroît le coefficient de diffusion et accélère la libération de lidocaïne.

1.2.4. Les copolymères de poly(éthylène glycol) et poly(acide α -hydroxycarboxylique)

En 1997, Jeong *et coll.* ont proposé l'utilisation de copolymères triblocs de poly(oxyde d'éthyle-*b*-L-acide lactique-*b*-oxyde d'éthyle) (PEO-PLLA-PEO) pour la libération prolongée de médicament (28). En solution aqueuse, ce polymère forme un hydrogel thermoréversible : le système est à l'état gel à température intermédiaire et liquide à basse et haute températures comme observé pour le PEO-PLGA-PEO (figure 1.3). Plusieurs paramètres affectent le point de trouble et peuvent être ajustés pour moduler ce dernier : les masses molaires de PEO et de PLGA, le ratio d'acide lactique et d'acide glycolique dans le bloc central et la concentration du copolymère en solution. Une formulation de PEO-PLLA-PEO a été injectée chez l'animal pour s'assurer qu'elle forme un gel *in vivo*. Étant donné qu'elle était à l'état gel à température ambiante, la formulation devait être chauffée à 45°C avant d'être administrée à l'animal, ce qui rend l'injection douloureuse. Néanmoins, le système s'avère avantageux sur certains points tels que l'absence de solvant organique; de plus, sa biodégradabilité et sa non toxicité, toutes deux causées par l'utilisation de polymères biocompatibles, permettent d'éviter le retrait chirurgical de l'insert une fois la libération du médicament complétée.

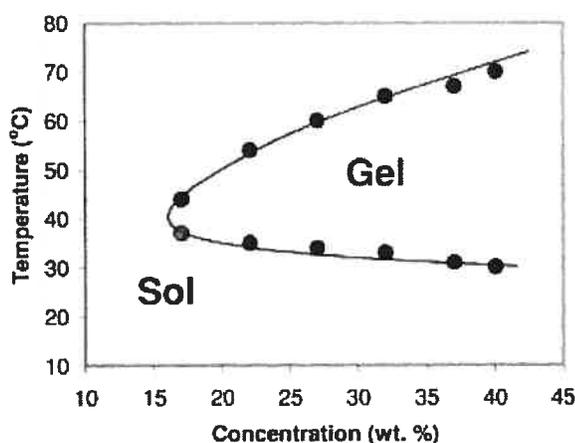


Figure 1.3. Le diagramme de phase du copolymère tribloc PEO-PLGA-PEO (550-2810-550) en solution dans l'eau. Reproduit avec la permission d'Elsevier (29).

Une nouvelle génération de copolymères triblocs a par la suite été produite en substituant le bloc central par du poly(D,L-acide lactique-co-glycolique) (PLGA) et

en diminuant les masses molaires des PEO terminaux, de façon à obtenir du PEO-PLGA-PEO (29). Le processus de gélification d'une solution aqueuse de ce copolymère tribloc est similaire à celui des poloxamers, c'est-à-dire une organisation micellaire du réseau.

Une série de copolymères triblocs de type BAB (PLGA-PEO-PLGA) a aussi été développée (30,31). De la même façon que son homologue ABA (PEO-PLGA-PEO), ce copolymère présente un comportement thermogélifiant en solution aqueuse. Cependant, les résultats de Lee *et coll.* (2001) soutiennent que le mécanisme de gélification des copolymères triblocs de type BAB serait distinct du type ABA en raison des blocs PLGA en bout de chaîne qui participeraient à la formation de plusieurs micelles à la fois (30). Les formulations de PLGA-PEO-PLGA, qui sont à l'état liquide à basse température (<10°C), forment un gel à 37°C et retournent à l'état liquide à température élevée (>50°C, précipitation du polymère). À l'état liquide, la viscosité de ces formulations est assez faible pour permettre une injection facile à l'aide d'une aiguille de calibre 25G. Ces formulations s'avèrent prometteuses à plusieurs points de vue : les matrices de copolymères sont biodégradables, biocompatibles et sont exemptes de solvant organique, assurant une libération de médicament pendant plusieurs semaines. De plus, certains systèmes peuvent accroître la solubilité de médicaments hydrophobes de 400 à 2000 fois en milieu aqueux (31).

Les copolymères triblocs de type PLGA-PEO-PLGA ont fait l'objet de quelques études de libération prolongée *in vitro* et *in vivo* avec des médicaments à la fois hydrophobes (le paclitaxel notamment) et hydrophiles (le peptide mimétique du glucagon-1 ou « *glucagon-like peptide-1* » [GLP-1]) (32). Le ReGel^{MC} (OncoGelTM) est une formulation constituée d'un copolymère tribloc PLGA-PEO-PLGA (23% *p/p* en solution aqueuse) et de paclitaxel (31). Ce gel libère le médicament pendant plus de sept semaines *in vitro*. Administrée par la voie intratumorale chez des souris de génotype Nu/Nu (*nudes*), le paclitaxel est libéré sur une période de six semaines. Le système ReGel^{MC} a aussi été évalué pour traiter le diabète de type 2 chez des rats diabétiques Zucker à l'aide du GLP-1. Le peptide a permis le contrôle des taux d'insuline (et de glucose) pendant deux semaines. Contrairement à plusieurs types de

formulations, le système ReGel^{MC} offre l'avantage de ne pas présenter de libération massive de médicament suivant son injection *in vivo*, ce qui pourrait autrement s'avérer fatal dans le traitement du diabète (33).

1.3. Les organogels dans le domaine pharmaceutique

Un organogel se définit comme un matériau d'aspect liquide ou solide, constitué d'un solvant organique dans lequel est dissoute une molécule de faible masse moléculaire qui assure sa gélification. De façon générale, les organogélifiants ont la capacité de gélifier le solvant à des concentrations inférieures à 2%.

Les organogels sont des matériaux thermosensibles. Ils sont préparés en dissolvant à chaud la molécule gélifiante dans un solvant organique approprié. Une fois complètement dissous, le matériau retourne en phase gel lorsqu'on le refroidit à une température inférieure à sa température de transition.

Les études réalisées sur les organogels sont de plus en plus nombreuses. Cependant, la communauté scientifique ne parvient pas à établir les généralités sur les organogels, notamment sur les caractéristiques structurales requises pour conférer à une molécule son pouvoir gélifiant et sur l'influence de la formation du réseau sur les propriétés physico-chimiques du gel.

1.3.1. Les différentes classes d'organogélifiants

Gronwald *et coll.* (2002) classent les organogélifiants en deux catégories selon qu'ils établissent ou non des ponts hydrogène entre eux (34). Le processus de gélification de solvant organique qui s'opère par des ponts hydrogène est le mieux compris. Cette première catégorie regroupe des dérivés d'amide (35), dont les acides aminés (36), d'urée (37) et de certains saccharides. L'autre catégorie regroupe des organogélifiants qui permettent la gélification de solvant organique au moyen d'empilement π - π et par effet solvophobe. Dans ce cas, le processus de gélification de ces molécules est moins bien compris que celui de la première catégorie. Ces organogélifiants sont des dérivés d'anthracène, d'antraquinone (38,39) de tétraline

et de stéroïde (40). Il existe aussi certains organogélifiants que l'on pourrait qualifier d'hybrides, c'est-à-dire que leur processus de gélification du solvant s'opère à la fois par des ponts hydrogène et des empilements π - π . C'est notamment le cas des dérivés *p*-phénylènevinylène (41). La présente section sur les classes d'organogélifiants passera en revue les différents types de ces dérivés.

En 2001, Bhattacharya et Krishnan-Ghosh ont publié une étude sur la capacité d'un dérivé de l'alanine (*N*-lauroyle-L-alanine) de gélifier de façon spécifique différents solvants organiques (42). Le processus de gélification implique l'établissement de ponts hydrogène et d'interactions de Van der Waals. D'autres dérivés d'acides aminés présentent le même comportement, notamment des dérivés de phénylalanine (43), de sérine (44), de glutamine (45), de lysine (46) ainsi que divers cyclodipeptides. En 2004, notre groupe de recherche a publié deux études inspirées des résultats de Bhattacharya et Krishnan-Ghosh; ces travaux ont montré que les dérivés d'alanine gélifient des huiles pharmaceutiques et forment des gels biocompatibles *in vivo* (36,47). L'année suivante, nous avons prouvé que ces gels peuvent être utilisés chez le rat pour la libération prolongée de leuprolide pendant près d'un mois (48).

Une autre classe d'organogélifiants regroupe des dérivés urée. La gélification de solvant organique est causée par l'établissement de ponts hydrogène par la portion urée de la molécule. Wang et Hamilton (2002) ont synthétisé une série de dérivés urée capables de gélifier des solvants polaires ou non polaires à très faible concentration (44). En 2004, Suzuki *et coll.* ont développé certains dérivés urée qui sont des organogélifiants : la molécule est ajoutée au solvant organique et un gel se forme en quelques secondes (49). Ce type d'organogélifiant présente plusieurs avantages : il ne requiert pas d'étape de chauffage, il forme un gel à température ambiante et la gélification est obtenue presque instantanément.

Les dérivés saccharides constituent une autre classe qui se caractérise par son fort pouvoir gélifiant. Des recherches menées par Luboradzki *et coll.* en 2000 ont montré que les dérivés de saccharides méthyl 4,6-*O*-*p*-nitrobenzylidène- α -D-galactopyranoside et méthyl 4,6-benzylidène- α -D-mannopyranoside permettent la gélification de solvants apolaires (n-hexane, n-heptane, n-octane, n-décane,

cyclohexane) et ce, à très faible concentration (0.9-2.48 mM) (50), la concentration la plus faible rapportée dans la littérature. De façon générale, la concentration minimale pour assurer la gélification d'un solvant est de 3 à 15 mM. Ces molécules sont souvent qualifiées de « supergélifiant ».

En 1996, une étude de Mukkamala et Weiss a évalué la capacité de gélification de solvant organique par une série de molécules (ACS) porteuses de dérivés anthraquinone (A) et stéroïde (S) reliés ensemble par une chaîne alkyle (C) (51). Sur la base des études de température de gélification, ils ont pu déterminer que la présence de certaines interactions accroissait la stabilité des gels. De façon générale, les dérivés ACS forment un gel dans le solvant organique via des interactions de Van der Waals. Par contre, lorsque ces dérivés peuvent établir en plus des ponts hydrogène avec le solvant, la température de transition est accrue.

Les organogélifiants ont donc des structures moléculaires variées et ne partagent pas nécessairement de fonctions chimiques semblables. Ainsi, la découverte d'organogélifiant est souvent fortuite. Des modifications dans la structure chimique d'un organogélifiant, aussi minimes soient-elles, peuvent entraîner des répercussions importantes sur ses capacités gélifiantes (51,52). En 2005, de Loos *et coll.* ont publié une étude qui montre qu'une modification mineure dans la structure chimique d'un organogélifiant modifie radicalement ses capacités de gélification (53). En effet, le simple ajout d'un groupement hydrophile (fonction hydroxyle) sur la molécule a été suffisant pour lui faire perdre sa capacité de gélifier des solvants organiques. En revanche, cela lui a permis de gélifier l'eau afin de former des hydrogels. De plus, il est impossible de prédire quels solvants organiques peuvent être gélifiés par des organogélifiants, car la liste est souvent longue et diversifiée. Par exemple, certains dérivés stéroïdes peuvent former des gels physiques à la fois dans des solvants toxiques (le toluène), des alcools (l'éthanol) et des huiles (l'huile de silicone) (51). Finalement, certaines molécules peuvent gélifier à la fois des solvants organiques et de l'eau (53,54,55) ; cette propriété est souvent perdue chez des dérivés de ces gélifiants. Pour l'instant, les recherches actuelles ne permettent pas de prédire la formation d'un gel, dans un solvant organique comme dans l'eau.

1.3.2. Les applications des organogels pour la libération prolongée de médicament

La section précédente a passé en revue les différents types d'organogélifiants. Le pouvoir gélifiant de ces molécules permet des applications dans différents domaines, notamment en cosmétologie, dans l'industrie alimentaire, dans la fabrication de graisses lubrifiantes (56) et comme matrice pour la synthèse de nouvelles structures organiques et inorganiques (57,58). Depuis quelques années, plusieurs études rapportent l'utilisation des organogels pour la libération prolongée de médicaments. Cette dernière application fera l'objet de la présente section.

Plusieurs recherches témoignent de l'utilisation des organogels en application topique pour la libération transdermique de médicament. Au début des années 1990, Willmann *et coll.* ont suggéré l'utilisation d'organogels de lécithine pour la libération de scopolamine (antinauséux et anti-vomitif) et de broxatérol (antiasthmatique) (59,60). Le mélange de lécithine et d'isopropylpalmitate devient à l'état gel en présence d'une très petite quantité d'eau. Ce gel est transparent, thermoréversible, isotrope et biocompatible. Appliqué sur un échantillon de peau (dans une cellule à diffusion), il augmente et accélère le transport de médicament par rapport à une solution aqueuse de scopolamine/broxatérol ou encore au timbre commercial de scopolamine (Scopoderm^{MC} TTS 1.5).

Un autre type d'organogel, constitué exclusivement de tensioactif non ionique, pourrait aussi être utilisé pour des applications topiques de médicament (61,62). Des gels à base de monostéarate de sorbitane (Span^{MC} 60), de polysorbate 20 (Tween^{MC} 20) et de polysorbate 80 (Tween^{MC} 80) qui sont à l'état liquide à température élevée (> 60°C) forment des gels opaques à température ambiante. En 2004, Jibry et Murdan ont rapporté que ces gels n'induisent pas d'irritation cutanée chez la souris et l'humain (61). Aucune étude n'a rapporté jusqu'à présent l'évaluation *in vivo* de tels systèmes en application topique en présence de médicament. Par contre, la même équipe de recherche a évalué ces gels pour une administration orale de cyclosporine A (immunosuppresseur) chez le chien et a remarqué que la formulation libère le médicament sur une période de 24 heures (63).

En 2005, Pénzes *et coll.* ont rapporté que des organogels constitués d'esters d'acides gras (organogélifiant, solide) et de Mygliol^{MC} 812 (huile pharmaceutique, ester d'acide gras à l'état liquide) permettent la libération transdermique de piroxicam (anti-inflammatoire non-stéroïdien) chez le rat (64). L'étude a montré que ces gels ont un potentiel anti-inflammatoire et qu'ils peuvent réduire un œdème induit artificiellement.

Vers la fin des années 90, Murdan *et coll.* proposaient l'utilisation d'organogels de tensioactifs non ioniques comme insert pour la libération prolongée de médicament. Les gels de Span^{MC} 60 et Tween^{MC} 20 dans l'hexadécane ou l'isopropyl myristate sont à l'état liquide à température élevée (> 60°C), mais forment un gel semi-solide blanc lorsqu'ils sont refroidis à température ambiante (65,66). Dans un premier temps, des niosomes (petites vésicules de surfactant non ionique) chargés en albumine bovine sérique radioactive sont préparés puis incorporés à chaud à l'organogel. Une fois refroidie, la formulation a été injectée chez des souris par la voie intramusculaire. *In vivo*, les fluides interstitiels pénètrent dans l'insert et contribuent à émulsifier le gel en surface (67) lequel s'érode rapidement et libère tout son contenu en albumine en deux jours (66).

Récemment, de nouveaux organogélifiants, tous dérivés de l'acide aminé L-alanine, ont été synthétisés (36,47). On rapporte la capacité de ces molécules de gélifier différentes huiles pharmaceutiques (notamment les huiles de soja et de carthame). Le mélange d'organogélifiant et d'huile pharmaceutique forme un gel à basse température et devient liquide lorsqu'il est chauffé. Le type d'huile pharmaceutique, la concentration et le type d'organogélifiant en solution sont trois paramètres qui modulent la température de transition gel-liquide. L'ajout d'un solvant organique hydrophile dans la matrice permet d'inhiber partiellement le phénomène de gélification à température ambiante et d'autoriser l'injection de la formulation. Couffin-Hoarau *et coll.* (2004) ont exploité le caractère thermoréversible de ces organogels pour en faire une matrice injectable pour la libération prolongée de médicament (36). Des expériences *in vitro* montrent que les organogels de L-alanine peuvent libérer du dextran (couplé à de l'isothiocyanate de fluorescéine) pendant une période de plus de trois semaines, ce qui témoigne de leur

avenir prometteur en tant que système pour la libération prolongée de médicament. En 2005, Motulsky *et coll.* ont publié des résultats sur la caractérisation de six molécules dérivées de la L-alanine. Les études *in vivo* (chez le rat) témoignent non seulement de la biocompatibilité de ces organogels, mais montrent qu'ils peuvent persister plus de huit semaines chez l'animal (47).

Le travail exécuté dans le cadre de cette maîtrise en sciences pharmaceutiques consistait à tester l'utilisation d'organogels pour assurer une libération prolongée de médicament. Le leuprolide a été retenu comme principe actif modèle et fera l'objet du prochain chapitre d'introduction. Dans un premier temps, quelques notions clés d'endocrinologie seront rappelées puis le leuprolide fera l'objet de la seconde section du chapitre.

CHAPITRE 2. Le leuprolide en tant qu'agent thérapeutique

2.1. Notions d'endocrinologie : les hormones sexuelles

Le leuprolide est un agoniste puissant de la gonadolibérine (ou gonadoréline), une hormone sexuelle sécrétée par l'hypothalamus. Pour mieux comprendre l'action pharmacologique de ce médicament dans le cadre d'un traitement anticancéreux, quelques notions d'endocrinologie seront d'abord rappelées.

2.1.1. L'hypothalamus et l'hypophyse : un rappel anatomique et endocrinien

L'encéphale se subdivise en six parties : le télencéphale, le diencéphale le mésencéphale, la protubérance, le bulbe rachidien et le cervelet (figure 2.1. B). L'ensemble formé par le télencéphale et le diencéphale est appelé le prosencéphale. Le mésencéphale, la protubérance, le bulbe rachidien et le cervelet forment le tronc cérébral. À la base du prosencéphale se trouve l'hypothalamus (figure 2.1. A). Il s'agit d'une structure cérébrale qui joue un rôle fondamental dans l'intégration de plusieurs mécanismes fondamentaux. L'hypothalamus crée un lien entre les fonctions nerveuses et endocriniennes, notamment celles qui participent à l'homéostasie. En bref, l'hypothalamus assure la régulation du lobe antérieur de l'hypophyse, du bilan hydrique, du système nerveux végétatif, des sensations de faim et de soif, des appareils reproducteurs et de la température corporelle. De plus, il engendre les rythmes circadiens, assure leur régulation puis finalement participe à la formation des comportements émotifs (68).

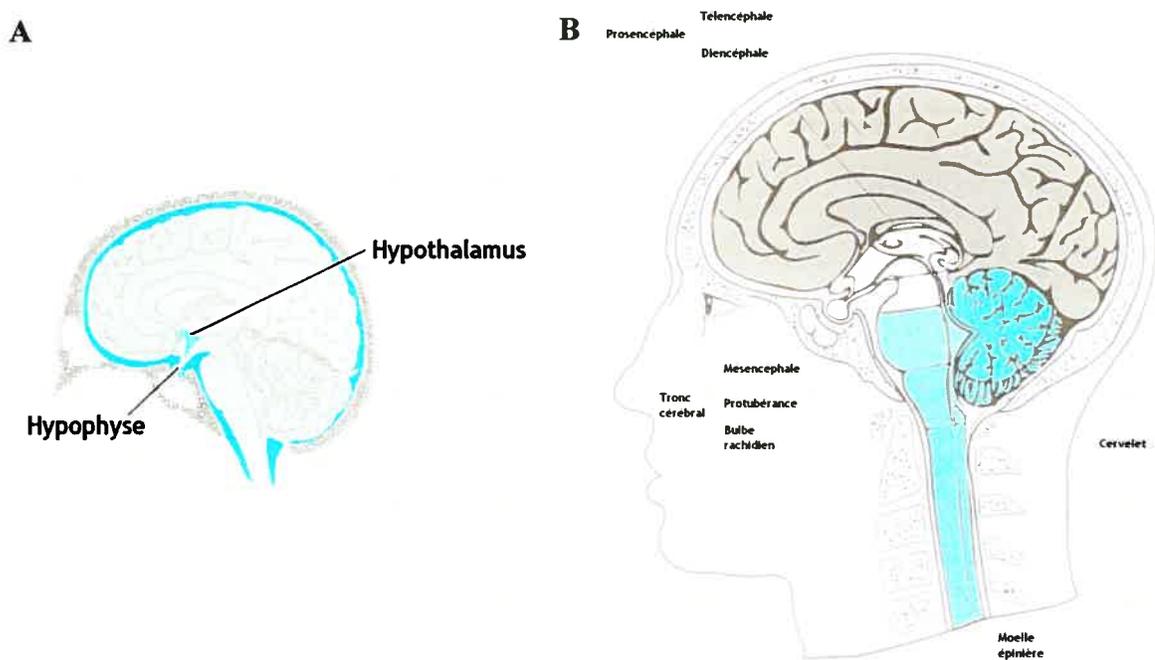


Figure 2.1. A. La localisation de l'hypophyse et de l'hypothalamus et B. les différentes parties du cerveau. Avec la permission de (68).

L'hypothalamus régule et sécrète plusieurs hormones, parmi lesquelles la gonadolibérine (FSH/LH-RH aussi dénommée GnRH pour « *gonadotropin releasing hormone* »), le sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHRH, « *growth hormone releasing hormone* »), la somatostatine, la thyrolibérine (TRH, « *thyrotrophin releasing hormone* »), la dopamine et la corticolibérine (CRH, « *corticotropin releasing hormone* »). Ces hormones sont regroupées sous la catégorie des hormones hypothalamo-hypophysaires, car leurs actions sont destinées au lobe antérieur de l'hypophyse. À l'exception de la dopamine (catécholamine), ces hormones sont des peptides. L'hypothalamus sécrète aussi des hormones qui agiront sur la posthypophyse (aussi appelée neurohypophyse) (voir plus bas) (68).

L'hypophyse se trouve dans une cavité osseuse à la base de l'encéphale, tout juste sous l'hypothalamus. L'hypothalamus et l'hypophyse sont reliés ensemble par une tige qui porte le nom d'infundibulum (figure 2.2). Ce dernier contient des fibres nerveuses et de petits vaisseaux sanguins. Chez l'adulte, l'hypophyse se compose de deux lobes : le lobe antérieur (aussi appelé adénohypophyse ou antéhypophyse) et le lobe postérieur qui, avec une partie de l'infundibulum, forme la posthypophyse.

L'hypothalamus et le lobe antérieur de l'hypophyse sont reliés par un système de petits vaisseaux sanguins appelé vaisseaux portes hypothalamo-hypophysaires. Ces capillaires constituent une voie de communication directe pour la circulation d'hormones sécrétées par l'hypothalamus et dirigées vers l'hypophyse (69).

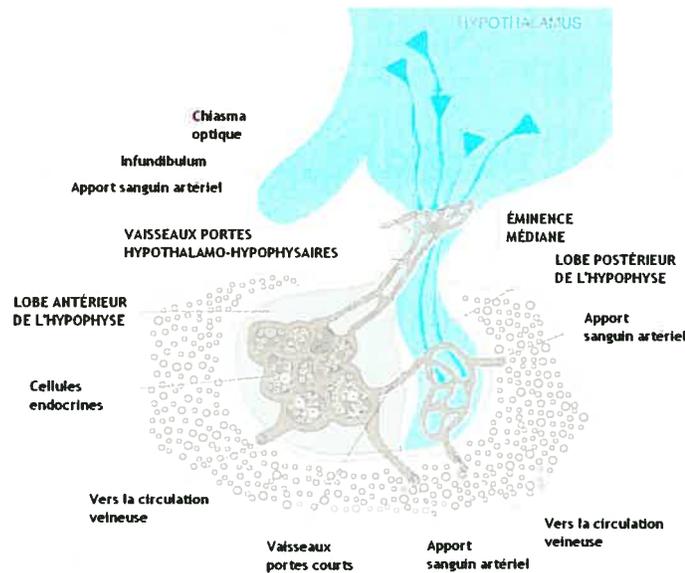


Figure 2.2. Le système porte hypothalamo-hypophysaire. Avec la permission de (68).

Le lobe postérieur de l'hypophyse est constitué de tissu nerveux. Il s'agit en fait d'une excroissance de l'hypothalamus : les axones tirent leur origine de l'hypothalamus, passent par l'infundibulum et se terminent dans le lobe postérieur de l'hypophyse. Les terminaisons axonales se trouvent à proximité des capillaires du système porte décrit plus haut. Étant de nature structurale différente, les deux lobes de l'hypophyse fonctionnent de manière indépendante, comme s'il s'agissait en fait de deux glandes différentes (68).

Selon les signaux qu'elle reçoit notamment de l'hypothalamus, mais aussi des hormones circulant dans le système sanguin, l'hypophyse régule la sécrétion de plusieurs hormones. Le lobe antérieur est en charge de la synthèse et de la régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH, « *growth hormone* »), de la thyrotrophine (TSH, « *thyrotropin* »), de l'hormone corticotrope (ACTH, « *adrenocorticotrophic hormone* »), de la prolactine, des hormones gonadotropes soit la folliculostimuline (FSH, « *follicle-stimulating hormone* ») et l'hormone

lutéinisante (LH, « *luteinizing hormone* »), et de la β -lipotropine. Le lobe postérieur, quant à lui, synthétise et régule la sécrétion d'ocytocine, de la vasopressine, de la dopamine et du facteur de libération de la prolactine, des hormones que l'on regroupe, de façon erronée, sous l'appellation d'hormones post-hypophysaires (compte tenu que le lobe postérieur de l'hypophyse est en réalité un prolongement de l'hypothalamus, ce sont plutôt des hormones produites dans les corps cellulaires des neurones de l'hypothalamus) (68).

Les hormones hypothalamo-hypophysaires ont un mode d'action semblable en cascade. À l'exception de la dopamine, elles sont à la tête d'une série de trois hormones. En effet, les hormones hypothalamo-hypophysaires régulent la sécrétion d'une seconde hormone sécrétée par le lobe antérieure de l'hypophyse. Cette seconde hormone contrôle la sécrétion d'une troisième hormone par une glande endocrine, notamment les gonades, le foie et la thyroïde. Cette troisième hormone agit sur les cellules cibles de l'organisme. Les deuxième et troisième hormones peuvent exercer, lorsque leur concentration plasmatique est trop élevée, des effets rétroactifs négatifs sur la cascade hormonale. De cette façon, la sécrétion d'hormones par le lobe antérieur de l'hypophyse est régulée principalement par les hormones hypothalamo-hypophysaires, mais d'autres facteurs ont aussi le pouvoir d'intervenir dans ce processus de régulation. Par exemple, les œstrogènes augmentent la sécrétion de prolactine par le lobe antérieur de l'hypophyse (69).

2.1.2. Les hormones sexuelles chez l'homme et la femme : terminologie et fonctions

L'hypothalamus joue un rôle clé dans le contrôle de la cascade hormonale évoquée dans la section précédente. En ce qui a trait aux hormones sexuelles, cette cascade tri-hormonale débute avec la GnRH, une hormone constituée de 10 acides aminés. Des potentiels d'action dans les cellules neuroendocriniennes de l'hypothalamus déclenchent la libération de GnRH de façon pulsatile (toutes les deux heures environ). Ce mode de sécrétion est important, car des niveaux élevés et constants de GnRH entraîneraient une régulation à la baisse ou une désensibilisation des récepteurs de GnRH (69).

Une fois sécrétée par l'hypothalamus, la GnRH emprunte les vaisseaux sanguins hypothalamo-hypophysaires et atteint le lobe antérieur de l'hypophyse. Elle se lie alors sur des récepteurs de GnRH localisés à la surface des cellules de l'hypophyse; cette liaison déclenche la sécrétion de deux gonadotrophines : la FSH et la LH, deux glycoprotéines de 30 kDa. Chez l'homme, la LH agit à titre de premier stimulus pour la sécrétion de testostérone tandis que la FSH est principalement responsable de stimuler la spermatogenèse. Chez la femme, ces deux hormones varient constamment et de façon reproductible d'un cycle menstruel à l'autre, et sont responsables de tous les changements ovariens qui surviennent au cours des cycles. Ainsi, ces hormones circulent dans le sang et agissent au niveau des gonades où elles influencent la sécrétion d'hormones sexuelles (androgènes et œstrogènes). Ces dernières agissent à leur tour sur les gonades elles-mêmes, sur toutes les portions du système reproducteur et sur d'autres organes du corps humain. Les hormones sexuelles stéroïdiennes exercent aussi une rétroaction positive ou encore négative sur la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus et de FSH et de LH par l'hypophyse. Par exemple, chez l'homme, lorsque survient une sécrétion importante de testostérone, la sécrétion hypothalamique de GnRH et la sécrétion de LH et de FSH par l'hypophyse antérieure sont freinées par rétroaction négative. Dans le cas contraire, de faibles taux plasmatiques de testostérone stimulent la sécrétion de GnRH et de LH/FSH par l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure respectivement. Ces mécanismes de rétroactions négative et positive visent à rétablir les taux plasmatiques hormonaux à la normale (68).

Une autre hormone protéique est sécrétée par les gonades, soit l'inhibine. Cette dernière entraîne une rétroaction négative de FSH principalement, mais aussi de LH dans une moindre mesure, sur le lobe antérieur de l'hypophyse. La figure 2.3 résume l'ensemble de cette cascade hormonale (68).

Les androgènes évoqués ci-dessus font partie d'une classe de molécules appelées stéroïdes. La testostérone et la dihydrotestostérone (DHT) sont toutes deux des androgènes. Les testicules produisent de grandes quantités de testostérone tandis que le cortex surrénal produit d'autres androgènes moins puissants. D'ailleurs, une insuffisance en testostérone causée par une dysfonction des testicules ou encore un

traitement ciblant ces derniers affecterait l'intégrité des fonctions reproductrices mâles qui ne pourraient être recouvertes par le travail seul des androgènes du cortex surrénal. Les œstrogènes, quant à elles, sont un groupe d'hormones stéroïdiennes parmi lesquelles on compte l'œstradiol. Cette dernière est sécrétée par les ovaires (69).

Les fonctions sexuelles de reproduction sont donc orchestrées par un ensemble d'hormones. Leur quantité et le profil de leur sécrétion varient au cours des différentes étapes du développement sexuel de la femme et de l'homme. Cependant, une modification de cette cascade hormonale, si minime soit elle, peut entraîner des conséquences importantes sur le maintien du fonctionnement du système reproducteur. Ces dérèglements et les moyens pour les traiter seront discutés plus loin dans la section 2.2.3 (page 33).

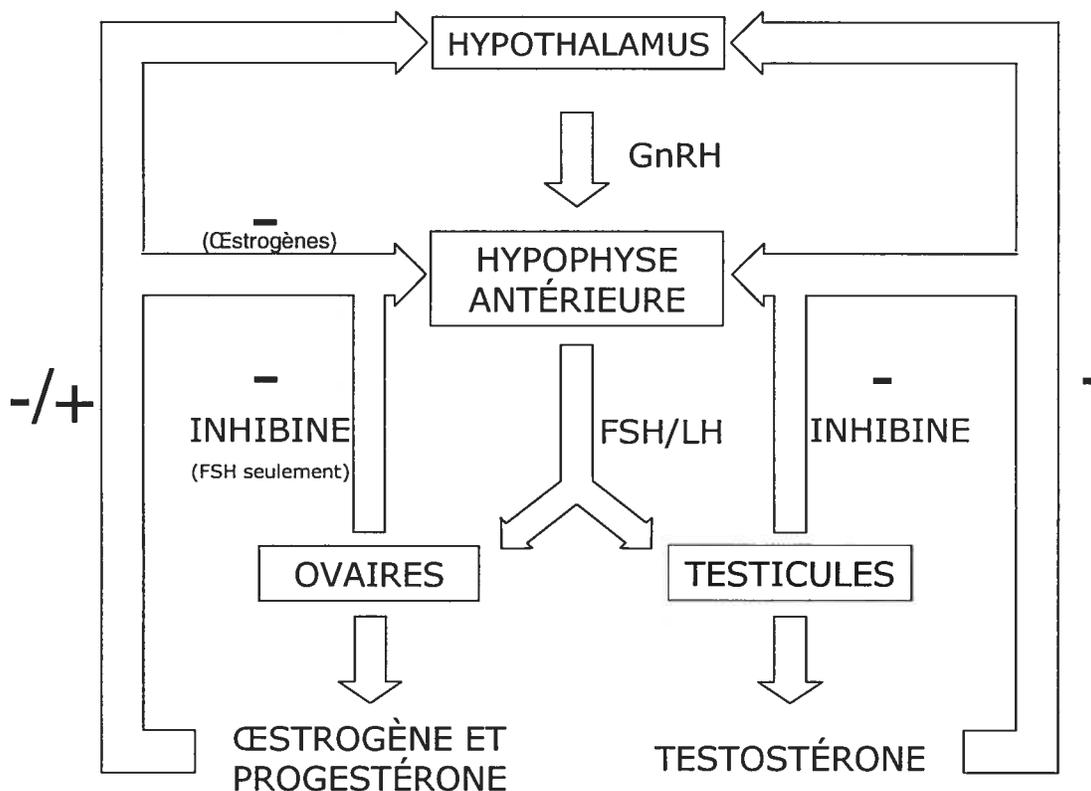


Figure 2.3. La régulation des hormones sexuelles chez la femme et chez l'homme.

2.1.2.1. Les rôles de la testostérone dans le développement des caractères sexuels chez l'homme

Tel que mentionné auparavant, les testicules et, de façon beaucoup moins importante, les glandes surrénales sont responsables de la sécrétion des hormones sexuelles mâles aussi appelées androgènes. Ces derniers regroupent la testostérone, la DHT et l'androstènedione (figure 2.4). Une partie importante de la testostérone sécrétée est éventuellement transformée en DHT dans les cellules cibles. Qu'ils soient produits par les testicules ou par la glande surrénale, les androgènes sont synthétisés à partir de molécules de cholestérol ou d'acétyl coenzyme A.

Les cellules de Leydig représentent environ 20% de la masse des testicules. Sous l'action de la LH, ces cellules sécrètent de la testostérone. Les cellules de Leydig sont présentes chez le bébé et sécrètent beaucoup de testostérone à la naissance pendant les premiers mois de la vie du nouveau-né, mais deviennent presque inexistantes chez l'enfant. Par contre, les cellules de Leydig redeviennent présentes et actives chez l'homme après la période de puberté. Lorsqu'une tumeur se développe au niveau des cellules de Leydig, ces dernières sécrètent des quantités encore plus considérables de testostérone.

La testostérone agit principalement sur la spermatogenèse par action paracrine à l'intérieur des testicules. Elle exerce aussi une rétroaction négative sur l'hypothalamus et sur le lobe antérieur de l'hypophyse (figure 2.3). De plus, la testostérone agit sur les organes reproducteurs annexes, notamment sur la croissance des canaux, des glandes et du pénis. À l'âge adulte, une castration engendre une diminution de la taille des organes reproducteurs annexes, une réduction des taux de sécrétion des glandes et une diminution de l'activité des muscles lisses des canaux. D'ailleurs, elle peut entraîner une déficience de l'érection et de l'éjaculation.

En plus de stimuler le développement des caractères sexuels primaires, la testostérone est aussi responsable du développement des caractères sexuels secondaires : la croissance des poils de la barbe et des poils axillaires et pubiens, la mue de la voie, la distribution caractéristique du tissu adipeux, l'épaississement général de la peau, la sécrétion augmentée de sébum (sous l'influence des androgènes) des glandes sébacées prédisposant à l'acné. La testostérone agit aussi

indirectement sur la croissance corporelle. En effet, elle stimule la sécrétion de GH, laquelle agira sur la croissance osseuse. Cependant, la testostérone peut aussi stimuler l'interruption de la croissance osseuse en provoquant l'ossification des cartilages de conjugaison. De plus, la testostérone comporte des effets anabolisants.

Mentionnons finalement que la testostérone est responsable du maintien des pulsions sexuelles, elle favorise les comportements agressifs et est nécessaire à l'expression du gène du type commun de calvitie chez l'homme. Chez les hommes recevant des injections de testostérone, il en résulte une augmentation de l'activité métabolique et une augmentation du nombre d'érythrocytes.

2.1.2.2. L'action moléculaire de la testostérone

Pendant plusieurs années, le modèle pour étudier l'action moléculaire de la testostérone était composé de cellules de prostate en culture. Les chercheurs y ont observé les effets anabolisants de la testostérone. En effet, de par sa nature lipophile, cette hormone pénètre dans les cellules prostatiques quelques minutes seulement après sa sécrétion par les testicules. Elle subit ensuite l'action de la 5α -réductase qui la convertit en DHT, la forme sous laquelle l'hormone sera active dans ce type cellulaire. La DHT se lie ensuite à une protéine de liaison cellulaire et ce complexe migre jusqu'au noyau de la cellule de façon à induire la transcription de l'acide désoxyribonucléique (ADN) en acide ribonucléique (ARN). Les chercheurs ont observé que la testostérone induit une augmentation de l'activité de l'ARN polymérase et un accroissement de la transcription, 30 minutes après avoir pénétré dans la cellule prostatique. Il s'ensuit alors une augmentation de la quantité de protéines produites par la cellule, d'où ses effets anabolisants. Plus spécifiquement, dans les cellules de la prostate, la testostérone stimule la synthèse protéique des enzymes qui catalysent la formation des sécrétions prostatiques.

Chez d'autres cellules cibles (notamment dans l'encéphale), la testostérone est transformée cette fois en hormone sexuelle femelle, l'œstradiol. Ces hormones sont illustrées à la figure 2.4.

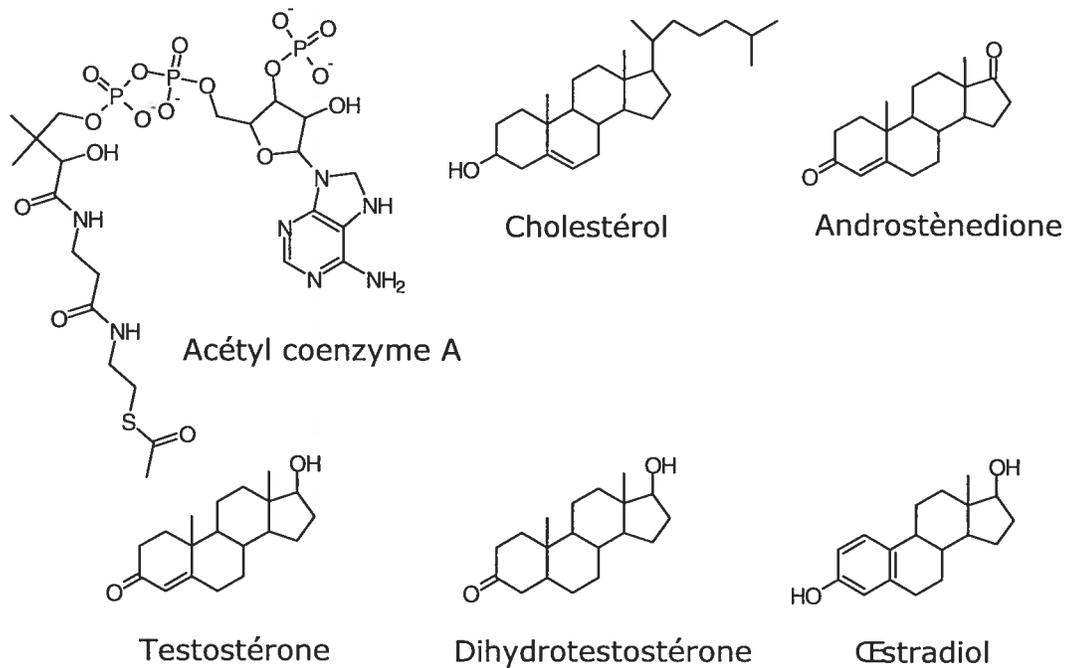


Figure 2.4. La structure chimique des androgènes et de leurs précurseurs (acétyl-CoA et cholestérol).

2.1.2.3. Les rôles des œstrogènes et de la progestérone chez la femme

Si les androgènes exercent chez l'homme des effets nombreux et variés, il en va de même pour les œstrogènes et la progestérone chez la femme. Tout comme les androgènes, ces hormones ont des effets non seulement sur le système endocrinien, mais aussi sur le développement des caractères sexuels et d'autres effets systémiques.

Les œstrogènes regroupent différentes hormones stéroïdiennes parmi lesquelles on retrouve l'œstradiol, l'œstrone et l'œstriol (figure 2.5). Les œstrogènes sont surtout sécrétés par les ovaires, mais chez la femme enceinte, le placenta en sécrète d'importantes quantités. Les ovaires produisent aussi l'œstrone, mais cette hormone est surtout sécrétée par les cellules de la thèque et celles du cortex surrénalien. L'œstriol est un produit d'oxydation de l'œstradiol et de l'œstrone. La réaction d'oxydation survient au niveau du foie. L'œstradiol a un pouvoir œstrogénique 12 fois supérieur à celui de l'œstrone et 80 fois supérieur à celui de l'œstriol.

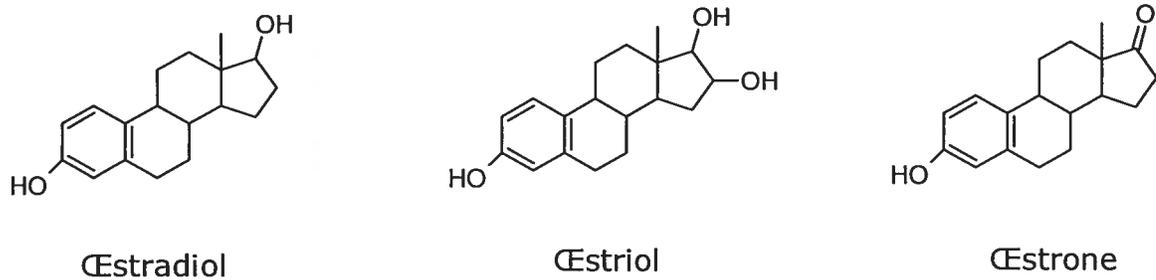


Figure 2.5. La structure chimique des principaux œstrogènes.

Au niveau somatique, les œstrogènes jouent plusieurs rôles. Ces hormones contribuent au développement des caractères sexuels et morphologiques : la croissance des organes génitaux externes (les seins et leurs canaux), les ovaires, la stimulation de la croissance des poils axillaires et pubiens, les épaules étroites, les hanches larges et la distribution caractéristique des graisses. Elles stimulent aussi les sécrétions plus liquides par les glandes sébacées, d'où leur effet antiacnéique. Au niveau somatique, les œstrogènes stimulent la croissance osseuse et son interruption au moment opportun en permettant au processus d'ossification des cartilages de conjugaison d'avoir cours. Elles protègent aussi contre l'ostéoporose. Les œstrogènes possèdent d'autres effets, notamment au niveau vasculaire (une carence en œstrogène se traduit par des bouffées de chaleur) et offrent une protection contre le développement de l'athérosclérose.

Ces hormones possèdent de nombreux rôles au niveau endocrinien. Elles induisent entre autres la stimulation de la sécrétion de prolactine et exercent des effets rétroactifs positifs ou négatifs sur l'hypothalamus et sur le lobe antérieur de l'hypophyse. Au début et au milieu de la phase folliculaire du cycle menstruel, les concentrations plasmatiques d'œstrogènes sont faibles. Ces hormones exercent alors des effets rétroactifs négatifs sur l'hypophyse antérieure (diminution de la sécrétion de LH et de FSH) et sur l'hypothalamus (inhibition de la sécrétion de GnRH). Cependant, les œstrogènes à fortes concentrations plasmatiques exercent les effets opposés, c'est-à-dire une stimulation de la sécrétion de LH et de FSH par l'hypophyse antérieure et de GnRH par l'hypothalamus. Le pic plasmatique de LH qui est alors atteint amorce l'ovulation.

Lorsque les concentrations plasmatiques de progestérone et d'œstrogène sont toutes les deux élevées, ces hormones exercent une rétroaction négative sur l'hypothalamus, ce qui se traduit par une diminution de la sécrétion de GnRH. Par conséquent, les taux de FSH et de LH diminueront. Cette réduction du pic de LH survient pendant la phase lutéale et pendant la grossesse. La progestérone exerce aussi de nombreux rôles sur la préparation de l'utérus pour la grossesse et sur les seins pour la lactation, rôles qui ne seront pas abordés dans cette introduction.

2.2. Le leuprolide en tant qu'agent thérapeutique

En 1941, Huggins et Hodges ont suggéré la privation d'androgènes (obtenue par orchidectomie ou par l'administration d'œstrogènes) comme traitement de premier choix contre le cancer avancé de la prostate (70), une découverte récompensée par le Prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1966. En 1975, l'équipe de Schally a isolé l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) d'un extrait d'hypothalamus de porc (71). Elle a alors découvert que cette hormone stimule la libération de LH par l'hypophyse, ce qui lui a valu le Prix Nobel en 1977. Par la suite, plusieurs analogues ont été synthétisés pour traiter l'infertilité féminine. Cependant, les chercheurs ont vite réalisé qu'une administration quotidienne de cette hormone provoquait l'effet contraire recherché, c'est-à-dire une diminution des taux plasmatiques de LH provoquée par une désensibilisation des récepteurs hypophysaires de GnRH (72). Dans le cadre du développement d'une tumeur au niveau de la prostate, un apport en androgènes stimule la croissance de la tumeur (section 2.2.3.1.2, page 34). Ainsi, au début des années 80, le corps médical a décidé d'administrer ces agonistes à des patients présentant un cancer de la prostate (73) de façon à arrêter la sécrétion de LH par l'hypophyse et bloquer, par conséquent, la production d'androgènes par les testicules (figure 2.3). En 1985, l'organisme américain de régulation Food & Drug Administration (FDA) a reconnu que les agonistes de GnRH constituent un médicament efficace dans le traitement du cancer hormono-dépendant de la prostate.

La section 2.2 de cette introduction s'appliquera dans un premier temps à définir le leuprolide puis à expliquer ses propriétés pharmacologiques. Par la suite, quelques

utilisations thérapeutiques et les systèmes commercialisés de leuprolide seront abordés.

2.2.1. Description du leuprolide

L'acétate de leuprolide (aussi appelé leuproréline) est un peptide synthétique constitué de neuf acides aminés (tableau I). Cette molécule est un analogue de la GnRH de 80 à 100 fois plus puissant que l'hormone naturelle (74). Comme elle est métabolisée par les peptidases plutôt que par le cytochrome P450, les interactions médicamenteuses sont pratiquement inexistantes.

Pour être actif, cet agent thérapeutique doit être administré par voie parentérale. Le temps de demi-vie plasmatique du leuprolide est de 2.9 heures comparativement à l'hormone naturelle qui est de quelques minutes. La courte demi-vie de la GnRH s'explique par un clivage enzymatique par des aminopeptidases et endopeptidases plasmatiques entre les acides aminés 5-6, 6-7 et 9-10. Afin d'accroître la demi-vie, de légères modifications chimiques ont été apportées à la molécule originale (74) : la glycine en position 6 a été substituée par une D-leucine et l'amine terminale sur la glycine est remplacée par une fonction éthylamide (tableau 1).

Tableau 1. La comparaison de la structure moléculaire de la GnRH et du leuprolide.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GnRH	Glu	His	Trp	Sér	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Leuprolide	p-Glu	His	Trp	Sér	Tyr	D-Leu	Leu	Arg	Pro	Éthylamide-NH ₂

En raison de sa nature chimique, le leuprolide se lie de façon sélective sur les récepteurs de la GnRH localisés à la surface de l'hypophyse antérieure. Cette liaison provoque initialement une augmentation des taux plasmatiques de FSH et de LH qui font augmenter la sécrétion de testostérone. Par contre, dans le cadre d'une administration chronique de leuprolide, les récepteurs hypophysaires sont désensibilisés et les hormones sexuelles sécrétées massivement (FSH, LH, testostérone et œstrogènes) exercent un rétrocontrôle négatif au niveau de l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure. La sécrétion de FSH et de LH est alors réduite, ce qui se répercute par une diminution de la stéroïdogénèse testiculaire et

ovarienne. Chez l'homme, lorsque les taux plasmatiques de testostérone atteignent des valeurs égales ou inférieures à 0.5 ng/mL (ou 1.7 $\mu\text{mol/L}$), on parle de castration chimique. Dans certains cas, la castration chimique est totale (*i.e.* taux plasmatiques nuls de testostérone). Cette suppression de testostérone est maintenue dans le cadre d'un traitement chronique avec le leuprolide. Cette situation est réversible lors de l'arrêt du traitement : les taux de testostérone reviennent à la normale (arrêt de la castration chimique). De façon analogue, le leuprolide induit une diminution de la sécrétion d'œstrogènes chez la femme.

Le leuprolide est utilisé pour traiter certaines maladies hormono-dépendantes dans le cadre desquelles un déséquilibre de la sécrétion de testostérone ou d'œstrogènes est la cause de plusieurs pathologies : le cancer de la prostate, l'endométriose et la puberté précoce d'origine centrale. Le leuprolide a d'autres indications, notamment dans le traitement des léiomyomata utérins, des problèmes de fertilité de la femme, des paraphilies et des migraines. Ces conditions pathologiques et l'utilisation du leuprolide comme traitement médical seront abordés plus en détail dans la section 2.2.3 (page 33).

2.2.2. Les propriétés pharmacologiques du leuprolide

2.2.2.1. Le mécanisme d'action du leuprolide

Le leuprolide agit de la même façon que la GnRH. Tout d'abord, il se lie au récepteur de GnRH qui est un récepteur à sept passages transmembranaires couplé à une protéine Gq. Cette liaison active plusieurs voies de signalisation (figure 2.6). Dans un premier temps, la sous-unité α de la protéine G va activer la phospholipase C, ce qui mène à la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et de diacylglycérol (DAG). L' IP_3 , qui stimule la libération de calcium intracellulaire, et le DAG activent à leur tour la protéine kinase C (PKC).

La PKC, une fois activée, stimule la phosphorylation et l'activité de la phospholipase A_2 cytosolique (PLA_2) par le biais d'une série de MAP (« *mitogen activated protein* ») kinases (MAPK) (75).

Après un court laps de temps (1-2 minutes), la phospholipase D (PLD) est aussi activée, ce qui mène à la production de phosphatidyléthanol (un marqueur de l'activation de la PLD) et d'acide phosphatidique (AP) (76). L'AP phosphohydrolase transforme l'AP en DAG.

Le leuprolide active donc différentes phospholipases (PLC, PLD, PLA₂). Ces dernières agissent séparément ou bien de concert pour libérer l'acide arachidonique (AA) des phospholipides (77). De plus, il a été montré que la GnRH stimule la formation de différents leucotriènes (LT) (C₄, D₄ et E₄). L'AA et le LTC₄ stimulent l'expression génique de différentes sous-unités de gonadotrophines (LHβ et FSHβ) (78).

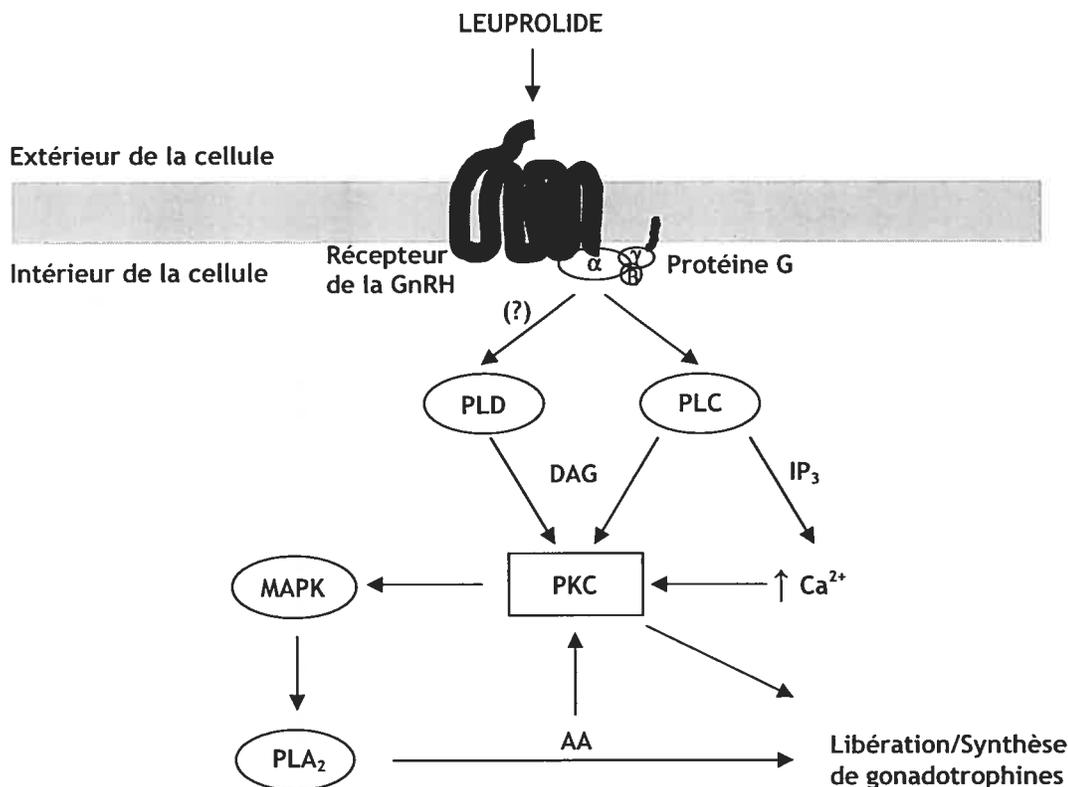


Figure 2.6. L'action moléculaire du leuprolide dans la cellule hypophysaire.

Lorsque les concentrations circulantes de leuprolide sont maintenues élevées, le récepteur de GnRH est désensibilisé par la voie classique de désensibilisation. Une forte concentration de leuprolide provoque initialement une augmentation de la concentration du second messager intracellulaire adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Par la suite, la protéine kinase dépendante de l'AMPc phosphoryle le

récepteur de la GnRH, ce qui réduit son activité. Des taux élevés d'AMPc intracellulaire accroissent l'activité de l'enzyme. Le récepteur de GnRH phosphorylé est alors incapable d'activer la protéine Gs. Des phosphatases constitutives sont chargées de déphosphoryler le récepteur afin de régénérer des récepteurs capables de lier l'hormone (ou l'agoniste) et d'activer la cascade de signalisation. À forte concentration d'hormone, le récepteur de GnRH peut aussi subir l'endocytose. Dans une situation où les concentrations d'hormones ne sont pas trop élevées, cette boucle de régulation permet d'ajuster la sensibilité des récepteurs au taux d'hormone (ou de leuprolide) en présence afin de maintenir une réponse physiologique adéquate. Lorsque l'hormone disparaît, les phosphatases constitutives déphosphorylent les récepteurs qui deviennent alors sensibles aux plus faibles taux d'hormones. Les récepteurs qui se trouvaient alors dans la cellule sont recyclés et retournent à la membrane.

2.2.2.2. Les effets secondaires d'un traitement au leuprolide

La consommation de médicament est reliée à des effets secondaires dont l'intensité peut varier d'un patient à l'autre et en fonction de la posologie. Cette section fait un survol rapide des effets secondaires observés chez certains patients traités au leuprolide.

2.2.2.2.1. Les effets du leuprolide chez l'homme

Les hommes qui souffrent d'un cancer de la prostate hormono-dépendant traité au leuprolide pendant plusieurs mois peuvent ressentir certains effets indésirables. Chez les patients qui n'ont pas subi d'orchidectomie (ablation chirurgicale des testicules) avant de recevoir le traitement, on remarque parfois une aggravation initiale des symptômes de cancer. Lorsque le traitement est poursuivi, cette aggravation se résorbe en moins d'une à deux semaines. D'autre part, certaines études cliniques rapportent que le leuprolide entraîne l'impuissance ou une diminution de la libido, des réactions dermiques granulomateuses au site d'injection (79), et une atrophie des testicules et des organes génitaux chez moins de 10% des hommes. Par contre, près de la moitié des patients se plaignent de bouffées de chaleur. Il faut remarquer que certains symptômes tels que les bouffées de chaleur et

l'atrophie des testicules constituent des conséquences pharmacologiques attendues résultant d'une suppression de la testostérone.

Il est bien connu qu'un traitement au leuprolide risque d'induire une diminution de la densité minérale osseuse (DMO), ce qui accroît la prévalence de l'ostéoporose chez le patient. Smith *et coll.* (2001) ont été les premiers à publier une étude sur la prévention de cette maladie chez l'homme recevant un traitement d'agoniste de GnRH (80) par du pamidronate. Ce médicament inhibe la résorption osseuse et est utilisé entre autre dans le cadre d'un traitement de la maladie de Paget et de l'hypercalcémie.

Une étude a rapporté l'évaluation histologique des testicules chez des patients ayant reçu un traitement à long terme au leuprolide suivi par une orchidectomie. Elle montre un effet du médicament sur la suppression de la spermatogenèse, un épaississement de la membrane péricubulaire et une diminution du nombre de cellules de Leydig par rapport à un groupe contrôle de patients ayant subi une orchidectomie sans traitement au leuprolide. L'étude attribue ces effets au leuprolide, car ils sont partiellement réversibles suite à l'interruption du traitement (81).

2.2.2.2. Les effets du leuprolide chez la femme

Plusieurs effets secondaires sont rapportés. Certains n'affectent que quelques femmes, notamment l'œdème, les nausées et vomissements, les troubles gastro-intestinaux, une baisse de libido, de l'acné, des troubles articulaires, des étourdissements, des troubles neuromusculaires, de la nervosité, des réactions cutanées et un gain de poids. D'autres effets secondaires dont la dépression, une instabilité émotionnelle, des maux de tête, une douleur généralisée et les vaginites affectent de 20 à 30% des femmes. L'effet secondaire le plus répandu demeure les bouffées de chaleur qui incommode près de 85% des femmes.

Le leuprolide entraîne une diminution de la DMO chez la femme (82) comme chez l'homme. Compte tenu que l'ostéoporose est un problème souvent associé à de faibles taux plasmatiques d'œstrogènes, une femme recevant du leuprolide risque fortement de développer cette maladie. Suite à l'arrêt du traitement, la DMO peut revenir à la normale. Par contre, une administration prolongée de leuprolide

supérieure à deux ans peut engendrer une perte graduelle de l'os trabéculaire de façon irréversible (83). Afin de préserver la DMO, le leuprolide peut être administré en combinaison avec du carbonate de calcium (84) ou avec un mélange de promegestone (un progestatif dérivé de la 19-nor-progestérone) et d'œstradiol (85).

Certaines femmes reçoivent un traitement de leuprolide dans le cadre d'une thérapie adjuvante pour stimuler la fécondation. Tejada *et coll.* (1991) ont montré que le leuprolide n'induit pas d'anomalies chromosomiques chez des ovocytes humains non fécondés (86).

2.2.2.2.3. Les effets du leuprolide chez l'enfant

Les enfants présentant une puberté précoce d'origine centrale peuvent être traités avec le leuprolide. Parce que ce médicament augmente les taux d'oestrogènes et de testostérone, on peut craindre une accélération de la maladie. Cependant, les effets secondaires répertoriés et qui sont reliés au traitement de leuprolide affectent moins de 2% des patients. On retrouve des douleurs généralisées, de l'acné, des réactions au point d'injection, des éruptions cutanées et certains troubles génito-urinaires (vaginite, saignements et pertes vaginales).

Que ce soit chez l'homme, la femme ou l'enfant, plusieurs modifications des paramètres biologiques ont aussi été observées. Dans la première semaine de traitement, on prévoit une augmentation des taux sanguins d'azote uréique, de créatinine, de phosphatase acide, de testostérone et de DHT. Dans le cadre d'une administration à long terme de médicament, ces taux se normalisent aux valeurs initiales.

De façon générale, les effets secondaires indésirables rapportés ici sont d'une intensité variable, habituellement de faible à modérée. Il est à noter que dans la plupart des cas, ces effets sont temporaires : ils sont présents au début du traitement et disparaissent dans les jours suivants. Cependant, il est possible de contrer ces effets secondaires en administrant au patient un antagoniste des récepteurs d'androgènes (flutamide, bicalutamide et nilutamide). Ces médicaments compétitionnent avec le leuprolide pour se lier aux récepteurs et atténuent de cette façon les effets temporaires reliés à une augmentation importante de testostérone.

2.2.3. Les utilisations thérapeutiques du leuprolide

L'acétate de leuprolide est utilisé dans le traitement de différents cancers et de maladies causés par un désordre dans la sécrétion des hormones sexuelles, incluant notamment le cancer de la prostate hormono-dépendant, l'endométriose et la puberté précoce d'origine centrale. De plus, l'utilisation du leuprolide est passée en phase clinique pour traiter les léiomyomata utérins, les problèmes de fertilité et certaines paraphilies. Cette section passera en revue les différentes utilisations thérapeutiques du leuprolide.

2.2.3.1. Le cancer de la prostate hormono-dépendant

2.2.3.1.1. L'étiologie du cancer de la prostate

L'étiologie du cancer de la prostate est relativement complexe et de nombreux facteurs peuvent être à la source de la tumeur responsable de la maladie. Aux altérations moléculaires et génétiques s'ajoutent des facteurs environnementaux.

Le cancer de la prostate est le second cancer le plus mortel chez l'homme et serait plus répandu qu'on ne le croit chez l'homme âgé. En effet, une étude européenne rapporte les résultats de nécropsies pratiquées sur des hommes décédés après 80 ans (87) : un homme sur trois présenterait un cancer de la prostate, ce cancer n'étant pas la cause de décès dans cette étude. Certains affirment même que la prévalence de ce cancer est si élevée qu'on pourrait le considérer comme un problème normal de vieillesse (88). Le cancer de la prostate peut se présenter sous une forme asymptomatique ou encore comme une tumeur maligne fatale. Par contre, le taux de survie augmente d'année en année. Ceci ne s'explique pas par le développement de meilleurs traitements de la maladie, mais plutôt par un dépistage de plus en plus précoce en raison du test de détection de l'antigène spécifique de la prostate (PSA pour « *prostatic specific antigen* »).

D'un point de vue moléculaire, la DHT se lie aux récepteurs cytosoliques des androgènes et forme un homodimère qui est transloqué au noyau. Le complexe se lie ensuite à l'élément de réponse aux androgènes situé sur différents gènes cibles, tel celui du PSA. L'antigène est produit à la fois chez l'homme sain et, en plus grande quantité, chez celui atteint du cancer de la prostate. Pour cette raison, cette protéine est souvent dosée dans le cadre d'essais cliniques pour détecter la présence ou

évaluer la progression du cancer. Cependant, les résultats d'un tel test ne sont pas toujours concluants et ne permettent pas de déterminer si le cancer sera asymptomatique ou bien s'il s'agit d'une tumeur maligne. Le meilleur test de dépistage demeure encore l'évaluation histopathologique de la prostate au moyen d'une biopsie.

2.2.3.1.2. Le développement de la prostate et d'une tumeur prostatique

Chez toutes les espèces, la prostate se développe au moment embryonnaire. Elle est dérivée de l'endoderme du sinus urogénital, lequel est entouré de tissu conjonctif appelé mésenchyme. Avant la différenciation sexuelle de l'embryon, le mésenchyme exprime des récepteurs d'androgène. Suite à l'expression d'androgènes testiculaires par le fœtus, le mésenchyme croît tout en adoptant un motif particulier qui formera la prostate (89). À l'aide d'un modèle murin déficient en récepteurs d'androgène, Cunha *et coll.* (1987) ont montré que le développement embryonnaire de la prostate requiert à la fois les androgènes et leurs récepteurs (90). Les phénomènes de différenciation cellulaire de l'épithélium et du mésenchyme de la prostate surviennent après la naissance, sous l'influence d'un ensemble de protéines spécifiques à cette glande.

Les hormones jouent un rôle fondamental dans le développement de la prostate. Les androgènes sont nécessaires pour permettre son développement, sa croissance et ses fonctions. Par contre, ils peuvent aussi agir en tant que stimulus de la carcinogenèse (91). Chez l'homme, les taux de testostérone diminuent progressivement avec l'âge. Lors du développement du cancer, les taux d'œstradiol demeurent stables ou peuvent augmenter. Dans de telles conditions, le rapport 17β -œstradiol/testostérone (E2/T) augmente (92). Des études *in vitro* ont montré le rôle primordial des récepteurs des androgènes dans le développement du cancer (93). D'autres études, menées sur un modèle murin cette fois, ont révélé que la testostérone à elle seule ou en combinaison avec des œstrogènes peut induire le cancer de la prostate (94).

2.2.3.1.3. Les différents traitements contre un cancer de la prostate

Plusieurs options thérapeutiques sont offertes au patient pour traiter un cancer de la prostate hormono-dépendant. Le moyen le plus radical est sans aucun doute la castration chirurgicale qui consiste en l'ablation des deux testicules. Cette méthode présente l'avantage de bloquer de façon abrupte la sécrétion de la testostérone. Elle requiert une intervention chirurgicale relativement simple et peu coûteuse. Par contre, elle comporte de nombreux désavantages : en plus d'être définitive et irréversible, elle est souvent associée à des problèmes psychologiques importants. Cette chirurgie s'accompagne d'une diminution permanente de la libido, de problèmes d'impuissance sexuelle, d'une diminution de la masse musculaire, de bouffées de chaleur, d'anémie et d'ostéoporose.

D'autres solutions, moins radicales, peuvent être envisagées. En effet, la castration médicale est possible par un traitement hormonal qui consiste en la prise d'hormones sur une base quotidienne ou sous forme de formulations prolongées. Plusieurs options sont offertes encore une fois au patient. La consommation d'œstrogènes (diéthylstilbestrol) induit une suppression de la sécrétion de GnRH. Par contre, les œstrogènes peuvent induire des complications au niveau cardiovasculaire. Les agonistes de GnRH (leuprolide, goséréline) suppriment la sécrétion de testostérone par leur effet de régulation à la baisse du récepteur de GnRH suite à sa surstimulation. Les antagonistes de GnRH (abarélix, antarélix) quant à eux agissent sur ces mêmes récepteurs et induisent une diminution de la sécrétion de LH (puis de testostérone) sans toutefois induire une augmentation de testostérone comme le font les agonistes de GnRH immédiatement après leur administration. Ces méthodes de castration médicale ont des conséquences semblables à la castration chirurgicale, mais leurs effets sont réversibles.

L'administration d'antiandrogènes s'avère bénéfique chez certains patients. Ils peuvent recevoir des antiandrogènes non-stéroïdiens (ANS) (flutamide, nilutamide et bicalutamide) ou stéroïdiens (AS) (acétate de cyprotérone et acétate de mégésterol). Les ANS assurent une inhibition de la sécrétion de testostérone à la fois par les testicules et par les glandes surrénales. De plus, ils n'induisent pas d'impuissance

sexuelle ni de diminution de libido. On rapporte aussi que leurs effets secondaires sont moins sévères que la castration même s'ils peuvent parfois provoquer de la gynécomastie (95). Les AS, quant à eux, peuvent induire certaines complications cardiovasculaires, la gynécomastie, des effets sur le système nerveux central (SNC) et de la fatigue (96); cependant, ils n'induisent pas de bouffée de chaleur.

Une quatrième option thérapeutique consiste en une combinaison de deux traitements : la castration chimique et l'administration d'antiandrogène (souvent le flutamide). Bien que la sécrétion de testostérone par les testicules soit bloquée par les agonistes de GnRH, la testostérone produite par les glandes surrénales pourrait stimuler la croissance de la tumeur prostatique, d'où l'idée d'administrer des antiandrogènes en combinaison avec une castration chimique. Certaines études montrent que la combinaison de ces deux thérapies est plus efficace que la castration seule (97,98), mais d'autres recherches n'ont révélé aucune différence entre un traitement et l'autre (99). Par contre, les effets secondaires de la thérapie combinée sont plus importants que ceux de chaque traitement individuel.

Certains cas de cancer de la prostate sont plutôt traités à l'aide de traitements de radiothérapie, de chimiothérapie ou de curiethérapie qui peuvent être combinées ou non avec une thérapie hormonale. Afin de diminuer le stade d'avancement de la pathologie, d'éliminer les micrométastases et d'accroître l'espérance de vie du patient, la prostatectomie doit être envisagée.

2.2.3.2. L'endométriose

L'endométriose est une maladie récurrente œstrogéno-dépendante qui affecte près de 15% des femmes non ménopausées et qui cause l'infertilité (100). En effet, de 20 à 40% des femmes infertiles sont atteintes d'endométriose. Pour le moment, les différents traitements médicaux se révèlent d'une efficacité comparable et aucune option n'est meilleure qu'une autre pour combattre cette pathologie.

Plusieurs éléments de la pathogenèse de l'endométriose restent à découvrir et une meilleure compréhension moléculaire de la maladie permettra le développement de stratégies pharmacologiques efficaces. Étant donné que les cellules endométriosiques sont sensibles aux œstrogènes, tout traitement qui bloque leur

production est bénéfique pour contrer le développement de la maladie. Actuellement, plusieurs options thérapeutiques s'offrent à la femme présentant de l'endométriose : un traitement aux agonistes de GnRH, le danazol, les hormones progestatives, les contraceptifs oraux, la gestrinone ou, de façon plus radicale, une intervention chirurgicale (retrait de la tumeur bénigne) (101). L'attention du lecteur est ici portée sur l'administration d'agonistes de GnRH, plus spécifiquement le leuprolide.

L'endométriose se caractérise par une prolifération de tissu (tumeur bénigne) à l'extérieur de l'endomètre (trompes de Fallope, ovaires et ligaments par exemple), mais dont l'histologie lui est très semblable. Ces excroissances tissulaires risquent d'entraîner l'occlusion des trompes de Fallope et la distorsion de l'anatomie du bassin, source d'infertilité. Des modifications dans la production et le métabolisme des œstrogènes activent le développement de la maladie (102). Par exemple, chez les femmes atteintes d'endométriose modérée ou sévère, l'aromatase (une enzyme qui transforme les androgènes en œstrogènes) est exprimée à des niveaux très élevés dans l'endomètre eutopique alors qu'elle est à peine détectable chez les femmes saines. De plus, près de 70% des femmes atteintes d'endométriose souffrent de dysménorrhée et plusieurs éprouvent des douleurs constantes et de la sensibilité au niveau du pelvis (103).

Les premières études cliniques pour évaluer l'efficacité du leuprolide pour traiter l'endométriose remontent au début des années 90. Dlugi *et coll.* (1990) ont administré le médicament sur une base mensuelle sous forme de dépôt (104). Ces femmes ont rapporté un soulagement rapide de la dysménorrhée puis ensuite une diminution importante des douleurs et de la sensibilité pelviennes. Des études subséquentes ont été réalisées pour comparer l'efficacité du leuprolide avec d'autres agents thérapeutiques tel le danazol (105), mais aucune différence statistiquement significative entre les médicaments n'a été rapportée.

Étant donné que les différentes thérapies hormonales pour combattre l'endométriose sont comparables, son choix doit reposer sur son coût et sur ses effets secondaires. Le danazol entraîne des effets androgéniques. Le leuprolide, quant à lui, est associé à des bouffées de chaleur, une atrophie génito-urinaire et une diminution

de la DMO. Pour l'instant, le traitement le plus efficace demeure l'intervention chirurgicale.

2.2.3.3. La puberté précoce d'origine centrale

La puberté se définit comme une période de transition biologique au cours de laquelle les organes reproducteurs atteignent leur maturité. On parle de puberté précoce lorsque les premiers signes de développement pubère se manifestent avant l'âge de huit ans. Il existe deux types de puberté précoce, l'un étant dépendant de la GnRH et l'autre étant indépendant. Nous nous attarderons seulement sur le premier cas.

La puberté précoce dépendante de la GnRH est complète et centrale, car elle origine du développement prématuré de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique. En résulte alors une production anormalement élevée de stéroïdes sexuels et de GnRH. Contrairement à la puberté précoce indépendante de la GnRH, ce type est isosexuel (c'est-à-dire que l'ensemble des caractères sexuels développés est conforme au sexe génétique et gonadique).

La puberté précoce affecte cinq fois plus de filles que de garçons. La conséquence la plus importante est leur petite taille à l'âge adulte. Cependant, leur développement intellectuel et psychosocial reste comparable à celui des fillettes normales. Les problèmes du SNC à l'origine de certains cas de puberté précoce peuvent engendrer des dommages très graves, notamment des problèmes du développement du crâne en raison du rachitisme souvent associé à la maladie.

Plusieurs causes seraient à l'origine d'une puberté précoce. Cependant, aucun mécanisme pathophysiologique commun à chacune de ces causes n'a encore été découvert. Le facteur de croissance transformant β , par son effet stimulant sur la sécrétion de GnRH, pourrait être en cause dans la pathologie chez les fillettes présentant un hamartome au niveau hypophysaire (106).

À l'origine, la puberté précoce était traitée par l'acétate de médroxyprogestérone, l'acétate de cyprotérone et le danazol. Cependant, ces médicaments engendraient des effets secondaires indésirables ainsi que des résultats insatisfaisants quant au

contrôle de la maturation osseuse et de la croissance corporelle. Peu à peu, ils ont été supplantés par des analogues de GnRH.

Suite à l'administration d'agonistes de GnRH, les concentrations plasmatiques de gonadotrophines sont rapidement accrues, puis chutent à des niveaux presque nuls, entraînant une baisse de la production et de la sécrétion d'hormones stéroïdiennes. Il en résulte alors une diminution significative des caractères pubères présents avant l'administration d'agonistes de GnRH, notamment une diminution de la vitesse de croissance corporelle (107). Lors de l'arrêt du traitement, le développement pubère se déroule de la même façon que celui des adolescentes normales (108).

2.2.3.4. Les autres utilisations thérapeutiques du leuprolide

2.2.3.4.1. Les léiomyomata utérins

Les léiomyomata sont des néoplasmes bénins de l'utérus qui sont constitués de cellules musculaires lisses qui auraient subi des mutations somatiques (109). On les retrouve chez près du quart des femmes âgées de plus de 30 ans, se manifestant par des symptômes normalement associés à une augmentation du volume utérin et par des épisodes de ménorragies (110).

L'environnement de ces tumeurs bénignes est concentré en œstrogène. En effet, la concentration d'œstradiol dans la tumeur est élevée et les léiomyomata contiennent un nombre important de récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (111). De plus, l'enzyme aromatasase est exprimée en très grande quantité (112). Ainsi, les léiomyomata sont très sensibles aux œstrogènes et semblent avoir perdu tout mécanisme de régulation de l'activité stimulée par ces hormones (113). Aussi, l'activité mitotique des cellules des léiomyomata utérins est stimulée par la progestérone (114). Les léiomyomata utérins causent très souvent l'infertilité, car les tumeurs, selon leur localisation, bloquent le passage de l'ovule ou des spermatozoïdes (115).

Le choix d'un traitement approprié doit d'abord tenir compte des risques et bénéfices qu'il peut procurer à la femme souffrant de cette condition. Ils consistent en des interventions médicamenteuses (agonistes et antagonistes de GnRH, mifepristone, levonorgestrel) ou chirurgicales (myomectomie hystéroscopique).

L'utilisation d'agonistes de GnRH pour traiter les léiomyomata utérins représente la thérapie de choix pour réduire, de façon temporaire, la taille de la tumeur et l'intensité des symptômes associés à leur présence. De plus, ils diminuent la taille moyenne de l'utérus de 30 à 64% après trois à six mois de traitement (116). Près de la totalité des femmes rapportent une disparition des épisodes de ménorragie. Les effets du leuprolide sont temporaires et disparaissent une fois le traitement interrompu. En effet, l'utérus retrouve son volume initial 24 semaines après l'arrêt du traitement (117).

Une thérapie d'agonistes de GnRH entraîne inévitablement des effets secondaires, le plus commun étant des bouffées de chaleur (118). Souvent utilisé comme thérapie pré-opératoire, le leuprolide offre plusieurs avantages dont bénéficie l'intervention chirurgicale ultérieure pour le retrait de la tumeur. Il réduit la taille de la tumeur et induit l'atrophie de l'endomètre (119). De plus, une diminution de la vascularisation de la tumeur permet de réduire les saignements lors de l'ablation du léiomyome.

2.2.3.4.2. Les problèmes de fertilité et la fertilisation *in vitro*

Aux États-Unis, 10 à 15% des couples sont infertiles (120). De plus en plus de femmes ont recours pendant leur vie à un traitement quelconque pour régler leur problème d'infertilité. Les causes principales d'infertilité féminine incluent un dérèglement de l'ovulation (40%), des pathologies tubaires ou du péritoine (40%) et d'autres problèmes non fréquents incluant les pathologies de l'utérus (10%).

Développé en 1956 et introduit aux États-Unis en 1967, le citrate de clomiphène est utilisé pour traiter les dysfonctions ovulatoires. Il s'agit d'un dérivé triphényléthylène non-stéroïdien qui agit à la fois comme agoniste et antagoniste d'œstrogène (121). Son administration stimule l'ovulation chez 80% des femmes. Des études cliniques ont montré que la moitié d'entre elles deviennent enceintes, mais il est tenu responsable de plusieurs grossesses plurigémellaires (122).

Les gonadotrophines exogènes (GEx) représentent une autre avenue pour stimuler l'ovulation et sont utilisées depuis plus de 40 ans. Quoique très coûteuses, les GEx s'avèrent être des médicaments puissants dont la dose doit être rigoureusement ajustée, car elles comportent des risques importants, tels des

grossesses multiples et le syndrome d'hyperstimulation ovarienne. Plusieurs femmes incapables à ovuler et ne répondant pas au clomiphène présentent des taux élevés de LH endogène ; cette condition les prédispose à une lutéinisation prématurée du follicule (123) et contribue de façon significative à un avortement spontané (124). Elles ont alors recours aux GEx administrées en combinaison avec des agonistes de la GnRH tel le leuprolide. Un tel traitement prévient la lutéinisation prématurée du follicule. Des études cliniques non randomisées ont montré qu'un traitement aux GEx et agonistes de GnRH peut améliorer la fécondité chez la femme incapable à ovuler (123). L'administration combinée des deux médicaments demeure le traitement standard pour stimuler la fertilisation.

2.2.3.4.3. Le traitement des paraphilies avec le leuprolide

Les paraphilies sont des formes d'expression sexuelle dans le cadre desquelles l'excitation et la satisfaction sexuelle sont obtenues par un choix préférentiel d'objets ou de situations hors normes. Des séances de psychothérapie peuvent venir en aide aux individus présentant une ou des paraphilies, mais l'utilisation d'une pharmacothérapie appropriée s'avère bénéfique. L'acétate de cyprotérone et l'acétate de médroxyprogestérone sont utilisés fréquemment, mais en raison d'effets secondaires importants (gynécomastie, faiblesse généralisée, thromboembolie, dépression, dommages hépato-cellulaires, gain de poids, cauchemars, maux de tête, crampes musculaires, dyspepsie, calculs biliaires et diabète), on leur préfère les agonistes de GnRH tel le leuprolide. Krueger et Kaplan ont publié une étude en 2001 qui regroupait des patients présentant différentes paraphilies (pédophilie, exhibitionnisme et voyeurisme). Les sujets ont tous rapporté une diminution de leurs fantasmes sexuels déviants suite à l'administration d'une formulation dépôt de leuprolide provoquant une castration chimique (125).

Plusieurs chercheurs estiment que les agonistes de GnRH tel le leuprolide représentent, pour le moment, la thérapie la plus efficace pour traiter les paraphilies (126,127).

2.2.4. Les différents systèmes commercialisés pour la libération prolongée de leuprolide

Originellement administrés en injections quotidiennes, les agonistes de GnRH ont été formulés pour la libération prolongée. Ces nouvelles formulations offrent les avantages d'assurer une plus grande observance du traitement et une appréciation accrue de la part des patients par rapport aux injections quotidiennes. De plus, les patients préfèrent les formulations à libération prolongée d'agonistes de la GnRH à l'orchidectomie.

En 2003, la FDA avait approuvé cinq systèmes à libération prolongée d'analogues de la GnRH (128). Parmi ceux-ci, trois systèmes assurent la libération d'acétate de leuprolide : le Lupron^{MC} dépôt, Eligard^{MC} et le Viadur^{MC}. Les deux premiers systèmes sont des formulations injectables disponibles au Canada. Le troisième est une mini-pompe osmotique qui requiert une intervention chirurgicale mineure. Le Viadur^{MC} n'est pas commercialisé au Canada. Ces trois systèmes feront l'objet de la présente section. Mentionnons l'existence de deux autres systèmes pour l'administration d'acétate de goséréline (Zoladex^{MC}, AstraZeneca Pharmaceuticals) et de triptoréline pamoate (Trelstar^{MC}, Pharmacia & Upjohn) qui sont commercialisés aux États-Unis, mais qui ne seront pas abordés puisque ce ne sont pas des systèmes utilisant le leuprolide.

2.2.4.1. Lupron^{MC} dépôt

Le Lupron^{MC} dépôt est une suspension de microsphères commercialisées par la compagnie TAP Pharmaceuticals. Il doit être administré par voie intramusculaire et est disponible en plusieurs doses pour une libération d'un à quatre mois dans le cadre d'un traitement du cancer de la prostate hormono-dépendant, de l'endométriose et de la puberté précoce d'origine centrale.

Le Lupron^{MC} dépôt se présente dans une seringue à double compartiment. Le premier contient des microsphères lyophilisées de leuprolide qui sont constituées d'un copolymère biodégradable d'acides DL-lactique et glycolique; ce compartiment contient aussi de la gélatine purifiée et du D-mannitol. Le second compartiment renferme un mélange d'alcool benzylique, de chlorure de sodium, de

carboxyméthylcellulose sodique, de D-mannitol, de polysorbate 80, d'eau stérile pour préparations injectables et d'acide acétique glacial USP. Le contenu des deux compartiments est mélangé juste avant l'injection, de façon à recréer une suspension.

Le Lupron^{MC} dépôt peut induire certaines réactions cutanées au point d'injection, notamment de l'inflammation, un abcès stérile, l'induration ou un hématome. Le leuprolide contenu dans la formulation entraîne une diminution des taux sériques de testostérone chez l'homme et d'œstradiol chez la femme. Par conséquent, il ralentit la croissance physiologique et le développement sexuel chez l'enfant atteint de puberté précoce, et retarde l'accroissement de la taille des tumeurs endométriosiques et prostatiques dans les cas d'endométriose et de cancer de la prostate respectivement. Les effets secondaires principaux du Lupron^{MC} dépôt sont les bouffées de chaleur, l'aménorrhée et une diminution de la DMO, des effets tous réversibles qui cessent lors de l'arrêt du traitement. En diminuant la DMO, le Lupron^{MC} dépôt augmente la prévalence à l'ostéoporose.

Il est à noter que dans certains cas isolés, l'administration de Lupron^{MC} dépôt s'accompagne d'une aggravation temporaire des symptômes liés au désordre hormonal que l'on souhaite traiter. Ces phénomènes peuvent être causés par une stimulation initiale de l'hypophyse antérieure. Il arrive que l'aggravation des symptômes oblige l'interruption du traitement pour entreprendre une intervention chirurgicale.

2.2.4.2. Eligard^{MC}

Eligard^{MC} est une formulation à base de polymère commercialisée par Atrix Laboratories, Inc. Cette formulation est injectée par la voie sous-cutanée et est disponible en quatre doses pour traiter le cancer de la prostate hormono-dépendant pour une période d'un à six mois. Les formulations Eligard^{MC} présentent un double avantage par rapport au Lupron^{MC} dépôt : l'administration se fait par la voie sous-cutanée (injections moins douloureuses que par la voie intramusculaire) et le volume injecté est plus faible.

De la même façon que le Lupron^{MC} dépôt, l'administration d'Eligard^{MC} peut entraîner initialement une aggravation des symptômes liés au désordre hormonal ou encore provoquer l'apparition de nouveaux symptômes (douleurs osseuses, neuropathie, hématurie, obstruction des uretères ou difficulté d'évacuation du contenu vésiculaire). Ces symptômes surviennent généralement dans la première semaine de traitement et sont réversibles lors de son arrêt.

Eligard^{MC} exploite la technologie de libération prolongée Atrigel^{MC}. La formulation est répartie dans deux seringues pré-remplies qui sont fixées l'une à l'autre par le médecin. La première seringue renferme le leuprolide stérile sous forme de poudre lyophilisée. L'autre seringue contient l'Atrigel^{MC}, une formulation de polymère composée d'acides DL-lactique et glycolique en solution dans un solvant organique biocompatible, la *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP). Les proportions d'acides DL-lactique et glycolique varient d'une formulation à l'autre : le rapport molaire d'acides DL-lactique et glycolique est de 50:50 pour la dose de 7.5 mg, de 75:25 pour les doses de 22.5 et 30 mg et de 85:15 pour la dose de 45 mg. Les masses molaires des polymères et les concentrations de solvants organiques varient donc d'une formulation à l'autre de façon à moduler la durée de libération de l'agent thérapeutique. Le leuprolide et les différents excipients sont mélangés immédiatement avant l'injection en vidant alternativement le contenu d'une seringue dans l'autre de façon à obtenir une solution uniforme (une suspension dans le cadre d'Eligard^{MC} 45 mg) incolore à havane.

Suite à l'injection de la formulation Eligard^{MC}, le solvant organique diffuse dans les tissus environnants et les polymères forment un dépôt dans lequel est emprisonné le leuprolide. Les polymères se dégradent avec le temps et libèrent graduellement le principe actif.

Des études cliniques menées avec Eligard^{MC} ont mis en évidence son efficacité pour provoquer une castration chimique trois semaines après son administration chez des patients atteints du cancer de la prostate (129,130). De plus, les niveaux de PSA sont réduits de plus de 95% entre le début et la fin du traitement. Les effets secondaires rapportés incluent principalement les bouffées de chaleur (d'intensité légère principalement) et une douleur au point d'injection (légère elle aussi).

2.2.4.3. Viadur^{MC}

Le Viadur^{MC} est une mini-pompe osmotique pour la libération prolongée (un an) d'acétate de leuprolide distribuée et commercialisée par Bayer Pharmaceuticals Corporation et disponible sur le marché américain depuis 2001. Cette mini-pompe (4 × 45 mm) est constituée d'un alliage de titane et requiert une intervention chirurgicale mineure pour son implantation. Contrairement aux deux autres systèmes décrits précédemment, le Viadur^{MC} n'est pas biodégradable et doit être retiré à la fin du traitement.

La mini-pompe comprend un réservoir qui renferme la formulation de leuprolide (72 mg d'acétate de leuprolide en solution dans du diméthylsulfoxyde [DMSO]), un piston et un second compartiment dans lequel on retrouve deux comprimés osmotiques (composés notamment de chlorure de sodium et de stéarate de magnésium) (figure 2.7). Une des extrémités de la mini-pompe se termine par une membrane de polyuréthane (à droite sur la figure 2.7). À l'autre extrémité se trouve un petit orifice par lequel sort la formulation. En réponse au gradient osmotique, de l'eau (provenant du tissu environnant) traverse la membrane de polyuréthane de la mini-pompe. Les comprimés s'hydratent, gonflent et exercent par conséquent une pression graduelle sur le piston, lequel éjecte la formulation à l'extérieur de la mini-pompe. Ainsi le taux de libération du leuprolide dépend de l'entrée d'eau (131).

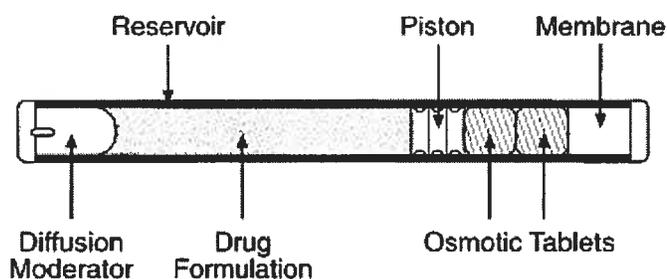


Figure 2.7. L'implant d'acétate de leuprolide Viadur^{MC}. Tiré de (131) avec la permission de l'éditeur.

L'installation de l'implant requiert une anesthésie locale, puis une chirurgie mineure au cours de laquelle une petite incision (5 mm) est pratiquée dans le bras. La mini-pompe est installée entre le biceps et le triceps. Un an après son installation, elle doit être retirée. Un tel système constitue une alternative aux formulations dépôt.

Il assure une suppression de la testostérone pendant un an et accroît l'observance des sujets. De cette façon, il permet d'assurer un meilleur contrôle de la maladie.

Deux études cliniques menées auprès d'hommes âgés et présentant un cancer de la prostate ont mis en évidence l'efficacité et l'appréciation de la mini-pompe Viadur^{MC} (132,133). Les taux sériques de leuprolide demeurent constants au cours de l'année entière, la castration chimique est ininterrompue et les taux de PSA ont diminué d'environ 90% après un an. Les effets secondaires rapportés sont typiques au leuprolide (bouffées de chaleur, gynécomastie, diminution de la libido). Les médecins quant à eux ont rapporté éprouver de la facilité à installer la mini-pompe, mais son retrait est parfois un peu difficile une fois l'année complétée. Finalement, la presque totalité des patients ont été satisfaits de cette technologie et ont manifesté le désir de recevoir une seconde pompe une fois l'étude complétée.

Le travail de recherche exécuté dans le cadre de la maîtrise en sciences pharmaceutiques consistait à développer un nouveau type d'insert thermosensible et injectable à base d'organogel pour la libération prolongée de médicament. Plusieurs raisons ont motivé le choix des organogels. La simplicité de préparation de la formulation par rapport aux microsphères demeure un aspect important qui nous a guidé tout au long de nos travaux de recherche. L'absence de polymère (contrairement aux systèmes Lupron^{MC} dépôt et Eligard) présente un avantage dans la mesure où il a été montré que leur dégradation génère des produits acides susceptibles d'affecter l'intégrité structurale des médicaments (134). Enfin, la capacité d'injecter la formulation et sa biodégradation permettent toutes les deux d'éviter une intervention chirurgicale pour l'implantation et le retrait de la formulation. Le leuprolide, un peptide hydrophile de petit poids moléculaire, a été sélectionné à titre de principe actif modèle pour les études de pharmacocinétique. Nous venons de mentionner trois formulations commerciales efficaces à base de leuprolide pour traiter le cancer de la prostate, l'endométriose et la puberté précoce. Le travail de maîtrise ici présenté ne consistait pas à développer une formulation concurrente ou bien un générique. Nous avons retenu le leuprolide, car il s'agit d'un médicament disponible depuis plusieurs années et qui est bien caractérisé. De plus,

comme il est utilisé pour traiter des désordres hormonaux chroniques, il se prête bien à une libération prolongée et au type de système que nous souhaitons développer. Une méthode de dosage du leuprolide était disponible au sein du laboratoire du Professeur Ong et l'évaluation de l'efficacité du médicament (études pharmacodynamiques) était très aisée.

Le second objectif de cette maîtrise visait à évaluer *in vivo* les différentes formulations développées. Pour ce faire, des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques ont permis de comparer les formulations entre elles, tant au niveau de la libération du médicament qu'au niveau de leur efficacité (c'est-à-dire inhibition de la testostérone à des niveaux de castration chimique). Les essais chez l'animal ont été réalisés chez le rat. Ce modèle a été sélectionné parce qu'il permet de faire des prises de sang répétées (notamment au début de chaque étude pharmacocinétique) et de récolter un volume suffisant pour l'analyse en triplicata. De plus, la méthode de dosage du leuprolide par RIA était validée pour le plasma de rat. Un autre modèle animal, telle que la souris, ne répondait pas à l'ensemble de ces exigences.

CHAPITRE 3. Article

First report on the efficacy of L-alanine-based *in situ*-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs

François Plourde¹, Aude Motulsky¹, Anne-Claude Couffin-Hoarau¹, Didier Hoarau²,
Huy Ong¹ and Jean-Christophe Leroux^{1*}

¹Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal,

C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montreal, QC H3C 3J7, CANADA

²Ethypharm Inc., 200 boul. Armand Frappier, Laval, QC H7V 4A6, CANADA

* To whom correspondence should be addressed.

Email address: [REDACTED]

Fax number: (1) 514-343-2102

Reprinted from *Journal of Controlled Release* **108** (2005) 433-441 with permission from Elsevier.

ABSTRACT

The recent advent of biotechnologies has led to the development of labile macromolecular therapeutic agents that require complex formulations for their efficient administration. This work reports a novel concept for the systemic, sustained delivery of such agents. The proposed approach is based on the spontaneous self-assembly of low-molecular weight amphiphilic amino acid derivatives in a hydrophobic pharmaceutical vehicle. The injectable, *in situ*-forming organogels were obtained by mixing *N*-stearoyl L-alanine (m)ethyl esters with a vegetable oil and a biocompatible hydrophilic solvent. The gels' *in vivo*-delivering properties were evaluated in rats with leuprolide, a luteinizing hormone-releasing hormone agonist used in prostate cancer, endometriosis and precocious puberty treatment. Following subcutaneous injection, the gels degraded and gradually released leuprolide for 14 to 25 days. Drug release was accompanied by sustained castration lasting up to 50 days, as assessed by testosterone levels. This study demonstrates that *in situ*-forming implants based on L-alanine derivatives represent a novel injectable platform for the controlled delivery of hydrophilic compounds, which is simpler than currently-available implant and microsphere technologies.

KEYWORDS

drug delivery, L-alanine organogelators, *in situ*-forming implant, organogel, leuprolide

3.1. Introduction

Long-acting formulations consisting of polymeric microsphere systems are being commonly used to deliver peptides and proteins over several weeks or months [1]. Although they are easy to administer, these systems have several inherent disadvantages. These include the need for reconstitution before injection, a relatively complicated manufacturing procedure to produce a sterile, stable, and reproducible product, as well as the possibility of microsphere migration from the site of injection [2]. Accordingly, in the past few years, an increasing number of in situ-forming systems have been reported in the literature for various biomedical applications, including drug delivery, cell encapsulation, and tissue repair [2, 3]. These systems are injectable fluids that can be introduced into the body in a minimally-invasive manner prior to solidifying or gelling within the desired tissue, organ, or body cavity. In situ-gelling implants can be easily located and removed in case of unbearable side-effects. Furthermore, their lower specific surface area after gelation, compared to particulate systems, may reduce burst release, which is common with microspheres. To date, most in situ-forming implants described in the literature are temperature-sensitive hydrogels showing relatively poor retention properties for low-MW hydrophilic compounds as the latter can readily diffuse into the large pores of polymeric networks [4]. In situ-forming implants can also be obtained through the precipitation of a water-insoluble matrix initially dissolved in an organic solvent approved for parenteral injection [5, 6]. Although this approach led to the recent commercialization of a leuprolide/poly(lactide/glycolide) (PLGA) injectable implant [7], the local reaction generated by the large amounts of solvent (>50% NMP) remains a concern [2]. Also, as for other PLGA-based systems, polymer degradation produces acidic metabolites that can be detrimental to labile compounds [8].

Organogelators consist of non-polymeric, low-molecular weight (MW) molecules that have the fascinating capacity to self-assemble in organic liquids at low concentrations into thermoreversible gels [9]. The gels are usually prepared by dissolving a gelator in an organic solvent by heating and then cooling the sol to a gel. Upon cooling, non-covalent intermolecular interactions, such as H-bonds, π - π stacking, electrostatic interactions, and London dispersion forces, establish between

the molecules, leading to various supramolecular entangled structures ranging from fibres to strands, or tapes. The resulting three-dimensional network prevents the solvent from flowing and confers solid-like properties to the system [10].

Different molecular architectures have the ability to gel organic liquids. They do not necessarily share a common backbone, and minor modifications of their chemical structure can have a dramatic impact on their gelling properties [11, 12]. Organogelators are generally classified into non-hydrogen-bond- or hydrogen-bond-based systems [13]. Anthracene, anthraquinone, and steroid-based molecules belong to the family of non-hydrogen-bond-based gelators. Their aggregation is mainly driven by π - π stacking interactions and solvophobic effects. Hydrogen-bond-based gelators are more common, and their dominating structural motifs are amino acids, amide and urea moieties, and carbohydrates.

Organogels have numerous industrial applications due to the great diversity of structures that they display on microscopic and mesoscopic scales. They have been mainly used as templates for the synthesis of novel inorganic and organic structures [14-17]. In the pharmaceutical field, organogels have been investigated as transdermal delivery systems [18, 19] and sustained release formulations [20-22]. In comparison to polymeric matrices, they offer attractive characteristics, including ease of preparation and absence of acidic degradation products [8].

Recently, amphiphilic derivatives of L-alanine were demonstrated to form gels in situ when admixed with vegetable oils and low amounts of organic solvents approved for parenteral use [23]. The resulting implants exhibited good biocompatibility following subcutaneous (s.c.) administration and degraded over several weeks, depending on the nature of the L-alanine derivative [24]. In the present work, their ability to prolong the delivery of parenteral drugs and induce a sustained pharmacological effect was established for the first time with leuprolide acetate as model hydrophilic peptide. The latter is a potent agonist of luteinizing hormone-releasing hormone used in the palliative treatment of hormonally-dependent prostate cancer, endometriosis, and precocious puberty [25].

3.2. Materials and methods

3.2.1. Materials

N-Stearoyl-L-alanine methyl ester (SAM) and *N*-stearoyl-L-alanine ethyl ester (SAE) were synthesized as described by Motulsky *et al* [24]. Super-refined safflower oil, polysorbate 20 (Crillet[®] 1 NF), and sorbitan trioleate (Crill[®] 45) were from Croda Inc. (Toronto, ON, Canada). *N*-methyl pyrrolidone (NMP) and poly(ethylene glycol) (PEG, MW = 8,000 g/mol), were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Microtainer tubes with ethylenediamine tetraacetate (EDTA), acetonitrile, EDTA-dipotassium salt (EDTA-K₂), sodium chloride (NaCl), sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄), sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄), potassium phosphate dibasic (K₂HPO₄), and sodium azide (NaN₃) were obtained from Fisher Scientific (Montreal, QC, Canada). Leuprolide acetate (MW = 1,269 g/mol) was supplied by Mallinckrodt Inc. (St. Louis, MO). Aprotinine was procured from Amersham Biosciences (Oakville, ON, Canada). Trifluoroacetic acid (TFA) was from Pierce (Rockford, IL). Lysozyme was purchased from Roche (Laval, QC, Canada). Goat anti-rabbit gamma globulin serum was obtained from Immunocorp (Montreal, QC, Canada). Protease-free BSA was from Serologicals Proteins, Inc. (Kankakee, IL). SepPak C₁₈ 100 mg cartridges were procured from Waters (Milford, MA). ¹²⁵I-leuprolide (255 μCi/ml) was prepared according to the procedure of Ong *et al* [26].

3.2.2. Preparation of implants

The injectable formulations were prepared in three steps. First, an organosol was prepared by dissolving 7.5 or 10% (*w/v*) SAM or SAE in safflower oil at 90°C in the presence of 10% (*v/v*) NMP. This organic solvent reduces the extent of intermolecular interaction between the organogelator molecules by creating H-bonding with the latter, thereby inhibiting gelation upon cooling. Second, a water-in-oil (*w/o*) emulsion (water:safflower oil, 20/80 *v/v*, $d_n = 33.7 \pm 5.4 \mu\text{m}$ as determined by optical microscopy) containing 5.6% (*w/v*) leuprolide, 0.45% (*w/v*) sorbitan trioleate, and 1.55% (*w/v*) polysorbate 20 was prepared. To do so, an aqueous

solution of the drug was mixed with safflower oil and surfactants using a standard vortex mixer at maximum speed for 3 min. Finally, this emulsion was mixed with a 10-fold volume of the organosol at 60°C. A control formulation consisting of a w/o emulsion without the organogelator was also prepared. All constituents of the implant were sterilized either by autoclave or sterile filtration.

3.2.3. *In vitro* release of leuprolide

Different formulations (organogels and a control w/o emulsion) were prepared as described above and spiked with 0.5 μCi ^{125}I -leuprolide during the emulsification step (see section 3.2.2). Four hundred μl of each formulation was loaded into Float-a-Lyzer[®] dialysis tubes (Fisher Scientific, MW cut-off 100,000 Da) and dialyzed against 450 ml of phosphate-buffered saline (53 mM Na_2HPO_4 , 13 mM NaH_2PO_4 , 75 mM NaCl, pH 7.4) containing 1% (w/v) BSA and 0.1% (w/v) NaN_3 at 37°C. One-ml aliquots were withdrawn periodically from the release medium over 72 h, and ^{125}I radioactivity was measured by γ -counting in a LKB Wallac 1277 Gammamaster (Fisher Scientific). It was verified that the aqueous solution of leuprolide was completely released from the dialysis tube within 72 h (70 and 90% released after 8 and 24 h, respectively). Experiments were performed in triplicate.

3.2.4. High performance liquid chromatography (HPLC) method

The concentration of leuprolide in the different formulations was measured by reverse-phase-HPLC. First, leuprolide was extracted six times with water-saturated ether and then passed on a Sep-Pak cartridge to eliminate any residual surfactant using a solution of acetonitrile/water/TFA (36:63.9:0.1 v/v/v) for elution of the drug. Leuprolide solutions were then evaporated and the drug was resuspended in a determined volume of mobile phase. A Gilson Model 302 system (Gilson, Middleton, WI) equipped with a Model 116 UV detector (Gilson), a Gilson 234 autoinjector, a C_{18} column (218TP54 Vydac, Hesperia, CA) (300 Å, 5 μm , 4.6 \times 250 mm), and Gilson 712 HPLC software (version 1.30) were used to determine the concentration of leuprolide in the formulations. The mobile phase was

acetonitrile/water/TFA (72.0:27.9:0.1 v/v/v). The flow rate, detection wavelength, and injection volume were set at 1 ml•min⁻¹, 230 nm and 50 µl, respectively.

3.2.5. Pharmacokinetic study

All animal experimental procedures followed a protocol approved by an in-house ethics committee in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines. Male Wistar rats (275-300 g, n = 5-6 per group) (Charles River, St. Constant, QC, Canada) were housed for 1 week under controlled conditions (12 h light/dark schedule, 24°C) prior to the initiation of the experiment. They were fed rat chow and received tap water *ad libitum*. The rats were given a single s.c. injection of w/o emulsion (negative control) or 7.5/10% (w/v) SAM or SAE organosol formulations (400 µl, 7.5 mg/kg leuprolide) in the dorsal area with a 25-gauge syringe. Blood samples were collected periodically *via* the jugular vein under isoflurane anesthesia and immediately transferred to pre-chilled Microtainer[®] tubes containing EDTA and aprotinine (0.2 µM) [27]. They were centrifuged at 4°C and 1,300•g for 20 min to collect plasma. Plasma samples were kept frozen at -20°C until analysis. Body fluids were replaced by an equivalent volume of physiological saline.

3.2.6. Leuprolide and testosterone radioimmunoassays (RIA)

Collected plasma samples or leuprolide standards (25 µl, 1.2 – 4,840 pg/ml), phosphate buffer (275 µl, 0.14 M NaCl, 0.02% w/v NaN₃, 25 mM EDTA-K₂, 0.2% w/v lysozyme, 10 mM K₂HPO₄, pH 7.4), ¹²⁵I-leuprolide (100 µl, ~6 nCi), and in-house antiserum (100 µl; final dilution 1:60,000 v/v) were successively placed in polypropylene tubes, and the mixtures were incubated overnight at 4°C. The antibody-bound fraction of leuprolide was precipitated with a solution of 0.2% (v/v) goat anti-rabbit gamma globulin in 12% (w/v) PEG, and centrifuged for 30 min at 2,000•g and 4°C. ¹²⁵I-Leuprolide content in the pellet was quantified by γ-counting. Data were analyzed with the RIAFit program based on the 4-parameter logistic equation [28]. Leuprolide was assayed in triplicate. Plasma testosterone was assayed in duplicate with a kit from MP Biomedicals (Orangeburg, NY). Pharmacokinetic

parameters were calculated with Origin[®] 6.1 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA). Areas under the curve (AUC) of leuprolide profiles were calculated by the trapezoidal method from day 0 to the last day of release.

3.2.7. Statistical analysis

Tests for significant differences between the means of pharmacokinetic parameters were carried out by one-way analysis of variance. Differences were considered statistically significant for p-values lower than 0.05.

3.3. Results and discussion

In this study, the release properties of novel *in situ*-forming lipid implants composed of L-alanine derivatives, vegetable oil, low amount of FDA-approved hydrophilic solvent (*i.e.*, 10% (v/v) NMP), and an emulsified aqueous solution of leuprolide were investigated. The presence of NMP in the mixture partially disrupts the interactions between gelator molecules, maintaining the formulation in a sol state and allowing injection of the formulations at room temperature (Fig. 1). The gelation process is driven by the formation of noncovalent forces (such as H bonds and van der Waals interactions) between the organogelator molecules [24]. Upon administration, the hydrophilic solvent diffuses in the surrounding tissues, eliciting gelation and entrapment of the water droplets in the organogelator network. The bottom panel of Fig. 1 presents a photomicrograph of a gelled implant containing leuprolide-loaded water droplets dispersed in a 3-D fibre network. With time, oval-shaped implants formed *in situ* slowly degrade *in vivo* and release their payload.

The sustained release properties of the organogels and control emulsion were first evaluated *in vitro* during 72 h. Monitoring of the release kinetics over longer periods was considered to be unnecessary given that the release medium can not mimic the enzymatic degradation by lipases and esterases that is likely to occur *in vivo* [29]. Based on our previous study [24], 2 different L-alanine derivatives, namely SAM and SAE, were selected because they both allow the preparation of solid implants at 37°C at relatively low concentrations (<15%). As shown in Figure 2, the control emulsion released about 40% of its payload within the first 6 h,

whereas the drug release associated with the organogels did not exceed 10% over the same period. The 3-D network obtained by the self-assembly of the organogelator molecules into fibre-like structure is thought to create a physical barrier which reduces the movements of the aqueous droplets in the oily phase and slows down the diffusion of the drug. Increasing the proportion of SAM from 7.5 to 10% in the formulation slightly reduced the initial release rate, although both formulations delivered the same amount of drug after 72 h. The lower initial release observed at higher SAM concentration can be attributed to the higher density of the fibre network. Indeed, Motulsky *et al.* previously demonstrated that the phase transition temperature of the system [24], as well as the gel strength [30] increased with the concentration of SAM in safflower oil. Interestingly, the nature of the organogelator also influenced the *in vitro* release rate as 10% SAM gels seemed to better retain leuprolide than 10% SAE gels (24.0 ± 1.4 vs. $34.4 \pm 5.9\%$ released after 72 h, respectively – $p < 0.05$). The greater retention properties of the SAM system may be related to its faster gelation kinetics and/or to its lower porosity due to a better molecular packing of the organogelator molecules. Although this issue was not investigated in detail, characterization of the implants by DSC and texture analysis showed that the 10% SAM system exhibited a higher gel-sol phase transition temperature than its SAE counterpart (58 vs. 46°C) [24] and a 30% increase in strength [30]. The greater stiffness of SAM gels was attributed to a higher level of H-bonding between the amide functions of the organogelator, which, in case of SAE, was partially hindered by the ethyl group [24].

The formulations and the control emulsion were subsequently injected s.c. in rats. The plasma levels of leuprolide as well as its pharmacological effect (*i.e.* inhibition of testosterone secretion) were monitored for 35 and 50 days, respectively. In the days following administration of the implants, no apparent signs of morbidity (*e.g.* weight loss) or dermal reaction were observed in the animals. Mean body weights were comparable among the gel-treated and control groups (data not shown). The pharmacokinetic profiles and parameters of the injected leuprolide formulations are presented in Figure 3 and Table I, respectively. The plasma concentration profiles of testosterone are illustrated in Figure 4. Immediately after

injection (<3 h), all formulations manifested a burst release which is possibly due to the immediate diffusion of NMP that drifts part of the emulsified drug in the surrounding tissue. Eventually, this burst could be minimized by decreasing both the proportion of NMP in the formulation and the size of water droplets of the emulsion.

Consistent with the *in vitro* study, leuprolide was completely released from the control emulsion within 3-4 days and resulted in no chemical castration (Fig. 4 and Table I). Conversely, the organogels were able to release leuprolide over 3 to 4 weeks, with the area under the plasma concentration *vs.* the time curve (AUC) exceeding by 5- to 6-fold that of the control emulsion. SAE implants exhibited the fastest release and shortest chemical castration time (11 days) (*i.e.* time during which plasma testosterone is lower than 0.5 ng/ml). SAM 7.5% and 10% implants yielded similar drug release profiles in terms of total AUC ($p > 0.05$), but chemical castration was significantly longer for 10% gels (Table I). This might be related to the slightly higher plasma concentrations provided by 10% SAM implants during the last days of the pharmacokinetic study (Fig. 3). Furthermore, consistent with the *in vitro* experiments, the initial burst (C_{max}) seemed to decrease when the proportion of organogelator increased in the implant (7.5 *vs.* 10%), although the difference was not statistically significant ($p = 0.30$).

Implants prepared with SAE released leuprolide more rapidly than those obtained with SAM. This result corroborates the findings of the *in vitro* diffusion study and may reflect differences in the diffusion rates between both systems. However, *in vivo*, additional factors such as gel degradation can impact on the release rate and resulting pharmacokinetic profile. The implants are mainly constituted of a vegetable oil and a hydrolysable gelator whose degradation can be influenced by the porosity of the network and the packing density of the organogelator molecules. As discussed above, the intermolecular interactions are stronger for SAM, resulting in stiffer gels. Thus, it may be speculated that SAE gels are more accessible to enzymatic degradation than SAM implants. The latter were indeed recently shown to persist up to 8 weeks after administration [24], whereas SAE implants completely degraded between weeks 6 and 8 (unpublished data).

This first pharmacokinetic investigation demonstrates that L-alanine-based implants can sustain leuprolide delivery for a prolonged period (14 to 25 days) and induce chemical castration to a level and duration corresponding to the once-a-month Lupron Depot[®] microsphere formulation [31]. In terms of release rate, these results compare advantageously to other *in situ*-gelling systems such as the widely-studied thermosetting hydrogels prepared with poly(ethylene oxide)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene oxide) (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO, poloxamer) [32] or PEO/PLGA copolymers [33], which poorly retain for low-MW water-soluble drugs. For instance, Bhardwaj and Blanchard reported that poloxamer 407 gels could release Melanotan-I within 24 h after intraperitoneal injection in guinea pig [35]. Similarly, hydrophilic glucagon-like peptide-1 was delivered in rats for about 2 weeks from biodegradable low-MW PLGA-PEO-PLGA gels [35]. Furthermore, previous studies by our group on temperature-sensitive chitosan hydrogels demonstrated that small molecules freely diffused through the hydrated matrix of such systems, and were completely released within 2 days [4, 36]. Despite their attractive characteristics, preceding studies with organogels have so far been unsuccessful with regard to prolonged systemic release. For example, the release of bovine serum albumin (BSA) from non-ionic surfactant-based organogels was shown to last only 2 days after intramuscular injection in mice [20, 21]. The fast release of the loaded molecules was attributed to rapid erosion, break-up, and emulsification of the implant *in vivo*. The present study paves the way to the utilization of L-alanine-based organogels for the long-term systemic delivery of drug. Future work will focus on understanding the influence of the mechanisms implicated in the gelation procedure on the release rate.

3.4. Conclusion

In conclusion, the successful development of injectable leuprolide-loaded organogels based on L-alanine derivatives demonstrates the potential of such systems as parenteral implants for the systemic, sustained delivery of low-MW hydrophilic drugs. Simple to prepare, easy to handle, biodegradable, and safe, these organogels represent attractive alternatives to hydrogels and other *in situ*-forming

implants for the long-term delivery of drugs. Future work will aim at further characterizing the network structure and assessing how parameters such as the content and nature of the hydrophilic solvent, as well as oil composition, influence the release properties of the system.

3.5. Acknowledgements

This work was supported in part by the Canada Research Chair program.

3.6. References

1. V.R. Sinha, A. Trehan, Biodegradable microspheres for protein delivery, *J. Control. Release* 90 (2003) 261-280.
2. A. Hatefi, B. Amsden, Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems, *J. Control. Release* 80 (2002) 9-28.
3. C. Matschke, U. Isele, P. van Hoogevest, A. Fahr, Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products, *J. Control. Release* 85 (2002) 1-15.
4. E. Ruel-Gariépy, M. Shive, A. Bichara, M. Berrada, D. Le Garrec, A. Chenite, J.-C. Leroux, A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 53-63.
5. R.E. Eliaz, J. Kost, Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins, *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2000) 388-396.
6. F.W. Okumu, L.N. Dao, P.J. Fielder, N. Dybdal, D. Brooks, S. Sane, J.L. Cleland, Sustained delivery of human growth hormone from a novel gel system : SABER™, *Biomaterials* 23 (2002) 4353-4358.
7. H.B. Ravivarapu, K.L. Moyer, R.L. Dunn, Sustained suppression of pituitary-gonadal axis with an injectable, *in situ* forming implant of leuprolide acetate, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 732-741.

8. K. Mäder, B. Bittner, Y. Li, W. Wohlauf, T. Kissel, 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 blocks and hydrophilic poly(ethyleneoxide) B blocks, *Pharm. Res.* 15 (1998) 787-793.
9. P. Terech, R.G. Weiss, Low molecular mass gelators of organic liquids and the properties of their gels, *Chem. Rev.* 97 (1997) 3133-3159.
10. D.J. Abdallah, R.G. Weiss, Organogels and low molecular mass organic gelators, *Adv. Mater.* 12 (2000) 1237-1247.
11. R. Mukkamala, R.G. Weiss, Physical gelation of organic fluids by anthraquinone-steroid-based molecules. Structural features influencing the properties of gels, *Langmuir* 12 (1996) 1474-1482.
12. D.R. Trivedi, A. Ballabh, P. Dastidar, B. Ganguly, Structure-property correlation of a new family of organogelators based on organic salts and their selective gelation of oil from oil/water mixtures, *Chem. Eur. J.* 10 (2004) 5311-5322.
13. O. Gronwald, E. Snip, S. Shinkai, Gelators for organic liquids based on self-assembly : a new facet of supramolecular and combinatorial chemistry, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7 (2002) 148-156.
14. M. Shirakawa, N. Fujita, S. Shinkai, [60]Fullerene-motivated organogel formation in a porphyrin derivative bearing programmed hydrogen-bonding sites, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 9902-9903.
15. C. Shi, Z. Huang, S. Kilic, J. Xu, R.M. Enick, E.J. Beckman, A.J. Carr, R.E. Melendez, A.D. Hamilton, The gelation of CO₂ : a sustainable route to the creation of microcellular materials, *Science* 286 (1999) 1540-1543.
16. J.H. Jung, Y. Ono, K. Hanabusa, S. Shinkai, Creation of both right-handed and left-handed silica structures by sol-gel transcription of organogel fibers comprised of chiral diaminocyclohexane derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 5008-5009.
17. S.-I. Tamaru, M. Takeuchi, M. Sano, S. Shinkai, Sol-Gel transcription of sugar-appended porphyrin assemblies into fibrous silica : unimolecular stacks versus helical bundles as templates, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 853-856.

18. H. Willmann, P. Walde, P.L. Luisi, A. Gazzaniga, F. Stroppolo, Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs, *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 871-874.
19. H.L. Willmann, P.L. Luisi, Lecithin organogels as matrix for the transdermal transport of drugs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177 (1991) 897-900.
20. S. Murdan, G. Gregoriadis, A.T. Florence, Sorbitan monostearate/polysorbate 20 organogels containing niosomes : a delivery vehicle for antigens ? *Eur. J. Pharm. Sci.* 8 (1999) 177-185.
21. S. Murdan, B. van den Bergh, G. Gregoriadis, A.T. Florence, Water-in-sorbitan monostearate organogels (water-in-oil gels), *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 615-619.
22. Z.-H. Gao, W.R. Crowley, A.J. Shukla, J.R. Johnson, J.F. Reger, Controlled release of contraceptive steroids from biodegradable and injectable gel formulations : *in vivo* evaluation, *Pharm. Res.* 12 (1995) 864-868.
23. A.-C. Couffin-Hoarau, A. Motulsky, P. Delmas, J.-C. Leroux, *In situ*-forming pharmaceutical organogels based on the self-assembly of L-alanine derivatives, *Pharm. Res.* 21 (2004) 454-457.
24. A. Motulsky, M. Lafleur, A.-C. Couffin-Hoarau, D. Hoarau, F. Boury, J.-P. Benoit, J.-C. Leroux, Characterization and biocompatibility of organogels based on L-alanine for parenteral drug delivery implants, *Biomaterials* 26 (2005) 6242-6253.
25. G.L. Plosker, R.N. Brogden, Leuprorelin – A review of its pharmacology and therapeutic use in prostatic cancer, endometriosis and other sex hormone-related disorders, *Drugs* 48 (1994) 930-967.
26. H. Ong, N. McNicoll, E. Escher, R. Collu, R. Deghenghi, V. Locatelli, E. Ghigo, G. Muccioli, M. Boghen, M. Nilsson, Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labelling, *Endocrinology* 139 (1998) 432-435.
27. S. Marleau, H. Ong, M. Brochu, N. Yamaguchi, A. de Léan, P. du Souich, Endogenous atrial natriuretic factor after endopeptidase 24.11 inhibition by thiorphan, *Peptides* 11 (1990) 387-391.

28. A. de Lean, P.J. Munson, D. Rodbard, Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves : application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves, *Am. J. Physiol.* 235 (1978) E97-E102.
29. L. Appel, K. Engle, J. Jensen, L. Rajewski, G. Zentner, An in vitro model to mimic in vivo subcutaneous monoolein degradation, *Pharm. Res.* (1996) S217.
30. A. Motulsky, Caractérisation d'un organogel à base d'un dérivé amphiphile de la L-alanine, Master thesis, Université de Montréal (2005), 94 pages.
31. H. Okada, T. Heya, Y. Ogawa, H. Toguchi, T. Shimamoto, Sustained pharmacological activities in rats following single and repeated administration of once-a-month injectable microspheres of leuprolide acetate, *Pharm. Res.* 8 (1991) 584-587.
32. E. Ruel-Gariépy, J.-C. Leroux, In situ-forming hydrogels – review of temperature-sensitive systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 409-426.
33. B. Jeong, S.W. Kim, Y.H. Bae, Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 37-51.
34. R. Bhardwaj, J. Blanchard, Controlled-release delivery system for the α -MSH analog melanotan-I using poloxamer 407, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 915-919.
35. S. Choi, M. Baudys, S.W. Kim, Control of blood glucose by novel GLP-1 delivery using biodegradable triblock copolymer of PLGA-PEG-PLGA in type 2 diabetic rats, *Pharm. Res.* 21 (2004) 827-831.
36. E. Ruel-Gariépy, A. Chenite, C. Chaput, S. Guirguis, J.-C. Leroux, Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs, *Int. J. Pharm.* 203 (2000) 89-98.

Table I. Pharmacokinetic parameters of the different formulations injected in rats.

Formulation	T _{max} ± SD (min)	C _{max} ± SD (ng/ml)	AUC ± SD (ng•day/ml)	Release of leuprolide ± SD (day) ^a	Chemical castration ± SD (day) ^b
w/o emulsion	140 ± 82	721 ± 289	58 ± 52	3.4 ± 2.5	-
7.5% SAM	114 ± 81	720 ± 381	337 ± 101*	25 ± 3*	30 ± 4*
10% SAM	80 ± 31	539 ± 207	367 ± 113*	25 ± 4*	45 ± 10* **
10% SAE	90 ± 42	993 ± 214 [†]	262 ± 51.7* [†]	14 ± 4* ** [†]	11 ± 8* ** [†]

^aTime during which leuprolide concentration was above the detection limit of the RIA.

^bTime during which plasma testosterone was below 0.5 ng/ml.

* p < 0.05 vs. w/o emulsion

** p < 0.05 vs. 7.5% SAM

[†] p < 0.05 vs. 10% SAM

3.7. Figure captions

Fig. 1 : *Top panel.* Schematic representation of the preparation and administration of the *in situ*-forming implants. The formulations were prepared by simple mixing of the organosol with a w/o emulsion containing dissolved leuprolide at 60°C. Gelation was partially inhibited by adding 10% v/v of NMP. Upon subcutaneous injection of the system, NMP diffuses into the surrounding medium allowing solidification of the implant. The drug is released by diffusion through the network and slow degradation of the gel. ***Bottom panel.*** Subcutaneous implant of 10% w/v SAM in safflower oil 24 hours after injection (right) and photomicrograph of the gel revealing entrapped water droplets (shown by white arrows) (magnification: 100 X).

Fig. 2 : *In vitro* release profiles of leuprolide from w/o emulsion (squares), 7.5% SAM (open circles), 10% SAM (solid circles), and 10% SAE (triangles) organogels. Mean \pm SD (n = 3).

Fig. 3 : Plasma concentrations of leuprolide after the administration of w/o emulsion (squares), 7.5% SAM (open circles), 10% SAM (solid circles), and 10% SAE (triangles) organogels. Mean \pm SEM (n = 5-6).

Fig. 4 : Plasma concentrations of testosterone after the administration of w/o emulsion (squares), 7.5% SAM (open circles), 10% SAM (solid circles), and 10% SAE (triangles) organogels. Mean \pm SEM (n = 5-6). The dotted line represents the chemical castration threshold.

Figure 1

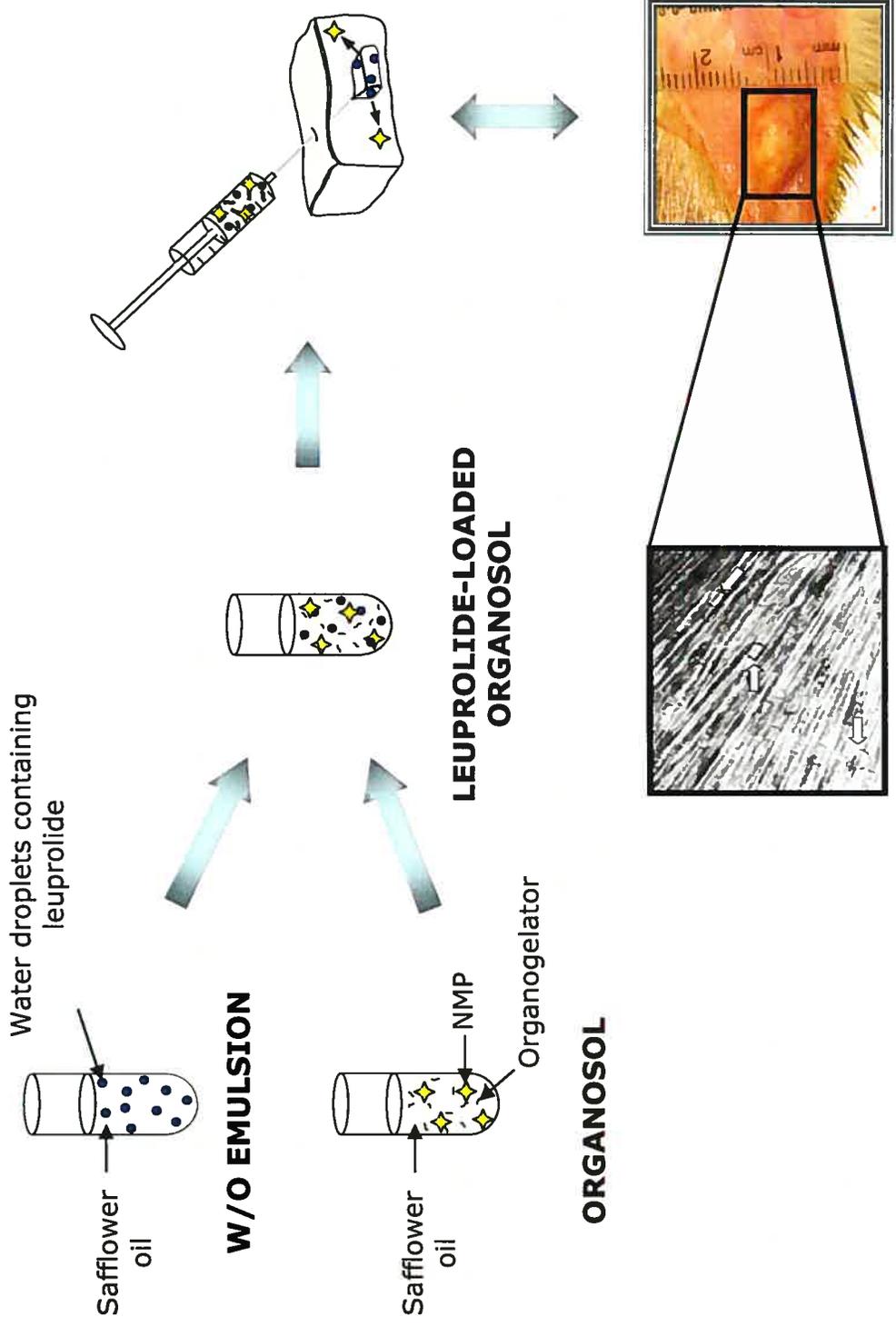


Figure 2

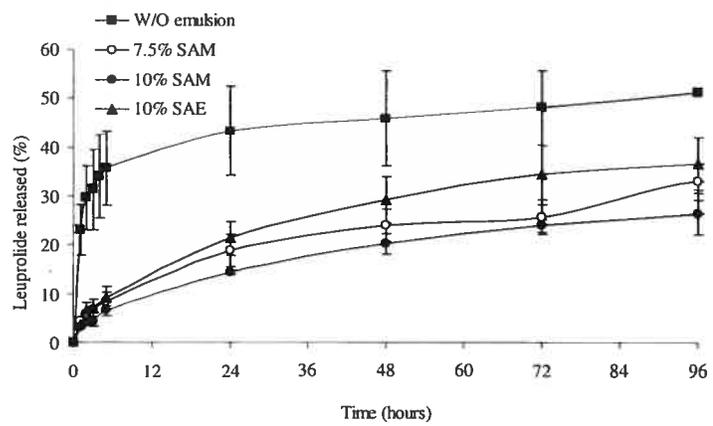


Figure 3

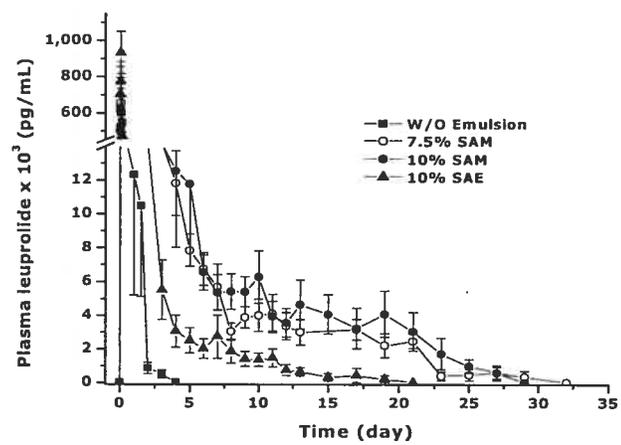
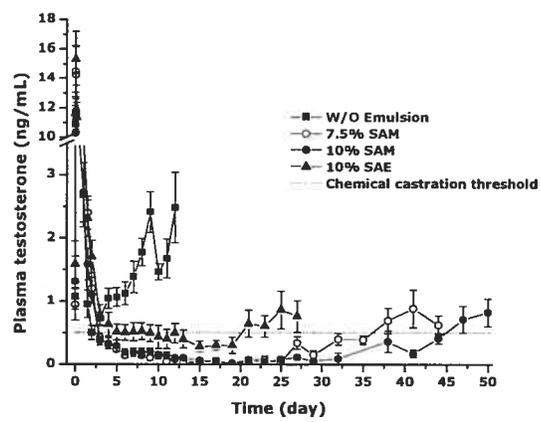


Figure 4



CHAPITRE 4. Discussion

Les formulations thermosensibles injectables sont utilisées depuis plusieurs années pour la libération prolongée de médicament. Les microsphères de polymère demeurent le système le plus répandu. Bien qu'elles libèrent un principe actif sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois (135), elles comportent quelques désavantages. Tout d'abord, les microsphères sont complexes à préparer. De plus, étant donné qu'une telle formulation est à l'état liquide, la migration des microsphères à partir du site d'injection (136) peut représenter un désavantage dans le cas d'une libération locale de médicament; de plus, le retrait des microsphères est impossible si toutefois la formulation déclenche des effets secondaires indésirables chez le patient. Quant aux microsphères de PLA et de PLGA, la dégradation des polymères génère des résidus acides qui peuvent altérer l'intégrité du médicament (134). Un intérêt croissant est alors porté aux gels injectables qui, lorsque soumis au processus de biodégradation, libèrent de façon prolongée le médicament qu'ils emprisonnent. Récemment, Couffin-Hoarau *et coll.* (2004) ont développé des organogélifiants dérivés de la L-alanine (36). Ajoutées à une huile végétale, ces molécules forment un réseau tridimensionnel qui laisse place à un organogel. L'addition d'un solvant organique à la formulation inhibe partiellement sa gélification, rendant son injection plus aisée. Motulsky *et coll.* (2005) ont caractérisé différents organogels puis ont montré leur biocompatibilité chez le rat. Cette étude a révélé que ces gels pouvaient persister jusqu'à huit semaines *in vivo* (47). Les organogels représentent donc une avenue intéressante pour la libération prolongée de petits médicaments hydrophiles. L'objectif de ce projet consistait à développer une formulation à base d'organogélifiant et de leuprolide et à évaluer son potentiel à libérer le médicament chez le rat. L'article publié dans *Journal of Controlled Release* fait la synthèse des travaux de recherche effectués au cours de cette maîtrise. Quelques résultats non publiés seront présentés au cours de la discussion.

4.1. Le développement de formulations d'organogélifiant pour la libération prolongée de leuprolide

En 2005, Motulsky *et coll.* ont synthétisé et caractérisé six organogélifiants qui sont des dérivés lauroyle ou stéaroyle de la L-alanine, porteuse d'une fonction acide, méthoxy ou éthoxy (47) : la *N*-lauroyle L-alanine (LA), la *N*-lauroyle méthoxy-L-alanine (LAM), la *N*-lauroyle éthoxy-L-alanine (LAE), la *N*-stéaroyle L-alanine (SA), la *N*-stéaroyle méthoxy-L-alanine (SAM) et la *N*-stéaroyle éthoxy-L-alanine (SAE). Ces molécules sont mélangées à chaud dans une huile végétale (les huiles de carthame, de soja et de maïs par exemple). Les huiles sélectionnées sont utilisées de façon régulière dans le domaine pharmaceutique et sont reconnues pour leur innocuité. En refroidissant, les organogélifiants établissent des liaisons non covalentes entre eux et forment un réseau qui empêche l'écoulement du fluide; cet état est appelé gel. Lors de l'étape de refroidissement, un solvant organique hydrophile (éthanol, *N,N*-diméthyle acétamide [DMAc] ou NMP) peut être ajouté. Les solvants qui ont été retenus pour ces travaux de maîtrise sont utilisés dans d'autres formulations à libération prolongée de médicament et sont sans danger lorsqu'ils sont administrés en faible quantité. Le solvant hydrophile ajouté empêche l'établissement de liaisons non covalentes et rend le gel moins ferme. Le développement des formulations utilisées dans le cadre de cette maîtrise fait suite aux travaux de Motulsky (137) (2005) et a été fait en étroite collaboration avec l'auteure.

Les différentes combinaisons d'huile végétale et de molécule gélifiante sont fondées sur la température de transition des gels et sur leur aspect physique. Dans un premier temps, le mélange d'huile et d'organogélifiant doit former un gel à température corporelle. Les études de température de transition menées par Motulsky ont mis en évidence qu'une augmentation de la concentration d'organogélifiant augmente la température de transition. De la même façon, l'allongement de la chaîne alkyle fait accroître la température de transition (47). De façon générale, les gels constitués de 5 à 10% *p/v* de dérivés stéaroyle ont des

températures de transition gel-liquide supérieures à 45°C alors que ces températures sont inférieures à 30°C pour les dérivés lauroyle (137). Le choix de l'huile a été basé sur l'aspect macroscopique du gel, c'est-à-dire sa fermeté, son homogénéité et l'absence de cristaux. Enfin, le solvant organique hydrophile est sélectionné selon la stabilité qu'il confère à la formulation; ce paramètre a été évalué par des analyses de viscosimétrie qui ont révélé que les mélanges d'organogélifiant et d'huile sont stables. Ainsi, quelques formulations de SAM et SAE en solution dans l'huile de carthame ont fait l'objet d'analyses *in vitro* et *in vivo* afin de tester leur capacité à libérer le leuprolide de façon prolongée (figure 4.1).

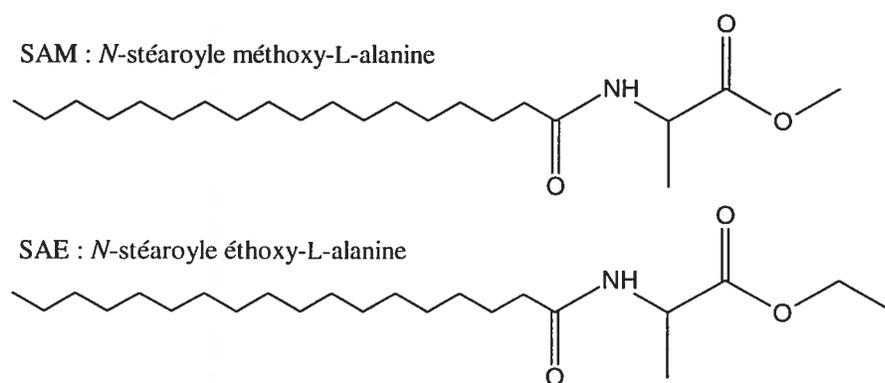


Figure 4.1. La structure moléculaire de la SAM et de la SAE, deux organogélifiants dérivés de la L-alanine.

La proportion de solvant organique dans la formulation a été déterminée selon ces deux critères : 1) l'injection de l'organogel qui est de plus en plus aisée avec des proportions croissantes de solvants organiques; 2) l'effet de la diffusion du solvant sur la libération initiale de leuprolide (effet « *burst* »). En effet, en milieu aqueux ou biologique, le solvant organique diffuse dans son environnement immédiat et le gel se solidifie. Lors de ce processus, une partie plus ou moins importante du leuprolide est entraînée hors de la matrice. Des expériences de « *burst* » ont été menées *in vitro* afin de déterminer la proportion optimale de solvant organique (figure 4.2), permettant un compromis entre la facilité d'injection et la libération minimale de médicament. Les expériences ont été réalisées avec des gels constitués de LAM dans l'huile de soja avec des proportions croissantes de DMAc. Le leuprolide était incorporé à ces gels de deux façons, la première sous forme d'une dispersion (dilution dans le solvant organique) et la seconde sous forme d'émulsion de type

eau/huile (E/H) (Annexe 1, page xiii). Ces expériences ont mis en évidence deux points importants. Premièrement, la proportion de leuprolide qui diffuse dans le milieu externe au gel augmente avec des concentrations croissantes de solvant. De plus, pour toutes les proportions testées de DMAc, une plus grande proportion de leuprolide diffuse hors de la matrice lorsqu'il est dispersé plutôt qu'émulsifié. Ainsi, nous avons opté pour un système dans lequel le médicament était émulsifié et nous nous en sommes tenus à des proportions minimales de solvant, mais suffisantes pour permettre l'injection de la formulation au moyen d'une seringue conventionnelle.

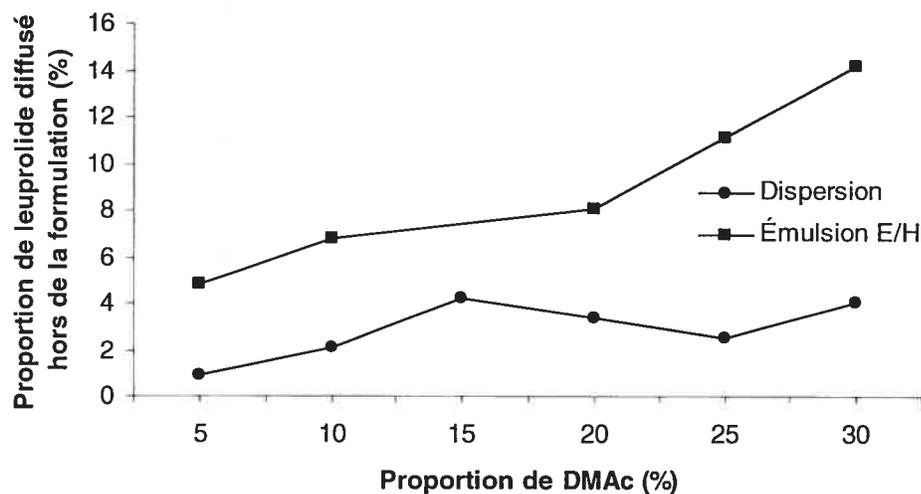


Figure 4.2. L'influence de la proportion de solvant organique dans une formulation de LAM dans l'huile de soja sur la diffusion du leuprolide hors de l'implant, *in vitro*.

4.2. Les études de libération prolongée *in vitro*

La capacité de différents organogels à libérer le leuprolide de façon prolongée a été évaluée. Pour ce faire, un système de tube à dialyse dans lequel la formulation était déposée a été utilisé. Une solution saline de leuprolide a permis de nous assurer que la totalité du médicament diffusait en moins de 24 heures : la libération prolongée du médicament était donc attribuable seulement au gel et non pas à la membrane à dialyse. Les formulations ont été préparées de la façon habituelle (consulter la section 3.2.2, page 52) en incorporant du ^{125}I -leuprolide comme traceur. Les études de libération se sont déroulées sur une période de quatre jours; nous

n'avons pas jugé nécessaire de poursuivre l'étude *in vitro* plus longtemps, car un tampon phosphate isotonique ne pouvait simuler à lui seul la dégradation à laquelle la formulation est soumise chez l'animal. Au total, trois formulations d'organogel ont été évaluées, deux à base de SAM et une, de SAE. Ces formulations ont été sélectionnées parce qu'elles sont à l'état solide à 37°C à une faible concentration d'organogélifiant ($\leq 10\%$). Une émulsion E/H a servi de contrôle négatif. Environ 40% du leuprolide contenu dans l'émulsion a été libéré en 6 heures. Après quatre jours, 50% du contenu en médicament avait été relâché. La présence d'un organogélifiant dans la formulation a permis de ralentir la libération du principe actif. En effet, les gels ont libéré plus ou moins 10% du leuprolide après 6 heures. Deux formulations de SAM ont été testées (7.5 et 10% dans l'huile de carthame); l'augmentation de la proportion d'organogélifiant dans la matrice a permis de réduire légèrement la vitesse de libération. Les tests statistiques n'ont révélé aucune différence significative entre les profils des deux formulations, mais les résultats laissent tout de même croire qu'une augmentation de la proportion d'organogélifiant ralentirait la libération du médicament. Ce phénomène peut s'expliquer par une densité plus élevée du réseau de fibres établi par les molécules gélifiantes, se traduisant par une porosité inférieure pour les gels plus concentrés en organogélifiant. Ces hypothèses sont soutenues par le fait que la température de transition gel-liquide (47) et que la fermeté d'un gel (137) augmentent pour des concentrations croissantes de SAM dans l'huile de carthame.

Nous avons mis en évidence que le type d'organogélifiant utilisé influençait aussi les profils de libération du leuprolide. En effet, les gels à 10% SAM relâchaient plus lentement le leuprolide que ceux à 10% de SAE (26 vs. 37% libéré après quatre jours respectivement). Plusieurs raisons peuvent expliquer les meilleures propriétés de rétention de la SAM par rapport à la SAE : une cinétique de gélification plus rapide et une porosité plus faible due à un meilleur empilage moléculaire de la SAM. Les tests de gélification (réalisés par la méthode du tube inversé et par analyse thermique différentielle) ont montré que les gels à 10% SAM dans l'huile de carthame ont une température de transition gel-liquide supérieure à celle des gels à 10% SAE (58 vs. 46°C respectivement) (47). De plus, des analyses préliminaires de

texture ont mis en évidence la plus grande fermeté des gels de SAM par rapport à ceux de SAE, un phénomène expliqué par un plus grand nombre de ponts hydrogène qui s'établissent entre les fonctions amide des organogélifiants. Pour les molécules de SAE, ces liaisons seraient plus faibles en raison de l'encombrement stérique important provoqué par le groupement éthyle (137).

4.3. Les études pharmacocinétiques chez le rat

Les formulations évaluées *in vitro* ont fait l'objet d'études *in vivo* et ont été administrées chez des rats mâles par la voie sous-cutanée. Des échantillons de sang ont été prélevés pendant sept semaines pour doser les taux de leuprolide. Les concentrations de testostérone ont aussi été analysées afin d'évaluer l'effet pharmacologique induit par le médicament (c'est-à-dire la castration chimique). Une évaluation sommaire du bilan de santé des animaux a été réalisée tout au long de l'étude. Aucun signe de morbidité (diminution de la masse corporelle par exemple) ni de réaction dermatologique au site d'injection n'ont été observés tout au long de l'étude. La masse corporelle des rats du groupe contrôle était comparable à celle des groupes traités (résultats non présentés). Les profils des concentrations de leuprolide et de testostérone sont illustrés aux figures 3 et 4 des pages 67 et 68; les paramètres pharmacocinétiques sont regroupés dans le tableau I de l'article (voir en page 63). Pour toutes les formulations, les concentrations de leuprolide augmentaient de façon abrupte immédiatement après l'injection, un phénomène aussi observé dans les études *in vitro*. Lorsque l'organogel est injecté, la NMP qu'il contient diffuse rapidement dans le tissu environnant, entraînant avec lui une partie du médicament émulsifié.

Nous avons montré que le leuprolide était libéré rapidement de l'émulsion E/H (trois à quatre jours) et n'induisait pas de castration chimique. Par contre, toutes les formulations d'organogel libéraient de façon prolongée le médicament (jusqu'à trois à quatre semaines). Les aires sous la courbe des profils d'organogels étaient de cinq à six fois supérieures à celle de l'émulsion contrôle. Des trois formulations testées, celle à base de SAE a libéré le leuprolide le plus rapidement (14 jours) et a induit la castration chimique la plus courte (11 jours). Quant aux gels de SAM (7.5 et 10%),

ils présentaient des profils pharmacocinétiques semblables l'un à l'autre quant au temps de libération (25 jours) et à l'aire sous la courbe (environ 350 ng·jour/mL). Par contre, la castration chimique était beaucoup plus longue pour la formulation à plus forte teneur en SAM (30 vs. 45 jours pour les inserts à 7.5 et 10% SAM respectivement). Ceci pourrait s'expliquer par une différence légère dans la partie terminale du profil de libération du leuprolide. En effet, le profil obtenu avec les gels à 10% SAM révèle des concentrations plasmatiques légèrement supérieures en leuprolide comparativement à celui observé avec les gels à 7.5% SAM. De plus, bien que la différence ne soit pas statistiquement significative, une augmentation de la proportion d'organogélifiant semble réduire la valeur de la concentration plasmatique maximale (C_{max}).

Les études *in vitro* ont mis en évidence que les gels de SAE libèrent le leuprolide plus rapidement que les gels de SAM. Ces résultats ont été corroborés par les expériences menées chez le rat. Par contre, plusieurs paramètres biologiques sont en mesure d'influencer la vitesse de libération du principe actif, notamment le taux de dégradation des gels. Les inserts sont principalement constitués d'une huile végétale et d'un organogélifiant susceptible de subir une dégradation par un mécanisme d'hydrolyse. La dégradation du SAE et du SAM dépend de plusieurs facteurs, notamment la porosité du gel et la densité du réseau tridimensionnel établi lors de l'auto-assemblage des molécules d'organogélifiant. Tel que mentionné plus tôt, les travaux de Motulsky (2005) ont montré que les interactions intermoléculaires sont plus fortes pour la SAM que pour la SAE (137), ce qui expliquerait la plus grande fermeté des gels de SAM. Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse que les molécules de SAE seraient plus exposées et accessibles à la dégradation enzymatique que celles de SAM. Des études de biocompatibilité ont d'ailleurs révélé que les gels de SAM persistaient plus longtemps chez le rat que les gels de SAE (8 vs. 6 semaines respectivement) (47).

Ces travaux de maîtrise ont montré pour la première fois que des formulations à base d'organogélifiant ont la capacité de libérer de façon prolongée un médicament (14 à 25 jours) et d'induire un effet pharmacologique soutenu. Les taux plasmatiques de leuprolide, la durée de libération et l'effet pharmacologique sont tous les trois

similaires à ceux induits par les microsphères de Lupron^{MC} dépôt 1 mois. Les formulations d'organogels développées au cours de ces travaux de maîtrise présentent plusieurs avantages. Tout d'abord, les formulations sont constituées d'excipients acceptés en administration parentérale et sont biocompatibles (47), ce qui atteste de leur innocuité. La synthèse des molécules gélifiantes est simple (47) et beaucoup plus facile à contrôler que celle de polymères. Les étapes de préparation des organogels sont aisées et peu nombreuses. De plus, ces formulations n'ont pas besoin d'être reconstituées immédiatement avant l'injection.

Les organogels se comparent avantageusement par rapport à d'autres types de formulations thermosensibles injectables, notamment les hydrogels de poloxamer et les copolymères PEO/PLGA. Ces matrices retiennent peu les médicaments de petite masse moléculaire. Par exemple, des travaux menés chez le cobaye avec des gels de poloxamer 407 en administration intrapéritonéale ont mis en évidence la libération rapide de la mélanotane-I (24 heures) (138). De la même façon, des gels à base de PLGA-PEO-PLGA de faible masse moléculaire et renfermant le GLP-1 ont été étudiés chez des rats diabétiques de type 2. Le peptide était libéré sur une période de deux semaines. Des travaux effectués par notre groupe de recherche avec des hydrogels de chitosan ont montré une diffusion rapide du paclitaxel; cet anticancéreux de petite taille était faiblement retenu par le gel et traversait le réseau intermoléculaire en deux jours (139).

Même si les organogels présentent des propriétés intéressantes, leur utilisation par d'autres équipes de recherche a été relativement infructueuse pour assurer une libération prolongée de médicament. Des organogels de tensioactif non ionique contenant de l'albumine comme molécule hydrophile modèle ont été évalués chez les souris (administration intramusculaire). L'érosion du gel, sa désagrégation et son émulsification en surface sont trois phénomènes auxquels on attribue la libération rapide de l'albumine (67).

CHAPITRE 5. Conclusion

Dans le cadre de ces travaux de maîtrise, nous avons développé différentes formulations à base d'organogélifiant en solution dans une huile pharmaceutique. Le leuprolide était incorporé sous forme d'émulsion E/H dans l'organogel. L'organogélifiant, l'huile pharmaceutique et le solvant organique ont été choisis selon la température de transition du gel, l'aspect physique, la fermeté du gel et sa stabilité. Les formulations ont été testées *in vitro* puis *in vivo* et ont révélé qu'une augmentation de la proportion d'organogélifiant dans la formulation formait des gels plus fermes ce qui permettait de réduire la vitesse de libération de médicament. De plus, à proportion égale, les gels de SAM libéraient le médicament sur une plus longue période de temps. Ces travaux confirment ceux de Trivedi *et coll.* (2004) qui ont montré qu'une modification mineure dans la structure chimique d'une molécule peut entraîner des changements majeurs sur ses propriétés gélifiantes (52). Chez le rat, le leuprolide était libéré pendant près de quatre semaines et induisait une castration chimique pendant 45 jours, des résultats qui se comparent avantageusement aux autres formulations d'organogels.

Les résultats que nous avons obtenus sont fort encourageants et prometteurs quant à la capacité de développer des formulations à libération prolongée à base d'organogélifiant. En modifiant le procédé de préparation des formulations, le temps de libération du médicament peut être allongé et la libération initiale (« *burst* »), diminuée. Une augmentation de la proportion d'organogélifiant (au-delà de 10%) contribuerait à former des gels plus fermes qui pourraient persister plus longtemps dans un milieu biologique et ainsi allonger le temps de libération du médicament. De plus, la réduction de la taille des gouttelettes d'émulsion avec un homogénéisateur à haute pression et la diminution de la proportion de solvant organique dans la formulation sont deux facteurs qui pourraient prévenir la libération importante de médicament suite à l'injection de l'organogel. Finalement, d'autres types d'organogélifiant peuvent être évalués, notamment les molécules de structure différente et des polymères.

Bibliographie

1. Lloyd, J.D. (1926). *Colloid Chemistry*, vol. 1. New York, The Chemical Catalog Co., p. 767.
2. Abdallah, D. J. et Weiss, R. G. (2000). Organogels and low molecular mass organic gelators, *Adv. Mater.* **12**, 1237-1247.
3. Flory, P. J. (1974). *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **57**, 7-18.
4. Wichterle, O. et Lím, D. (1960). Hydrophilic gels for biological use, *Nature* **185**, 117-118.
5. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., et Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27-46.
6. Hoffman, A. S. (2001). Hydrogels for biomedical applications, *Ann. NY Acad. Sci.* **944**, 62-73.
7. Nakayama, Y. et Matsuda, T. (1995). Newly designed hemostatic technology based on photocurable gelatin, *ASAIO Journal* **41**, M374-M378.
8. Gupta, P., Vermani, K., et Garg, S. (2002). Hydrogels : from controlled release to pH-responsive drug delivery, *Drugs Discovery Today* **7**, 569-579.
9. Obara, K., Ishihara, M., Ozeki, Y., Ishizuka, T., Hayashi, T. *et coll.* (2005). Controlled release of paclitaxel from photocrosslinked chitosan hydrogels and its subsequent effect on subcutaneous tumor growth in mice, *J. Control. Release* **110**, 79-89.
10. Creque, H. M., Langer, R., et Folkman, J. (1980). One month of sustained release of insulin from a polymer implant, *Diabetes* **29**, 37-40.
11. Rozier, A., Mazuel, C., Grove, J., et Plazonnet, B. (1989). Gelrite[®] : A novel, ion-activated, in-situ gelling polymer for ophtalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol, *Int. J. Pharm.* **57**, 163-168.
12. Park, K., Shalaby, W.S.W., et Park, H. (1993). Biodegradable hydrogels for drug delivery, Lancaster, 252 pages.
13. Jeong, B., Kim, S. W., et Bae, Y. H. (2002). Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 37-51.

14. Paavola, A., Yliruusi, J., Kajimoto, Y., Kalso, E., Wahlström, T. *et coll.* (1995). Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block, *Pharm. Res.* **12**, 1997-2002.
15. Coviello, T., Matricardi, P., et Alhaique, F. (2006). Drug delivery strategies using polysaccharidic gels, *Expert Opin. Drug Deliv.* **3**, 395-404.
16. Suisha, F., Kawasaki, N., Miyazaki, S., Shirakawa, M., Yamatoya, K. *et coll.* (1998). Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mitomycin C, *Int. J. Pharm.* **172**, 27-32.
17. Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T., et Sakurai, Y. (1994). Modulating the phase transition temperature and thermosensitivity in *N*-isopropylacrylamide copolymer gels, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **6**, 585-598.
18. Han, C. et Bae, Y. (1998). Inverse thermally-reversible gelation of aqueous *N*-isopropylacrylamide copolymer solutions, *Polymer* **39**, 2809-2814.
19. Vernon, B., Kim, S., et Bae, Y. (1999). Insulin release from islets of Langerhans entrapped in a poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acrylic acid) polymer gel, *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.* **10**, 183-198.
20. Alexandridis, P., Holzwarth, J., et Hatton, T. (1994). Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions : thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules* **27**, 2414-2425.
21. Brows, W., Schillén, K., et Hvidt, S. (1992). Triblock copolymers in aqueous solution studied by static and dynamic light scattering and oscillatory shear measurements. Influence of relative block sizes, *J. Phys. Chem.* **96**, 6038-6044.
22. Mortensen, K. et Pedersen, J. (1993). Structural study on the micelle formation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer in aqueous solution, *Macromolecules* **26**, 805-812.
23. Li, H., Yu, G., Price, C., Booth, C., Hecht, E. *et coll.* (1997). Concentrated aqueous micellar solutions of diblock copoly(oxyethylene/oxybutylene) E_{41B8}: a study of phase behavior, *Macromolecules* **30**, 1347-1354.

24. Jorgensen, E., Hvidt, S., Brown, W., et Schillén, K. (1997). Effects of salts on the micellization and gelation of a triblock copolymer studied by rheology and light scattering, *Macromolecules* **30**, 2355-2364.
25. Lin, H. et Sung, K. (2000). Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery, *J. Control. Release* **69**, 379-388.
26. Davidorf, F., Chambers, R., Kwon, O., Doyle, W., Gresak, P. *et coll.* (1990). Ocular toxicity of vitreal pluronic polyol F-127, *Retina* **10**, 297-300.
27. Ricci, E. J., Lunardi, L. O., Nanclares, D. M. A., et Marchetti, J. M. (2005). Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels, *Int. J. Pharm.* **288**, 235-244.
28. Jeong, B., Bae, Y. H., Lee, D. S., et Kim, S. W. (1997). Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems, *Nature* **388**, 860-862.
29. Jeong, B., Choi, Y. K., Bae, Y. H., Zentner, G., et Kim, S. W. (1999). New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems, *J. Control. Release* **62**, 109-114.
30. Lee, D., Shim, M., Kim, S., Lee, H., Park, I. *et coll.* (2001). Novel thermoreversible gelation of biodegradable PLGA-*block*-PEO-*block*-PLGA triblock copolymers in aqueous solution, *Macromol. Rapid Commun.* **22**, 587-592.
31. Zentner, G. W., Rathi, R., Shih, C., McRea, J. C., Seo, M. H. *et coll.* (2001). Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs, *J. Control. Release* **72**, 203-215.
32. Choi, S., Baudys, M., et Kim, S. W. (2004). Control of blood glucose by novel GLP-1 delivery using biodegradable triblock copolymer of PLGA-PEG-PLGA in type 2 diabetic rats, *Pharm. Res.* **21**, 827-831.
33. Kwon, Y. M. et Kim, S. W. (2004). Biodegradable triblock copolymer microspheres based on thermosensitive sol-gel transition, *Pharm. Res.* **21**, 339-343.
34. Gronwald, O., Snip, E., et Shinkai, S. (2002). Gelators for organic liquids based on self-assembly : a new facet of supramolecular and combinatorial chemistry, *Curr. Opin. Coll. Inter. Sci.* **7**, 148-156.

35. Hanabusa, K., Maesaka, Y., Kimura, M., et Shirai, H. (1999). New gelators based on 2-amino-2-phenylethanol: close gelator-chiral structure relationship, *Tetrahedron Letters* **40**, 2385-2388.
36. Couffin-Hoarau, A. C., Motulsky, A., Delmas, P., et Leroux, J. C. (2004). *In situ*-forming pharmaceutical organogels based on the self-assembly of L-alanine derivatives, *Pharm. Res.* **21**, 454-457.
37. Brinksma, J., Feringa, B., Kellogg, R., Vreeker, R., et van Esch, J. (2000). Rheology and thermotropic properties of bis-urea-based organogels in various primary alcohols, *Langmuir* **16**, 9249-9255.
38. Itoh, T., Katsoulis, D. E., et Mita, I. (1993). Spectroscopic investigation of a gelling agent included in poly(dimethylsiloxane) gels, *J. Mater. Chem.* **3**, 1303-1305.
39. Smith, J. M. et Katsoulis, D. E. (1995). Gelation of silicone fluids using 1,3:2,4-dibenzylidene sorbitol, *J. Mater. Chem.* **5**, 1899-1903.
40. Bujanowski, V. J., Katsoulis, D. E., et Ziemelis, M. (1994). Gelation of silicone fluids using cholesteryl esters as gelators, *J. Mater. Chem.* **4**, 1181-1187.
41. Ajayaghosh, A. et George, S. J. (2001). First phenylenevinylene based organogels : self-assembled nanostructures via cooperative hydrogen bonding and π -stacking, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5148-5149.
42. Bhattacharya, S. et Krishnan-Ghosh, Y. (2001). First report of phase selective gelation of oil from oil/water mixtures. Possible implications toward containing oil spills, *Chem. Commun.* 185-186.
43. Bhattacharya, S. et Ghanashyam Acharya, S. N. (1999). Impressive gelation in organic solvents by synthetic, low molecular mass, self-organizing urethane amides of L-phenylalanine, *Chem. Mater.* **11**, 3121-3132.
44. Wang, G. et Hamilton, A. D. (2002). Synthesis and self-assembling properties of polymerizable organogelators, *Chem. Eur. J.* **8**, 1954-1961.
45. Ihara, H., Takafuji, M., Sakurai, T., Katsumoto, M., Ushijima, N. *et coll.* (2003). Novel self-assembling organogelators by combination of a double

- chain-alkylated L-glutamide and a polymeric head group, *Org. Biomol. Chem.* **1**, 3004-3006.
46. Suzuki, M., Nigawara, T., Yumoto, M., Kimura, M., Shirai, H. *et coll.* (2003). L-Lysine based germini organogelators: their organogelation properties and thermally stable organogels, *Org. Biomol. Chem.* **1**, 4124-4131.
 47. Motulsky, A., Lafleur, M., Couffin-Hoarau, A., Hoarau, D., Boury, F. *et coll.* (2005). Characterization and biocompatibility of organogels based on L-alanine for parenteral drug delivery implants, *Biomaterials* **26**, 6242-6253.
 48. Plourde, F., Motulsky, A., Couffin-Hoarau, A. C., Hoarau, D., Ong, H. *et coll.* (2005). First report on the efficacy of L-alanine-based in situ-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs, *J. Control. Release* **108**, 433-441.
 49. Suzuki, M., Nakajima, Y., Yumoto, M., Kimura, M., Shirai, H. *et coll.* (2004). In situ organogelation at room temperature : direct synthesis of gelators in organic solvents, *Org. Biomol. Chem.* **2**, 1155-1159.
 50. Luboradzki, R., Gronwald, O., Ikeda, A., et Shinkai, S. (2000). Sugar-integrated "supergelators" which can form organogels with 0.03-0.05% [g mL⁻¹], *Chem. Lett.* **29**, 1148-1149.
 51. Mukkamala, R. et Weiss, R. G. (1996). Physical gelation of organic fluids by anthraquinone-steroid-based molecules. Structural features influencing the properties of gels, *Langmuir* **12**, 1474-1482.
 52. Trivedi, D. R., Ballabh, A., Dastidar, P., et Ganguly, B. (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.
 53. de Loos, M., Friggeri, A., van Esch, J., Kellogg, R., et Feringa, B. (2005). Cyclohexane bis-urea compounds for the gelation of water and aqueous solutions, *Org. Biomol. Chem.* **3**, 1631-1639.

54. Valkonen, A., Lahtinen, M., Virtanen, E., Kaikkonen, S., et Kolehmainen, E. (2004). Bile acid amidoalcohols : simple organogelators, *Biosens. Bioelectron.* **20**, 1233-1241.
55. D'Aléo, A., Pozzo, J., Fages, F., Schmutz, M., Mieden-Gundert, G. *et coll.* (2004). 11-Aminoundecanoic acid : a versatile unit for the generation of low molecular weight gelators for water and organic solvents, *Chem. Commun.* **2**, 190-191.
56. Hotten, B. W. et Birdsall, D. H. (1952). Fine structure and rheological properties of lithium soap-oil dispersions, *J. Colloid Sci.* **7**, 284-294.
57. Shirakawa, M., Fujita, N., et Shinkai, S. (2003). [60]Fullerene-motivated organogel formation in a porphyrin derivative bearing programmed hydrogen-bonding sites, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9902-9903.
58. Shi, C., Huang, Z., Kilic, S., Xu, J., Enick, R. *et coll.* (1999). The gelation of CO₂ : A sustainable route to the creation of microcellular materials, *Science* **286**, 1540-1543.
59. Willimann, H. L. et Luisi, P. L. (1991). Lecithin organogels as matrix for the transdermal transport of drugs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 897-900.
60. Willimann, H., Walde, P., Luisi, P. L., Gazzaniga, A., et Stroppolo, F. (1992). Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs, *J. Pharm. Sci.* **81**, 871-874.
61. Jibry, N. et Murdan, S. (2004). In vivo investigation, in mice and in man, into the irritation potential of novel amphiphilogels being studied as transdermal drug carriers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 107-119.
62. Jibry, N., Heenan, R. K., et Murdan, S. (2004). Amphiphilogels for drug delivery : formulation and characterization, *Pharm. Res.* **21**, 1852-1861.
63. Murdan, S., Andrysek, T., et Son, D. (2005). Novel gels and their dispersions – oral drug delivery systems for ciclosporin, *Int. J. Pharm.* **300**, 113-124.
64. Péntzes, T., Blazsó, G., Aigner, Z., Falkay, G., et Erós, I. (2005). Topical absorption of piroxicam from organogels–in vitro and in vivo correlations, *Int. J. Pharm.* **298**, 47-54.

65. Murdan, S., Gregoriadis, G., et Florence, A. T. (1996). Non-ionic surfactant based organogels incorporating niosomes, *S. T. P. Pharma Sciences* **6**, 44-48.
66. Murdan, S., Gregoriadis, G., et Florence, A. T. (1999). Sorbitan monostearate/polysorbate 20 organogels containing niosomes: a delivery vehicle for antigens?, *Eur. J. Pharm. Sci.* **8**, 177-185.
67. Murdan, S., van den Bergh, B., Gregoriadis, G., et Florence, A. T. (1999). Water-in-sorbitan monostearate organogels (water-in-oil gels), *J. Pharm. Sci.* **88**, 615-619.
68. Vander, A.J., Sherman, J.H., Luciano, D.S., et Brière, R. (1995). *Physiologie Humaine*, Troisième édition, Poulin, M., Montréal, 814 pages.
69. Guyton, A.C. et Hall, J.E. (2000). *Textbook of Medical Physiology*, 10th edition, Schmitt, W., Philadelphie, 1064 pages.
70. Huggins, C. et Hodges, C. V. (1941). Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate, *Cancer Res.* **1**, 293-297.
71. Takahara, J., Arimura, A., et Schally, A. V. (1975). Assessment of GH releasing hormone activity in Sephadex-separated fractions of porcine hypothalamic extracts by hypophyseal portal vessel infusion in the rat, *Acta Endocrinol.* **78**, 428-434.
72. Schally, A. V., Comaru-Schally, A. M., Plonowski, A., Nagy, A., Halmos, G. *et coll.* (2000). Peptide analogs in the therapy of prostate cancer, *Prostate* **45**, 158-166.
73. Tolis, G., Ackman, D., Stellos, A., Mehta, A., Labrie, F. *et coll.* (1982). Tumor growth inhibition in patients with prostatic carcinoma treated with luteinizing hormone-releasing hormone agonists, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1658-1662.
74. Chrisp, P. et Sorkin, E. M. (1991). Leuprorelin - A review of its pharmacology and therapeutic use in prostatic cancer, *Drugs Aging* **1**, 487-509.

75. Lin, L.-L., Wartman, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A. *et coll.* (1993). cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase, *Cell* **72**, 269-278.
76. Netiv, E., Liscovitch, M., et Naor, Z. (1991). Delayed activation of phospholipase D by gonadotropin releasing hormone in a clonal pituitary gonadotrope cell line (α T3-1), *FEBS Lett.* **295**, 107-109.
77. Naor, Z. (1990). Signal transduction mechanisms of Ca²⁺ mobilizing hormones. The case of gonadotropin-releasing hormone, *Endocrin. Rev.* **11**, 326-353.
78. Ben-Menahem, D., Shraga-Levine, Z., Limor, R., et Naor, Z. (1994). Arachidonic acid and lipoxygenase products stimulate gonadotropin α -subunit mRNA levels in pituitary α T3-1 cell line : Role in gonadotropin releasing hormone action, *Biochemistry* **33**, 12795-12799.
79. Yasukawa, K., Sawamura, D., Sugawara, H., et Kato, N. (2005). Leuprorelin acetate granulomas : case reports and review of the literature, *Br. J. Dermatol.* **152**, 1045-1047.
80. Smith, M. R., McGovern, F. J., Zietman, A. L., Fallow, M. A., Hayden, D. L. *et coll.* (2001). Pamidronate to prevent bone loss during androgen-deprivation therapy for prostate cancer, *N. Engl. J. Med.* **345**, 948-955.
81. Smith, J. A. J. et Urry, R. L. (1985). Testicular histology after prolonged treatment with a gonadotropin-releasing hormone analogue, *J. Urol.* **133**, 612-614.
82. Surrey, E. S. et Judd, H. L. (1992). Reduction of vasomotor symptoms and bone mineral density loss with combined norethindrone and long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist therapy of symptomatic endometriosis : a prospective randomized trial, *J. Clin. Endocrin. Metabol.* **75**, 558-563.
83. Lemay, A., Surrey, E. S., et Friedman, A. J. (1992). Extending the use of gonadotropin-releasing hormone agonists : the emerging role of steroidal and nonsteroidal agents, *Fertil. Steril.* **61**, 21-34.

84. Friedman, A. J. et Hornstein, M. D. (1993). Gonadotropin-releasing hormone agonist plus estrogen-progestin "add-back" therapy for endometriosis-related pelvic pain, *Fertil. Steril.* **60**, 236-241.
85. Fernandez, H., Lucas, C., Hédon, B., Meyer, J. L., Mayenga, J. M. *et coll.* (2004). One year comparison between two add-back therapies in patients treated with a GnRH agonist for symptomatic endometriosis : a randomized double-blind trial, *Hum. Reprod.* **19**, 1465-1471.
86. Tejada, M. I., Mendoza, R., Corcóstegui, B., et Benito, J. A. (1991). Chromosome studies in human unfertilized oocytes and uncleaved zygotes after treatment with gonadotropin-releasing hormone analogs, *Fertil. Steril.* **56**, 874-880.
87. Sánchez-Chapado, M., Olmedilla, G., Cabeza, M., Donat, E., et Ruiz, A. (2003). Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in caucasian mediterranean males : an autopsy study, *Prostate* **54**, 238-247.
88. Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O., et O'leary, J. (2005). Molecular pathology of prostate cancer, *J. Clin. Pathol.* **58**, 673-684.
89. Marker, P. C., Donjacour, A. A., Dahiya, R., et Cunha, G. R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development, *Dev. Biol.* **253**, 165-174.
90. Cunha, G. R., Donjacour, A. A., Cooke, P. S., Mee, S., Bigsby, R. M. *et coll.* (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate, *Endocrine Rev.* **8**, 338-362.
91. Montie, J. E. et Pienta, K. J. (1994). Review of the role of androgenic hormones in the epidemiology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer, *Urology* **43**, 892-899.
92. Hayes, R. B., de Jong, F. H., Raatgever, J., Bogdanovicz, J., Schroeder, F. H. *et coll.* (1991). Physical characteristics and factors related to sexual development and behaviour and the risk for prostatic cancer, *Eur. J. Cancer Prev.* **1**, 239-245.

93. Wang, Y., Sudilovsky, D., Zhang, B., Haughney, P. C., Rosen, M. A. *et coll.* (2001). A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis, *Cancer Res.* **61**, 6064-6072.
94. Leav, I., Ho, S. M., Ofner, P., Merk, F. B., Kwan, P. W. L. *et coll.* (1988). Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of noble rats, *J. Natl. Cancer Inst.* **80**, 1045-1053.
95. Iversen, P. (2002). Antiandrogen monotherapy : Indications and results, *Urology* **60**, 64-71.
96. de Voogt, H. J., Smith, P. H., Pavone-Macaluso, M., de Pauw, M., Suci, S. *et coll.* (1986). Cardiovascular side effects of diethylstilbestrol, cyproterone acetate, medroxyprogesterone acetate, and estramustine phosphate used for the treatment of advanced prostatic cancer : Results from European organization for research on treatment of cancer trials 30761 and 30762, *J. Urol.* **135**, 303-307.
97. Crawford, E. D., Eisenberger, M. A., McLeod, D. G., Spaulding, J. T., Benson, R. *et coll.* (1989). A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma, *N. Engl. J. Med.* **321**, 419-424.
98. Boccardo, F., Pace, M., Rubagotti, A., Guarneri, D., Decensi, A. *et coll.* (1993). Goserelin acetate with or without flutamide in the treatment of patients with locally advanced or metastatic prostate cancer, *Eur. J. Cancer* **29A**, 1088-1093.
99. Eisenberger, M. A., Blumenstein, B. A., Crawford, D., Miller, G., McLeod, D. G. *et coll.* (1998). Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer, *N. Engl. J. Med.* **339**, 1036-1042.
100. Barbieri, R. L. (1990). Gonadotropin-releasing hormone agonists and estrogen-progestogen replacement therapy, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **162**, 593-595.
101. Jansen, R.P.S. (1993). The basis of surgery for endometriosis. VIIIth World Congress on Human Reproduction Joint IVth World Conference on Fallopian Tube in Health and Disease, Bali, 21-27.

102. Gurates, B. et Bulun, S. E. (2003). Endometriosis : the ultimate hormonal disease, *Semin. Reprod. Med.* **21**, 125-134.
103. Plosker, G. L. et Brogden, R. N. (1994). Leuprorelin — A review of its pharmacology and therapeutic use in prostatic cancer, endometriosis and other sex-hormone-related disorders, *Drugs* **48**, 930-967.
104. Dlugi, A. M., Miller, J. D., Knittle, J., et Lupron Study Group (1990). Lupron depot (leuprolide acetate for depot suspension) in the treatment of endometriosis : a randomized placebo-controlled, double-blind study, *Fertil. Steril.* **54**, 419-427.
105. Wheeler, J. M., Knittle, J. D., et Miller, J. D. (1992). Depot leuprolide versus danazol in treatment of women with symptomatic endometriosis, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**, 1367-1371.
106. Junier, M., Ma, Y., Costa, M., Hoffman, G., Hill, D. *et coll.* (1991). Transforming growth factor α contributes to the mechanism by which hypothalamic injury induces precocious puberty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9743-9747.
107. Wheeler, M. D. et Styne, D. N. (1991). The treatment of precocious puberty, *Endocrinol. Metabl. Clin. North Am.* **20**, 183-190.
108. Jay, N., Mansfield, M. J., Blizzard, R. M., Crowley, W. F. Jr., Schoenfeld, D. *et coll.* (1992). Ovulation and menstrual function of adolescent girls with central precocious puberty after therapy with gonadotropin-releasing hormone agonists, *J. Clin. Endocrin. Metabol.* **75**, 890-894.
109. Andersen, J. et Barbieri, R. L. (1995). Abnormal gene expression in uterine leiomyomas, *J. Soc. Gynecol. Investig.* **2**, 663-672.
110. Buttram, V. C. J. et Reiter, R. C. (1981). Uterine leiomyomata : etiology, symptomatology, and management, *Fertil. Steril.* **36**, 433-445.
111. Brandon, D. D., Erickson, T. E., Keenan, E. J., Strawn, E. Y., Novy, M. J. *et coll.* (1995). Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata, *J. Clin. Endocrin. Metabol.* **80**, 1876-1881.
112. Bulun, S. E., Simpson, E. R., et Word, R. A. (1994). Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine

- leiomyoma tissues and cells in culture, *J. Clin. Endocrin. Metabol.* **78**, 736-743.
113. Andersen, J., DyReyes, V. M., Barbieri, R. L., Coachman, D. M., A.A.S. *et coll.* (1995). Leiomyoma primary cultures have elevated transcriptional response to estrogen compared with autologous myometrial cultures, *J. Soc. Gynecol. Investig.* **2**, 542-551.
 114. Kawaguchi, K., Fujii, S., Konishi, I., Nanbu, Y., Nonogaki, H. *et coll.* (1989). Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **160**, 637-641.
 115. Pritts, E. A. (2001). Fibroids and infertility : a systematic review of the evidence, *Obstet. Gynecol. Surv.* **56**, 483-491.
 116. Stewart, E. A. et Friedman, A. J. (1992). Steroidal treatment of myomas : preoperative and long-term medical therapy, *Seminars Reprod. Endocrinol.* **10**, 344-357.
 117. Friedman, A. J., Hoffman, D. I., Comite, F., Browneller, R. W., Miller, J. D. *et coll.* (1991). Treatment of leiomyomata uteri with leuprolide acetate depot: A double-blind, placebo-controlled, multicenter study, *Obstet. Gynecol.* **77**, 720-725.
 118. Letterie, G. S., Stevenson, D., et Shah, A. (1991). Recurrent anaphylaxis to a depot form of GnRH analogue, *Obstet. Gynecol.* **78**, 943-946.
 119. Dubuisson, J. B., Lecuru, F., Foulot, H., Mandelbrot, L., de la Jolinière, J. B. *et coll.* (1992). Gonadotrophin-releasing hormone agonist and laparoscopic myomectomy, *Clin. Ther.* **14 Suppl. A**, 51-56.
 120. Mosher, W. D. et Pratt, W. F. (1991). Fecundity and infertility in the United States : incidence and trends, *Fertil. Steril.* **56**, 192-193.
 121. Clark, J. H. et Markaverich, B. M. (1982). The agonistic-antagonistic properties of clomiphene : A review, *Pharmacol. Ther.* **15**, 467-519.
 122. Dickey, R. P. et Holtkamp, E. (1996). Development, pharmacology and clinical experience with clomiphene citrate, *Human Reprod. Update* **2**, 483-506.

123. Manzi, D. L., Dumez, S., Scott, L. B., et Nulsen, J. C. (1995). Selective use of leuprolide acetate in women undergoing superovulation with intrauterine insemination results in significant improvement in pregnancy outcome, *Fertil. Steril.* **63**, 866-873.
124. Regan, L., Owen, E. J., et Jacobs, H. S. (1990). Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage, *Lancet* **336**, 1141-1144.
125. Krueger, R. B. et Kaplan, M. S. (2001). Depot-leuprolide acetate for treatment of paraphilias : a report of twelve cases, *Arch. Sex. Behav.* **30**, 409-422.
126. Briken, P., Hill, A., et Berner, W. (2003). Pharmacotherapy of paraphilias with long-acting agonists of luteinizing hormone-releasing hormone : a systematic review, *J. Clin. Psychiatry* **64**, 890-897.
127. Rösler, A. et Witztum, E. (2000). Pharmacotherapy of paraphilias in the next millennium, *Behav. Sci. Law* **18**, 43-56.
128. Sartor, O. (2003). Eligard: leuprolide acetate in a novel sustained-release delivery system, *Urology* **61**, 25-31.
129. Chu, F. M., Jayson, M., Dineen, M. K., Perez, R., Harkaway, R. *et coll.* (2002). A clinical study of 22.5 mg LA-2550 : a new subcutaneous depot delivery system for leuprolide acetate for the treatment of prostate cancer, *J. Urol.* **168**, 1199-1203.
130. Perez-Marreno, R., Chu, F. M., Gleason, D., Loizides, E., Wachs, B. *et coll.* (2002). A six-month, open-label study assessing a new formulation of leuprolide 7.5 mg for suppression of testosterone in patients with prostate cancer, *Clin. Ther.* **24**, 1902-1914.
131. Fowler Jr, J. E., Flanagan, M., Gleason, D. M., Klimberg, I. W., Gottesman, J. E. *et coll.* (2000). Evaluation of an implant that delivers leuprolide for 1 year for the palliative treatment of prostate cancer, *Urology* **55**, 639-642.
132. Fowler Jr, J. et Viadur Sudy Group (2001). Patient-reported experience with the Viadur 12-month leuprolide implant for prostate cancer, *Urology* **58**, 430-434.

133. Fowler Jr, J., Gottesman, J. E., Reid, C. F., Andriole Jr, G. L., et Soloway, M. S. (2000). Safety and efficacy of an implantable leuprolide delivery system in patients with advanced prostate cancer, *J. Urol.* **164**, 730-734.
134. Mäder, K., Bittner, B., Li, Y., Wohlauf, W., et Kissel, T. (1998). Monitoring microviscosity and microacidity of the albumin microenvironment inside degrading microparticles from poly(lactide-co-glycolide) (PLG) of ABA-triblock polymers containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethyleneoxide) B blocks, *Pharm. Res.* **15**, 787-793.
135. Sinha, V. R. et Trehan, A. (2003). Biodegradable microspheres for protein delivery, *J. Control. Release* **90**, 261-280.
136. Hatefi, A. et Amsden, B. (2002). Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems, *J. Control. Release* **80**, 9-28.
137. Motulsky, A. (2005). Caractérisation d'un organogel à base d'un dérivé amphiphile de la L-alanine, Mémoire de maîtrise, Université de Montréal.
138. Bhardwaj, R. et Blanchard, J. (1996). Controlled-release delivery system for the α -MSH analog Melanotan-I using poloxamer 407, *J. Pharm. Sci.* **85**, 915-919.
139. Ruel-Gariépy, E., Shive, M., Bichara, A., Berrada, M., Le Garrec, D. *et coll.* (2004). A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 53-63.

ANNEXE 1 : Matériels et Méthodes

Études de libération (« *burst* ») *in vitro*

Afin d'évaluer l'effet de la proportion de solvant organique sur la diffusion initiale de leuprolide, des expériences de « *burst* » *in vitro* ont été réalisées. Une première série de gels dans lesquels le leuprolide était dispersé a été préparée. Le leuprolide (dose dans le gel de 5.6 mg/mL), dissous dans le DMAc (5 à 30% *v/v*), était ajouté à un mélange d'huile de soja et d'organogélifiant LAM (20% *p/v*). Dans la seconde série de gels, le leuprolide était incorporé sous forme d'émulsion E/H tel que décrit dans l'article, en utilisant le LAM, l'huile de soja et le DMAc. À l'état sol, chaque formulation était déposée en surface dans un microtube contenant 500 µL d'eau et y reposait 10 minutes pour laisser le temps au leuprolide de diffuser dans le milieu aqueux. L'eau était ensuite retirée et le leuprolide était extrait puis dosé par HPLC. Chacune des expériences a été réalisée en duplicata.