



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale Biose (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention « Sciences de la vie et de la Santé »

Par **Javier-Andrés CAMARGO**

**SYSTEMES INJECTABLES BIODEGRADABLES POUR LA LIBERATION
PROLONGEE D'IVERMECTINE**

Soutenue le 05 Novembre 2010

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs

M. Alf LAMPRECHT	Professeur, Faculté de Pharmacie, Université de Franche-comté
M. Hatem FESSI	Professeur, Faculté de Pharmacie, Université de Lyon

Examineurs

M. Roland BODMEIER	Professeur, Faculté de Pharmacie, Freie Universität Berlin
Mlle Cécile NOUVEL	Maître de Conférences, ENSIC, Université de Nancy
M. Patrick FORGET	Chef Projet Formulation, CEVA Santé Animal, Libourne
Mme Anne SAPIN	Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie, Université de Nancy
M. Philippe MAINCENT	Professeur, Faculté de Pharmacie, Université de Nancy

A mes parents.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier spécialement mon directeur de thèse le Pr.Dr. Philippe MAINCENT pour la chance qu'il m'a offerte de travailler sous sa responsabilité, pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de mon travail, pour ses conseils scientifiques et personnels et pour sa générosité qui m'a permis de découvrir un peu plus le monde de la recherche et de l'industrie pharmaceutique.

Je voudrais remercier le Pr.Dr. Alf LAMPRECHT, le Pr.Dr. Hatem FESSI, le Pr. Dr. Roland BODMEIER, le Dr. Cécile NOUVEL, le Dr. Patrick FORGET et le Dr. Anne SAPIN d'avoir accepté l'invitation pour intégrer le jury de ce travail de thèse.

Je voudrais particulièrement remercier le Pr.Dr. Roland BODMEIER, référent scientifique dans ma recherche, pour ses multiples conseils ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant de travailler dans son laboratoire à la Freie Universität Berlin. J'ai pu approfondir lors de ce séjour mes connaissances au sein d'un groupe de travail très accueillant et professionnel.

Je veux rendre hommage au Dr. Nathalie UBRICH pour tous ses conseils, pour sa participation dans la partie initiale de mon travail. Elle a su m'apprendre à lutter pour ce que nous aimons le plus.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Anne SAPIN d'avoir co-dirigé mon travail de thèse. Elle a su me guider grâce à ses conseils et me transmettre ses connaissances dans la réalisation des essais *in vivo*. Je suis également reconnaissant de la gentillesse qu'elle m'a exprimée.

Je remercie également le Dr. Vassilios KALSATOSE, le Dr. Florence GUIMBERTEAU et le Dr. Patrick FORGET de la société CEVA- Santé Animale, pour leurs apports scientifiques qui m'ont permis d'avancer dans mon travail. Je les suis également très reconnaissant de la grande gentillesse qu'ils m'ont exprimée.

J'aimerais également remercier le Dr. Cécile NOUVEL pour le temps qu'elle m'a dédiée dans le cadre de la réalisation des études physico-chimiques des polymères au sein du Laboratoire

de Chimie Physique Macromoléculaire à l'ENSIC. Je lui suis reconnaissant pour son engagement, ses explications, ses conseils ainsi que sa grande gentillesse.

Je veux également remercier le Dr. Dominique DALOZ par son aide lors des essais de microscopie électronique à balayage réalisés sous sa direction à l'Ecole des Mines de Nancy. Son engagement dans mon travail, sa patience, sa grande gentillesse et ses conseils m'ont été précieux.

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude au Pr.Dr. Isabelle LARTAUD, au Pr.Dr. Pierre LEROY, au Dr. Christiane DAMGE et au Dr. François BONNEAUX membres de l'EA 3452, qui m'ont prodigué de précieux conseils pour le développement de mon travail de thèse. Je leur suis très reconnaissant pour leur gentillesse et disponibilité.

Je suis également reconnaissant du temps accordé par le Dr. Martin KÖRBER pour l'encadrement de mon stage au Laboratoire de Pharmacie Galénique de la Freie Universität Berlin. Je le remercie pour sa gentillesse et pour ses conseils scientifiques de grande valeur.

Je voudrais aussi remercier le Dr. Jean-Luc SIX ainsi que le Dr. Michelle LEONARD du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire à l'ENSIC, pour le temps qu'ils ont dédié à la discussion de mes résultats ; je suis également très reconnaissant pour leur sympathie.

Je tiens à remercier le Pr.Dr. Milaslava RABIŠKOVÁ pour ses conseils scientifiques et personnels, pour les bons moments que nous avons partagés pendant ses séjours en France et pour sa très grande gentillesse et humanité.

Je voudrais remercier les secrétaires du laboratoire, Melle Pascale CARNET et Mme Géraldine REPEL, ainsi que les techniciens, M. Patrick LIMINANA, Cristophe MOTT et Mme Marie-Christine GRASSIOT, pour leur grande efficacité, leur gentillesse et leur aide continue.

Je veux exprimer ma gratitude à toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer tout au long de ma thèse soit au laboratoire, soit durant mes stages. J'adresse ainsi mes remerciements particulièrement à Lucie JAVOT, Julien SCALA-BERTOLA, Ahmed SHEIKH-HASAN, Housamm EIDI, Myriem GARGOURI, Juliana PEGO, Marc MUCHOW, Marie SOCHA, Eliza GLOWKA, Yohana MOTTA, Charlotte DUVAL, Cristina LOIRA, Ariane BOUDIER et Olivier JOUBERT.

Je voudrais dédier spécialement quelques lignes à mes amis Lucie JAVOT et Julien SCALA-BERTOLA qui m'ont offert leur amitié sincère depuis mon arrivée en France et avec lesquels j'ai pu avoir des discussions scientifiques très riches mais aussi partager des expériences de vie qui ont bâti notre amitié. Je vous remercie pour votre soutien et pour les bons moments vécus ensemble.

Je ne peux pas finir mes remerciements sans adresser ma profonde gratitude à mon cher frère Mauricio CAMARGO et à Laure MOREL, qui ont toujours été à mes côtés pour me montrer le chemin, pour m'encourager, pour me soutenir et pour me donner des conseils. Ceci a eu pour moi une valeur inestimable. Je leur exprime toute mon affection et tendresse.

Enfin, mais de tout mon cœur, je remercie à ma chérie Julie KARMANN pour sa tendresse, pour son aide et pour sa compréhension dans les moments difficiles, merci d'être toujours là.

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION.....	15
2	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	20
2.1	Introduction.....	20
2.1.1	Marché mondial des produits vétérinaires	20
2.1.2	Défis et considérations dans le développement des produits vétérinaires	21
2.2	Parasitoses et Ivermectine	23
2.2.1	Les parasitoses chez l'animal.....	23
2.2.2	Chimiothérapie des parasitoses.....	25
2.2.2.1	Les lactones macrocycliques (avermectines)	26
2.2.2.2	Optimisation galénique des traitements parasitaires.....	30
2.3	Les différentes possibilités d'optimisations galéniques	31
2.3.1	Le système de classification biopharmaceutique (BCS).....	33
2.3.2	Polymères biodégradables pour la libération prolongée des principes actifs	36
2.3.2.1	Synthèse des polymères d'acide lactique et/ou glycolique.....	39
2.3.2.2	Dégradation et érosion des polymères d'acide lactique et/ou glycolique.....	41
2.3.2.3	Mécanisme de libération des principes actifs à partir des polymères d'acide lactique et/ou glycolique.....	47
2.3.3	Systèmes implantables biodégradables.....	48
2.3.3.1	Systèmes préformés	48
2.3.3.1.1	Implants monolithiques.....	49
2.3.3.1.2	Microparticules	50
2.3.3.1.2.1	Obtention par émulsion et évaporation/extraction de solvant.....	53
2.3.3.1.2.1.1	Simple émulsion (O/W)	53

2.3.3.1.2.1.2	Double émulsion (W/O/W)	57
2.3.3.1.2.2	Obtention par séparation de phases (coacervation)	58
2.3.3.1.2.3	Obtention par séchage par dispersion (« spray drying »)	59
2.3.3.2	Systèmes in situ	61
2.3.3.2.1	Implants <i>in situ</i> (ISI)	61
2.3.3.2.1.1	Pâtes thermoplastiques	61
2.3.3.2.1.2	Systèmes polymériques de réticulation in situ	62
2.3.3.2.1.2.1	Thermosets	62
2.3.3.2.1.2.2	Gels ion – réticulés	65
2.3.3.2.1.3	Systèmes de gélification in situ par température	65
2.3.3.2.1.4	Cubosomes in situ	66
2.3.3.2.1.5	Systèmes in situ par précipitation	67
2.3.3.2.1.5.1	Systèmes par précipitation pH dépendante	67
2.3.3.2.1.5.2	Systèmes par précipitation-extraction dépendante	68
2.3.3.2.1.5.2.1	Systèmes non polymériques	68
2.3.3.2.1.5.2.2	Systèmes polymériques	70
2.3.3.3	Microparticules in situ (ISM)	78
2.3.3.3.1	ISM par coacervation	78
2.3.3.3.2	ISM par extraction de solvant	79
2.4	Caractérisation physicochimique et comportement des polymères en solution	81
2.4.1	Paramètres de solubilité	82
2.4.2	Viscosité des polymères en solution	85
3	TRAVAIL EXPERIMENTAL	89
3.1	Objectifs	89

3.2	Microparticules biodégradables pour la libération prolongée d'ivermectine et destinées à la voie parentérale: caractérisation <i>in vitro</i> et effet de quelques variables de formulation ...	90
3.3	Implants injectables de formation <i>in situ</i> à base de PLA pour la libération contrôlée d'un principe actif BCS classe II: sélection du solvant à partir d'une caractérisation physico-chimique.....	118
3.4	Systèmes biodégradables d'administration parentérale pour la libération prolongée d'ivermectine: comparaison <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	147
4	DISCUSSION GENERALE.....	172
4.1	Contexte	172
4.2	Conception des systèmes de libération	172
4.3	Etudes de préformulation et formulation	173
4.4	Toxicité cellulaire	181
4.5	Etudes <i>in vivo</i>	182
4.5.1	Libération <i>in vivo</i> et biodisponibilité	182
4.5.2	Douleur et injectabilité des formes proposées	183
4.6	Perspectives.....	185
5	CONCLUSION.....	188
6	BIBLIOGRAPHIE.....	190

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Quelques produits commerciaux à libération prolongée d'administration parentérale à base de PLA ou PLGA.....	38
Tableau 2. Paramètres pharmacocinétiques d'IVM pour des différents types de formulations injectées chez le rat.	161
Tableau 3. Propriétés physico-chimiques modifiant la libération d'IVM à partir des ISI.....	176
Tableau 4. Niveaux de douleur observés chez les rats lors de l'administration des différentes formulations	184
Tableau 5. Injectabilité apparente des formulations chez le rat.....	184

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Marché vétérinaire mondial par région en 2008.....	20
Figure 2. Marché vétérinaire mondial par segment thérapeutique en 2008.....	21
Figure 3. Cycle de vie du « ver du cœur » (AHS, 2010).	24
Figure 4. Vers du cœur dans des chiens infestés ; artère pulmonaire (gauche) et cœur (droite) (AHS, 2010).	25
Figure 5. Structure chimique de l'ivermectine (Gonzalez Canga et al., 2009).....	27
Figure 6. Mécanisme d'action des avermectines (dont l'ivermectine) (Omura, 2008).	28
Figure 7. Pharmacocinétique de l'ivermectine (Gonzalez Canga et al., 2009).....	30
Figure 8. Représentation du système de classification biopharmaceutique (BCS) (Pouton, 2006)...	33
Figure 9. Niveaux systémiques obtenus à partir de formes à libération immédiate (gauche) et prolongée (droite).....	35
Figure 10. Biodégradation des copolymères d'acide lactique/glycolique (PLGA).	39
Figure 11. Synthèse de PLGA par ouverture de cycle à partir des lactones cycliques des monomères	40
Figure 12. Changements physiques subis dans une matrice polymérique suite à une dégradation dans la masse ou à la surface (Burkersroda et al., 2002)	43
Figure 13. Demi-vie chez le rat des implants à base des homopolymères de PLA et PGA et de leurs copolymères de PLGA (Miller et al., 1977).....	45
Figure 14. Importance de la taille sur l'effet « autocatalytique » lors de la dégradation de microparticules à base des polyesters d'acide lactique et/ou glycolique. Les régions sombres au centre des cercles représentent le micro-pH acide à l'intérieur du système (région claire: pH neutre ; région foncée: pH faible) (Klose et al., 2008).....	46
Figure 15. Dispositifs pour l'administration d'implants. Pistolet Ralgro® Gun (Intervet Schering-Plough) (gauche) et trocart KangYou® (Hangzhou Kangyou Medical Equipment Co., Ltd.).	49

Figure 16. Méthodes les plus utilisées pour l'obtention de microparticules (Mundargi et al., 2008).	52
Figure 17. Principales étapes suivies lors de la préparation de microparticules biodégradables par la méthode d'émulsion (O /W) / évaporation de solvant.	54
Figure 18. Classification des dépôts <i>in situ</i> en fonction des mécanismes participant dans leur formation.	64
Figure 19. Structure cubique tridimensionnelle de la phase cristalline glycerilmonooleate – eau (Shah et al., 2001).	67
Figure 20. Structure chimique de l'acétate isobutirate de Saccharose (SAIB) (Okumu et al., 2002).	68
Figure 21. Dispositif utilisé pour l'émulsification de phases avant l'injection chez le patient.	79
Figure 22. Phénomène d'inversion de phases lors de l'obtention de ISM ; (A) Injection de l'émulsion (O/O) ou (O/W) dans le milieu aqueux ou les tissus (B) diffusion du solvant biocompatible et vers le milieu extérieur (C) précipitation des ISM. (●) phase polymérique interne, (●) phase externe, (●) ISM, (■) milieu aqueux extérieur.	80
Figure 23. Régimes de concentration des solutions polymériques (Teraoka, 2002).	85
Figure 24. Principales propriétés physico-chimiques d'IVM à prendre en compte pour la formulation.	173
Figure 25. Profils de libération d'IVM à partir d'ISI réalisés en utilisant trois polyesters et trois solvants différents ; (A) NMP, (B) 2P et (C) TA.	177
Figure 26. Profils de libération d'IVM à partir d'ISM réalisés en utilisant trois solvants et trois polymères différents ; (A) PLGA H, (B) PLGA S et (C) PLA S.	179
Figure 27. Toxicité des solvants biocompatibles utilisés dans les formulations <i>in situ</i> sur des macrophages alvéolaires de rat NR8383 par la méthode du MTT. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart type. ($n=8$).	181

LISTE DES ABREVIATIONS

IVM :	Ivermectine
2P :	2- pyrrolidone
BCP :	Biocompatible
BSA :	Sérum albumine bovine (bovin serum albumin)
CLHP :	Chromatographie Liquide Haute Performance
DD:	Dosage direct
DDS :	Dodecyl sulfate de sodium
DDS :	Système de délivrance de médicament (Drug Delivery System)
DI :	Dosage indirect
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DRX :	Diffraction de Rayons X
DSC:	Calorimétrie différentielle à balayage
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra acétique
EMA:	Agence européenne des médicaments
FDA:	Food and Drug Administration
GnRH :	Gonadolibérine
HSP :	Paramètres de solubilité d'Hansen
I.M:	Intra musculaire
ISI:	Implants <i>in situ</i>
ISM :	Microparticules « <i>in situ</i> »
LH-RH :	Gonadoréline
Log P:	Coefficient partage octanol / eau
MEB :	Microscopie électronique à balayage
NMP :	N-méthyl-2-pyrrolidone
O/O :	Emulsion huile dans huile (oil in oil)
O/W :	Emulsion huile dans l'eau (oil in water)
PCL :	Poly-ε-caprolactone
PDE:	Permitted daily exposure
PEG :	Polyethyleneglycol

PLA :	Polymère d'acide lactique
PLGA :	Copolymère d'acide lactique et glycolique
PP :	Polypropylene
PVA :	Alcool polyvinylique
CLHP :	Chromatographie Liquide Haute Performance
SAIB :	Acétate isobutirate de saccharose
SC:	Sous-cutanée
Span 80 :	Sorbitan monooleate
TA :	Triacetine
<i>Tg</i> :	Température de transition vitreuse
Tween[®] 80 :	polyéthylène glycol sorbitan monooleate
UV:	Ultra violet
W/O :	Emulsion eau dans l'huile (water in oil)

1. INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

Dans le domaine vétérinaire, la pharmacothérapie des parasitoses a une importance majeure en raison des problèmes économiques que la persistance de cette maladie entraîne (Ahmed and Kasraian, 2002; Winzenburg et al., 2004). En effet, les parasitoses frappent différentes espèces y compris les animaux de la ferme et les animaux de compagnie. Dans le premier cas, l'impact économique des infestations parasitaires est important, ayant comme conséquence directe une diminution de la productivité alimentaire. En ce qui concerne les animaux de compagnie, les frais investis par les maîtres pour le traitement des parasitoses sont de plus en plus importants, dus aux étroites relations qu'ils établissent avec leurs animaux. Cependant, l'éradication des parasites oblige une pharmacothérapie pendant de longues périodes de temps (mois voire années) ce qui entraîne des efforts considérables. Par exemple, les traitements médicamenteux doivent être administrés fréquemment et la probabilité qu'ils échouent est élevée car le respect des thérapies peut être facilement abandonné. D'autre part, l'administration des médicaments antiparasitaires, souvent par voie orale, est confrontée aux contraintes d'absorption des principes actifs antiparasitaires de faible biodisponibilité et aux différences d'absorption interspèces (Martinez et al., 2002a; Martinez et al., 2002b).

Ainsi, dans le domaine vétérinaire, le développement de médicaments antiparasitaires injectables à libération prolongée est d'une importance majeure notamment dans le traitement des parasitoses, qui constituent le problème de santé le plus fréquent chez l'animal. En effet, lorsqu'un médicament est conçu sur la base d'une formulation libérant très rapidement le principe actif, il doit être administré à des doses élevées et à des fréquences relativement importantes pour combattre la maladie. Cette pratique entraîne fréquemment des effets indésirables chez l'animal (patient) et un contrôle inefficace de la pharmacothérapie. Ainsi, le développement de médicaments permettant la

libération prolongée et contrôlée des principes actifs, a suscité un vif intérêt durant les 50 dernières années (Hoffman, 2008).

La principale méthode utilisée pour l'obtention d'une libération contrôlée, a été l'incorporation du principe actif dans des polymères (par exemple biopolymères) (Wise, 2000). Lors des premiers travaux réalisés afin d'obtenir la libération prolongée de principes actifs administrés par la voie parentérale, des polymères non-biodégradables tels que le silicone ont été utilisés pour la fabrication d'implants préformés (Folkman and Long, 1964; Folkman et al., 1966). Bien que compatibles et efficaces, ces polymères présentent l'inconvénient de devoir être retirés du patient par des procédures chirurgicales, une fois la thérapie terminée. Néanmoins, l'introduction des polymères biodégradables dans le domaine biomédical a surmonté cette problématique. Une fois administrés, ces polymères sont dégradés dans l'organisme libérant ainsi le principe actif qu'ils « contiennent ». Parmi les polymères biodégradables, les polyesters de l'acide lactique et/ou glycolique (PLA et PLGA) sont les plus répandus en raison de la sécurité que leur utilisation entraîne (Anderson and Shive, 1997). De plus, en fonction du polymère choisi, la libération du principe actif peut être prolongée pendant de longues périodes de temps, facilitant ainsi la thérapie des maladies chroniques.

Plusieurs systèmes parentéraux à libération prolongée tels que des implants et des microparticules ont été conçus en utilisant les polymères de l'acide lactique et / ou glycolique. De même, des méthodes de fabrication différentes ont été utilisées pour la mise en forme de ces systèmes. Les implants, peuvent, par exemple, être obtenus par compression puis administrés chez le patient par des procédures chirurgicales, ce qui constitue une limite certaine à leur utilisation (Hatefi and Amsden, 2002). Au contraire, les microparticules peuvent être préparées par diverses méthodes, puis injectées chez le patient suite à leur suspension dans un véhicule approprié. Cependant, la

fabrication de microparticules par les méthodes classiques est difficile à transposer au niveau industriel, coûteuse et soumise à des contraintes de toxicité à cause des solvants utilisés.

Comme alternative aux problèmes liés à l'utilisation des systèmes préformés, des nouvelles méthodes dites de formation *in situ*, pour la préparation d'implants (Dunn et al., 1990) et de microparticules (Bodmeier, 1998), ont été développées. Par ces méthodes, les systèmes de libération sont préparés extemporanément, comme des « liquides », et lors de leur injection chez le patient, le contact avec les fluides corporeux induit la précipitation du polymère et l'obtention du système « solide » souhaité.

Ainsi, ces travaux de thèse ont eu pour objectif l'obtention d'implants et de microparticules *in situ* à base des polyesters de l'acide lactique et/ou glycolique pour l'administration parentérale et la libération prolongée d'ivermectine (IVM), un antiparasitaire de faible biodisponibilité orale. Ces systèmes de formation *in situ* ont été développés, caractérisés par des études *in vitro* et *in vivo* et comparés aux microparticules préformées obtenues par la méthode classique d'émulsion simple - évaporation du solvant. Ce travail de thèse est donc organisé de la manière suivante : i) une revue bibliographique (chapitre 2) permettant une meilleure compréhension de la problématique abordée et présentant les principaux systèmes *in situ* existants, ii) une partie expérimentale (chapitre 3) expose alors les résultats des travaux de recherche réalisés au laboratoire. Le chapitre 3 comprend tout d'abord un rappel des objectifs du travail, puis une publication portant sur l'obtention de microparticules par la méthode d'émulsion simple / évaporation du solvant (section 3.2). Une autre publication concernant le choix des solvants biocompatibles pour l'obtention des implants *in situ* (section 3.3) est alors présentée. Enfin, l'étude de la libération *in vitro* et *in vivo* d'IVM à partir de microparticules *in situ* est exposée dans la section 3.4. La comparaison des microparticules obtenues *in situ* par rapport aux implants permet mieux comprendre les inconvénients et les avantages de chacun des systèmes, iii) Le document se termine par une discussion générale

(chapitre 4), contenant les aspects les plus importants pour le développement des systèmes étudiés, et contenant certains résultats non discutés précédemment mais utiles pour une compréhension globale de la problématique exposée. Des perspectives et une conclusion sont enfin proposées.

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Introduction

2.1.1 Marché mondial des produits vétérinaires

Le marché mondial des produits pour la santé animale (vétérinaires) a été de 19,2 milliards de dollars (M\$) en 2008, Pfizer, ISP et Merial étant les laboratoires pharmaceutiques leaders dans ce secteur. D'un point de vue géographique, 65 % de ce total est détenu par l'Amérique du nord (6,3 M\$) et l'Europe de l'ouest (6,2 M\$) (Figure 1). Les produits anti-parasitaires et les vaccins ont participé à ce marché à hauteur de 28% et 25% respectivement (Figure 2). Pour l'année 2014 un chiffre global d'affaires de 24,1 M\$ est attendu, soit une croissance estimée d'environ 5% par an (Merck-Sanofi-Aventis, 2010).

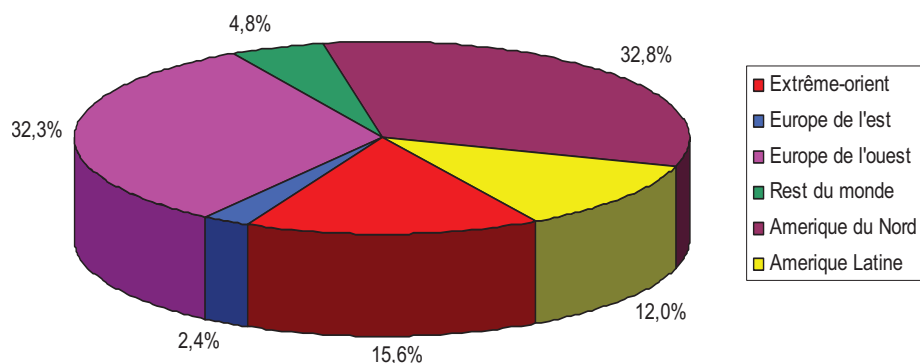


Figure 1. Marché vétérinaire mondial par région en 2008.

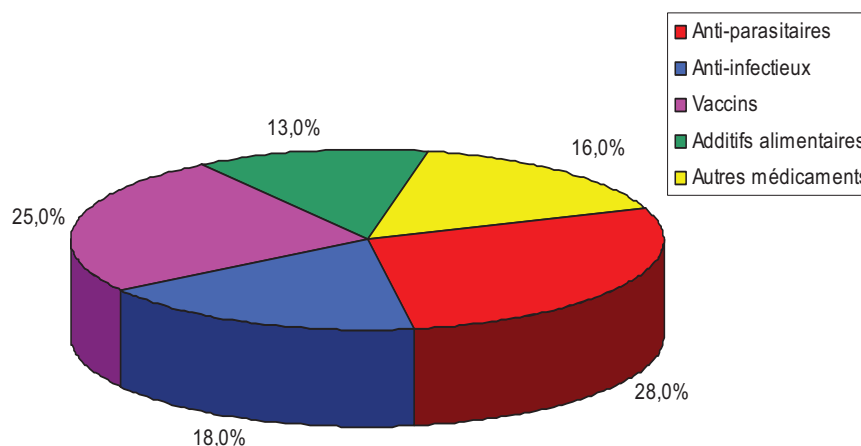


Figure 2. Marché vétérinaire mondial par segment thérapeutique en 2008.

2.1.2 Défis et considérations dans le développement des produits vétérinaires

L'industrie pharmaceutique vétérinaire est confrontée d'une certaine manière aux mêmes défis de formulation que l'industrie pharmaceutique humaine. Néanmoins, la diversité d'espèces et de races, la différence de poids, les différences entre les régions, les différences métaboliques et biologiques entre les animaux, compliquent les stratégies des formulations vétérinaires. Parmi les inconvénients interspèces, représentant un problème pour la conception et pour la performance des formulations, on peut citer : i) les différences d'ADME (absorption, distribution, métabolisme et élimination), ii) les habitudes alimentaires, iii) l'environnement, iv) l'âge et v) le comportement. Par exemple, la vitesse d'absorption de la kanamycine chez le cheval est six fois plus rapide que chez le chien suite à son administration intramusculaire (Ahmed and Kasraian, 2002). Bienque plusieurs problèmes de formulation des produits pour les animaux de compagnie et de ceux pour le bétail soient similaires, les implications thérapeutiques et de sûreté peuvent diverger. A titre d'exemple, la douleur et le gonflement liés à l'administration d'une formulation injectable pour un animal de compagnie peut engendrer un problème d'acceptabilité pour son maître, tandis que pour le bétail le problème le plus important peut être lié à l'endroit de l'injection et aux résidus restant dans les tissus et l'organisme de l'animal suite à l'administration du médicament. Concernant les médicaments parentéraux, les

produits à libération prolongée sont préférés pour des raisons liées au coût suite à des moindres manipulations du produit et au suivi du traitement qui est alors plus facilement respecté. Cependant, les produits injectables à libération prolongée sont plus difficiles à développer et les options technologiques plus limitées, spécialement dû aux contraintes de prix. La viscosité des produits est souvent un obstacle pour leur administration chez le bétail, nécessitant l'utilisation de pistolets d'injection. De plus, les résidus et la douleur lors de l'administration sont plus importants lorsque des produits hautement concentrés sont administrés. Le problème des résidus n'est pas seulement issu du principe actif lui-même mais concerne aussi les excipients choisis lors de la formulation. Ce problème limite donc le choix des technologies et des excipients qui sont appropriés pour la formulation d'injectables à libération prolongée.

De plus, l'utilisation de plusieurs technologies de libération contrôlée est limitée à des principes actifs agissant à faible dose. Ainsi, la formulation et les nouvelles technologies de libération de principes actifs hautement efficaces, stables et libérant de façon prolongée le principe actif, sont intéressantes car elles peuvent permettre d'augmenter la satisfaction du patient, de faciliter le traitement et d'améliorer la performance commerciale de produits. Par exemple, l'utilisation de formulations à libération prolongée à base d'implants peut être une bonne alternative dans les traitements à long terme pour les animaux de compagnie par rapport à l'utilisation de comprimés oraux où le goût du produit joue un rôle très important dans l'administration du médicament. De la même façon, ces systèmes représentent une alternative aux problèmes que l'utilisation de la voie orale entraîne tels que i) la perte de la dose à administrer, ii) la fermeture de la cavité esophagique iii) les effets du flux digestif et iv) les problèmes de biodisponibilités orales propres des principes actifs. De plus, ces systèmes seraient particulièrement adaptés aux traitements nécessitant la libération du principe actif pendant de longues périodes (mois voire années) telles que les parasitoses, les infections bactériennes et les traitements hormonaux. D'autre part, l'utilisation de

matériaux biodégradables pour la formulation des implants et la possibilité de réaliser leur administration par des voies autres que des procédures chirurgicales ou de l'usage des pistolets, sont quelques uns des besoins du secteur de la santé animale. Ainsi, l'utilisation de systèmes microparticulaires biodégradables pouvant être injectés avec des seringues conventionnelles peut se révéler d'une grande utilité dans les thérapies animales (Ahmed and Kasraian, 2002; Sun et al., 2004)

2.2 Parasitoses et Ivermectine

2.2.1 *Les parasitoses chez l'animal*

Les parasitoses représentent un important problème de santé autant pour les animaux agricoles et domestiques, que pour l'homme. La contamination humaine peut avoir lieu à cause de l'étroite relation entre l'homme et l'animal, soit en tant que source d'alimentation, soit en raison de leur proximité comme dans le cas des animaux de compagnie (zoonose). De ce fait, les frais associés aux maladies parasitaires ne correspondent pas exclusivement à ceux des traitements vétérinaires mais aussi à ceux issus des pertes économiques du secteur agroindustriel ainsi qu'à ceux des parasitoses humaines dérivées de la consommation de produits contaminés. Par exemple, l'infestation des vaches laitières pour des ectoparasites tels que les puces, les mouches, les tiques et/ou les mites peut conduire à la perte de poids des animaux et à une moindre production de lait ce qui amène à une faible productivité (Winzenburg et al., 2004).

L'une des parasitoses animales la plus problématique, est la dirofilariose cardiovasculaire. Cette pathologie potentiellement mortelle, est issue de l'infestation pour le parasite *Dirofilaria immitis* populairement connu comme le « ver du cœur » (Heartworm), des artères pulmonaires et du cœur d'un animal hôte. Ce nématode est transmis par la piqûre d'un moustique vecteur à plusieurs espèces de mammifères y compris les loups, les renards, les furets, les lions de mer et rarement à

l'homme (FDA, 2005). Cependant les chiens et les chats de toutes races ou âges, habitant dans des régions chaudes ou tropicales où la population de moustiques est importante, sont spécialement sensibles à cette infestation. A titre d'exemple, on peut citer des études épidémiologiques dans certaines régions des Etats-unis et de l'Italie, montrant une prévalence du « ver du cœur » jusqu'à 70% chez le chien (McTier et al., 2000). De ce fait, l'infestation avec le « ver du cœur » est considérée comme un problème clinique mondial (FDA, 2005).

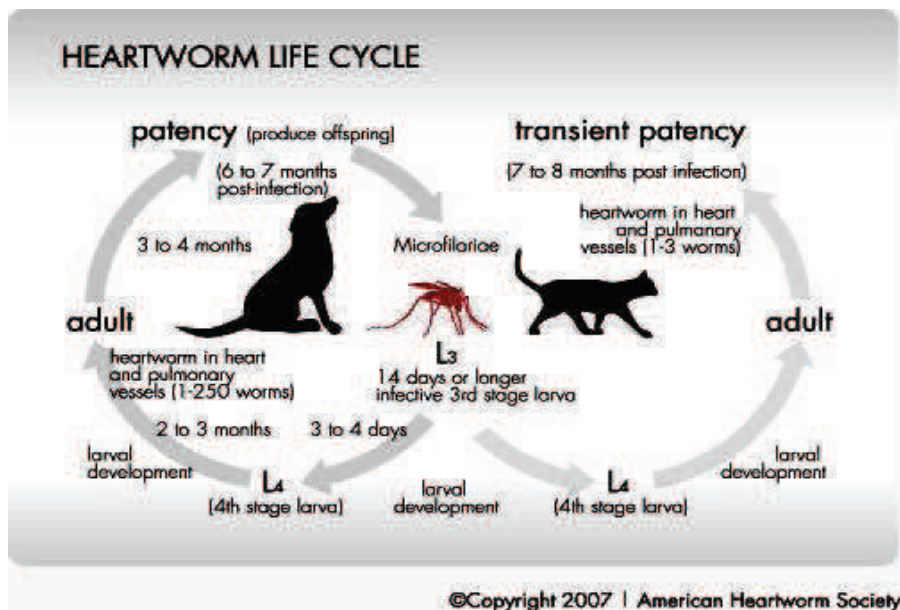


Figure 3. Cycle de vie du « ver du cœur » (AHS, 2010).

Le cycle d'infestation (Figure 3) commence avec la libération dans le sang de l'animal hôte, des microfilariae (forme primaire du parasite), par une femelle adulte du parasite. Le moustique devient infecté par la microfilariae lors de la piqûre des animaux alors qu'il se nourrit de leur sang. Pendant les 10-14 jours suivants, la microfilariae mature à l'intérieur du moustique jusqu'à devenir une larve. Dès lors, le moustique va introduire la larve dans un nouvel animal sensible à chaque nouvelle piqûre. Une fois chez l'animal, la larve devient un ver adulte au bout de 6-7 mois. Il est important de remarquer que la microfilariae ne peut pas devenir un ver adulte sans être passée

préalablement par le moustique. Les chiens qui viennent d'être infestés peuvent ne pas avoir de signes de la maladie, alors que ceux fortement infestés peuvent éventuellement avoir des signes cliniques tels qu'une toux persistante, une réticence à se déplacer ou à faire de l'exercice, une fatigue après un exercice modéré, une réduction de l'appétit et une perte de poids.

L'infestation par le « ver du cœur » de chiens apparemment sains, est couramment détectée par des tests sanguins ou par des antigènes spécifiques soit du ver soit de la *microfilariae*. Cependant, les tests ne sont complètement positifs que sept mois après l'infestation. L'infestation par ce parasite, peut aussi éventuellement être détectée par des images d'ultrason et / ou des rayons- x du cœur ou des poumons. La probabilité d'acquérir le parasite sans un traitement prophylactique, dépend de l'exposition au moustique. Néanmoins, il existe un risque de thromboembolisme et donc de mort de l'animal lors du traitement contre les vers adultes lorsqu'ils se détachent de leur emplacement dans le cœur droit de l'animal (FDA, 2005) (Figure 4). D'autre part, il peut aussi avoir des risques liés aux effets indésirables des médicaments utilisés pour le traitement.

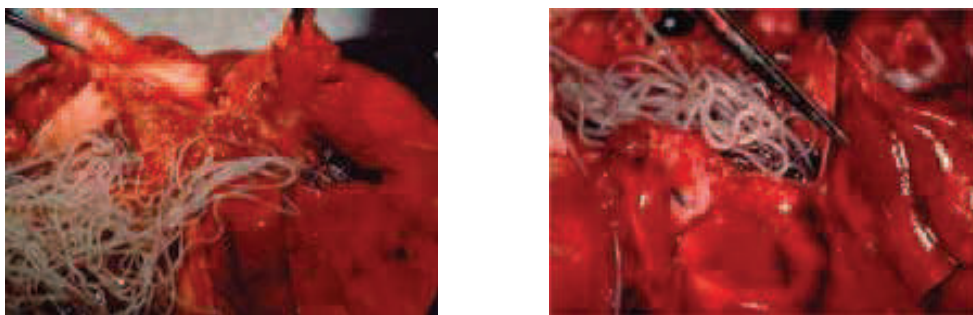


Figure 4. Vers du cœur dans des chiens infestés ; artère pulmonaire (gauche) et cœur (droite) (AHS, 2010).

2.2.2 Chimiothérapie des parasitoses

Depuis les années 1960, des molécules telles que les benzimidazoles (par exemple, levamisole, pyrantel et morantel) ont été utilisées de différentes manières par les vétérinaires afin d'optimiser le contrôle des nématodes chez le bétail et chez les animaux de compagnie. Cependant, l'apparition au

milieu des années 70 des lactones macrocycliques, avec une puissance plus élevée et un spectre plus large, a conduit à un contrôle plus efficace des parasites (Geary, 2005).

2.2.2.1 Les lactones macrocycliques (avermectines)

La prophylaxie contre les parasites a été transformée dans les derniers 25 ans grâce à l'introduction des lactones macrocycliques (McTier et al., 2000; Omura, 2008). Ces composés sont des produits naturels de fermentation de bactéries vivant dans le sol appartenant au genre *Streptomyces*. Ils possèdent une large marge d'activité contre des parasites internes (endo parasites) et externes (ecto parasites) tels que les nématodes (y compris le ver du coeur) et les arthropodes, respectivement. Les lactones macrocycliques comprennent deux groupes principaux : les avermectines et les milbemycines (FDA, 2005). Les avermectines comprennent principalement l'ivermectine, l'abamectine, la doramectine, l'éprinomectine et la sélamectine. Au groupe des milbemycines appartiennent la moxidectine, la némadectine et la milbémycine-oxime (Houdré, 2003; Lifschitz et al., 2004). Les lactones macrocycliques approuvées chez le chien sont l'ivermectine, la moxidectine, la milbémycine-oxime et la sélamectine. Parmi les signes de toxicité des lactones macrocycliques chez les mammifères on peut citer : des pupilles dilatées, des vomissements, de la diarrhée, de la salivation, une désorientation, une manque de coordination, des contractions musculaires, des tremblements, de la dépression et du coma (FDA, 2005). De ce fait, l'un des antiparasitaires les plus utilisés est l'ivermectine en raison de son large spectre d'action associé à une marge de sécurité importante (Gokbulut et al., 2006).

L'ivermectine (IVM) a été la première lactone macrocyclique découverte et la première à être commercialisée. Cette molécule produite par *Streptomyces avermectilis* a été découverte par laboratoires Merck au milieu des années soixante-dix dans le cadre de son programme de « screening » (Geary, 2005). L'IVM correspond à un mélange de deux composants, l'IVM B1a et l'IVM B1b. L' IVM B1a représente 80% du produit et l' IVM B1b correspond au 20% restant

(Gonzalez Canga et al., 2009). L' IVM, comme les autres avermectines, possède un seul groupement pharmacophore responsable de son activité thérapeutique. Il s'agit d'une chaîne macrocyclique principale de 16 atomes à laquelle une fonction benzofurane et une fonction spiroketale sont liées. L' IVM possède également une fraction de sucre connue sous le nom de bisoleandroxyloxy dans le carbone C-13 (Figure 5).

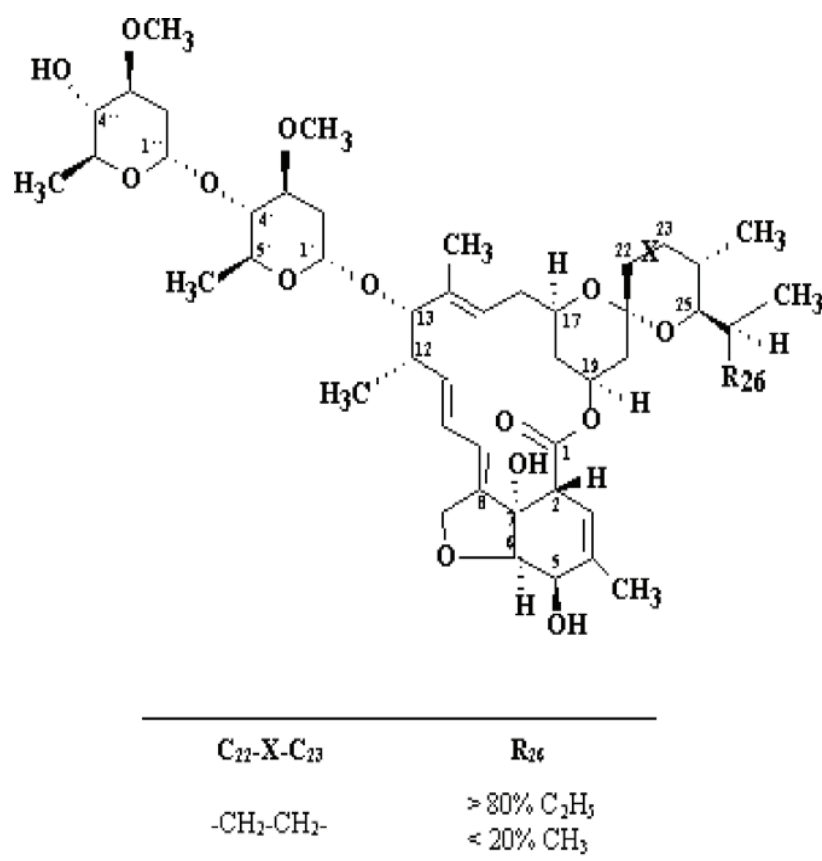


Figure 5. Structure chimique de l'ivermectine (Gonzalez Canga et al., 2009).

L' IVM bloque la neurotransmission en interférant avec la synapse neuromusculaire (Figure 6). En effet, le pharmacophore de l' IVM possède une forte affinité pour les canaux chlorures glutamate-dépendants présents dans les cellules nerveuses et musculaires lesquelles sont communes dans les nématodes et dans les arthropodes. Sa fixation sur ces canaux, favorise une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions chlorures entraînant une hyperpolarisation de la cellule

nerveuse ou musculaire. Il en résulte une paralysie des muscles pharyngés et somatiques pouvant entraîner la mort du parasite. Chez les vertébrés, l'IVM stimule la libération de l'acide gamma amino butyrique (GABA) au niveau des neurones du cerveau cependant, grâce à la barrière hémato-encéphalique le principe actif est très sûr pour les mammifères (Omura, 2008).

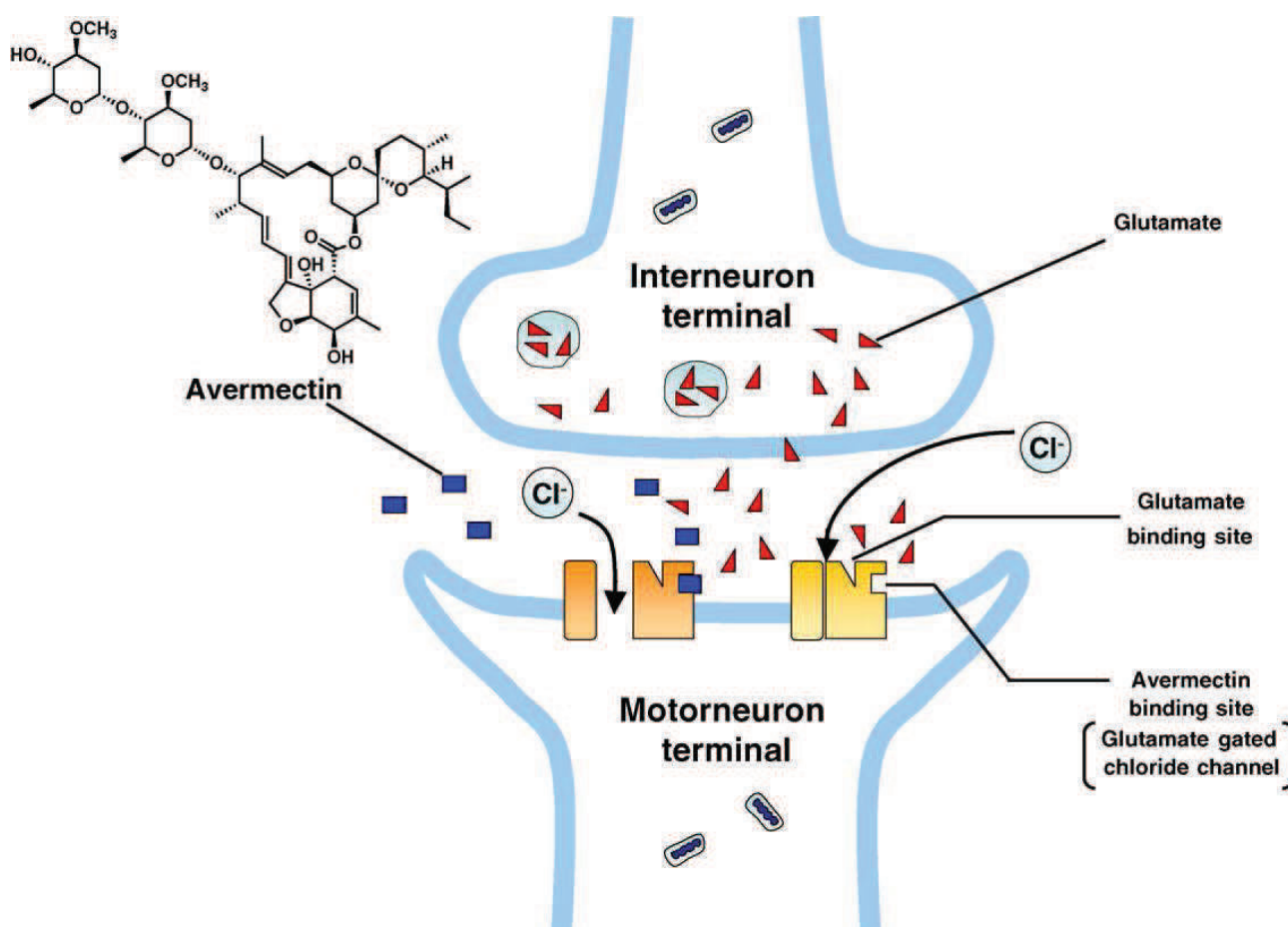


Figure 6. Mécanisme d'action des avermectines (dont l'ivermectine) (Omura, 2008).

Depuis son introduction en 1981, de nombreuses études pharmacocinétiques sur l'IVM ont été réalisées. Le principe actif peut être administré par la voie orale, intramusculaire (IM), sous-cutanée (SC) ou topique en fonction des espèces animales ciblées (Figure 7). Les propriétés pharmacocinétiques dépendent de la dose qui est généralement entre 200 et 500 µg/kg. De ce fait, la biodisponibilité augmente de façon linéaire avec la dose administrée. La voie d'administration et la

formulation affectent fortement la pharmacocinétique de l'IVM. La biodisponibilité la plus grande pour l'IVM est obtenue par injection sous-cutanée (Gonzalez Canga et al., 2009). L'administration parentérale retarde l'absorption d'IVM par rapport à la voie orale cependant, elle fournit une biodisponibilité plasmatique globale plus élevée, une prolongation de l'activité et une efficacité supérieure. Bien qu'elle soit un principe actif de classe II selon le système de classification biopharmaceutique (BCS) (Takano et al., 2006) (voir chapitre 2.3.1), donc avec une bonne perméabilité gastrointestinale, la faible solubilité dans l'eau de l'IVM (4 µg/mL) (Gonzalez Canga et al., 2009) associée à une fixation aux aliments au niveau intestinale (Gokbulut et al., 2006) et la prise en charge par la glycoprotéine d'efflux P intestinale (Gonzalez Canga et al., 2009), expliquent que sa biodisponibilité orale soit faible et variable entre les différentes espèces animales. En raison de sa lipophilicité élevée ($\log P = 3,22$) (Loffler and Ternes, 2003), l'IVM se distribue largement dans tout l'organisme dans toutes les espèces. De plus, elle s'accumule dans le tissu gras, lequel agit à son tour comme un réservoir du principe actif. L'IVM est fortement liée à l'albumine et aux protéines plasmatiques. D'autre part, ce principe actif est peu métabolisé. Les principaux métabolites de l'IVM trouvés chez le rat, le mouton et les bovins sont le 24-OH-H2B_{1a} et le 24-OH-H2B_{1b}. De ce fait, la plupart de la dose administrée est éliminée sans aucun changement. L'IVM est principalement éliminée dans les fèces (>90%) pour toutes les espèces indépendamment de la voie d'administration. Seulement environ 2% de l'IVM administrée sont éliminés dans l'urine. Puisque la glycoprotéine P est aussi présente dans les canaux biliaires, ceci peut contribuer à un fort degré d'excrétion fécale de l'IVM. Elle peut aussi être éliminée par les glandes mammaires chez les vaches laitières, les ovins et les caprins du fait de sa haute lipophilicité. Suite à une administration intraveineuse, la demi-vie plasmatique de l'IVM est plus longue dans les espèces ruminantes que dans les espèces monogastriques. L'excrétion de l'IVM est aussi affectée par la formulation étant plus faible lorsque le principe actif est formulé dans un véhicule non aqueux que dans un véhicule aqueux (Gonzalez Canga et al., 2009).

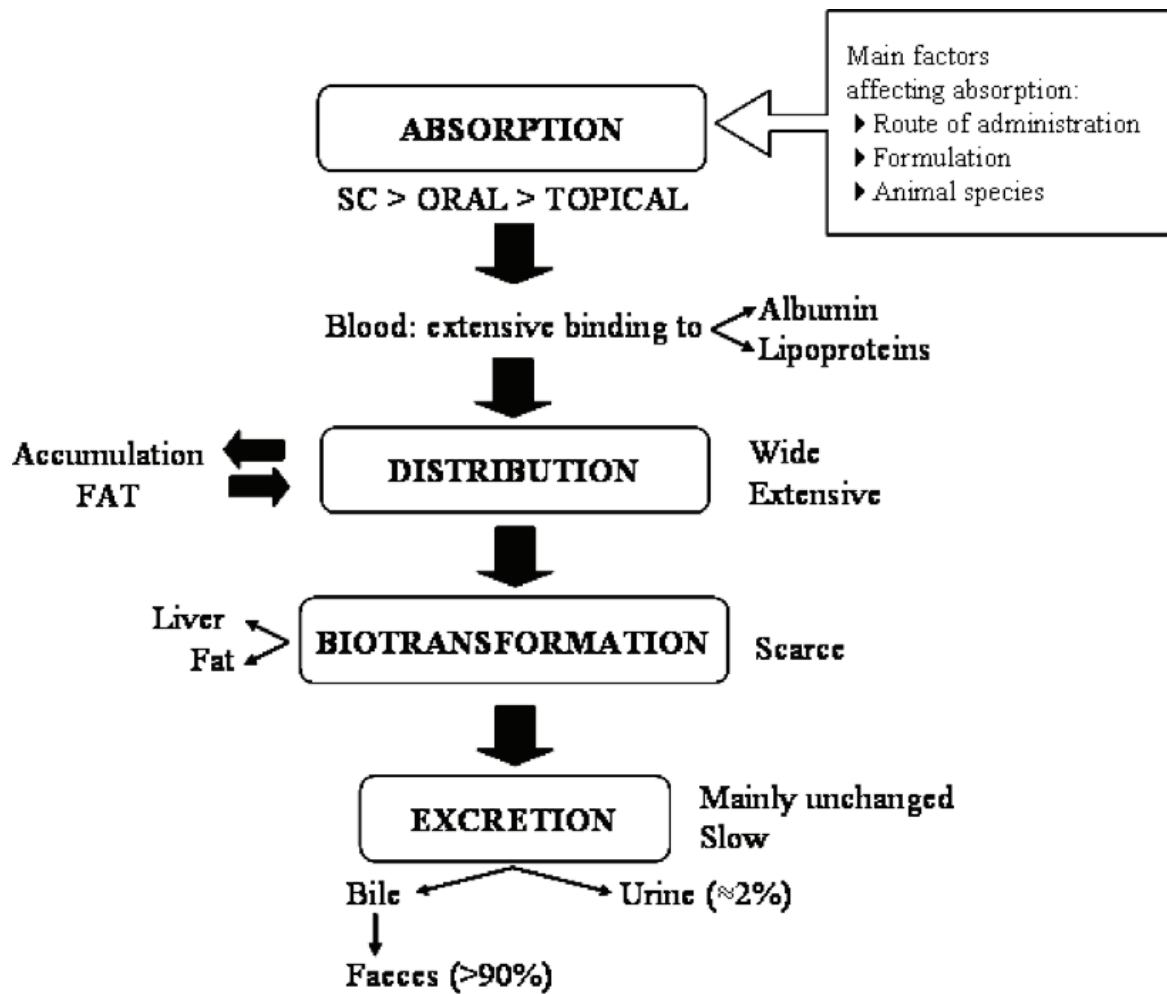


Figure 7. Pharmacocinétique de l'ivermectine (Gonzalez Canga et al., 2009).

2.2.2.2 Optimisation galénique des traitements parasitaires

Depuis sa découverte, l'IVM a été formulée de différentes manières et sous différentes formes pharmaceutiques afin de combattre les parasitoses vétérinaires. De ce fait, les formulations sur le marché comprennent des formes classiques telles que des solutions pour l'application externe « pour-on » (Ivomec[®] Pour-On), des comprimés à croquer (Heartgard-30[®]), des pâtes à usage oral (Noramectin[®]) et des solutions injectables (Ivomec[®] 1%). Cependant, ces formulations doivent être administrées régulièrement, ce qui constitue un problème, particulièrement dans le cas des animaux

de compagnie, où l'oubli d'une administration du médicament est plausible. De plus, les produits doivent être correctement administrés, ce qui peut être problématique pour certains maîtres. Dans le cas des produits administrés par voie orale, il existe aussi la probabilité qu'ils soient crachés ou vomis par l'animal. En ce qui concerne le traitement contre le « ver du cœur » l'oubli d'une dose pendant plus de 30 jours, représente un fort risque pour l'animal d'être infesté par le parasite. Enfin, un traitement non respecté peut entraîner l'apparition de résistances des parasites aux molécules antiparasitaires. Un certain nombre de cas de résistance à l'IVM sont apparus sur des petits ruminants dans des régions où les traitements contre les nématodes sont intensifs afin d'optimiser la productivité des animaux. Cependant, il n'existe pas de cas rapportés de résistance du « ver du cœur » à l'IVM chez le cheval (Geary, 2005).

2.3 Les différentes possibilités d'optimisations galéniques

L'une des solutions à l'apparition des résistances des molécules est la recherche de nouvelles molécules antiparasitaires, un processus par ailleurs très coûteux et souvent peu rentable à long terme pour les industries pharmaceutiques à cause de l'expiration des brevets d'exploitation. La découverte et le développement d'un antiparasitaire peut coûter environ 1 M\$ (Geary and Thompson, 2003). De nos jours, une approche plus attractive consiste à modifier la pharmacocinétique des principes actifs existants afin d'optimiser leur utilisation. De ce fait, dans le but d'améliorer les traitements à base d'IVM et de surmonter les inconvénients liés à une application répétée des formulations existantes et à la faible biodisponibilité orale de l'IVM, quelques efforts ont été réalisés notamment dans le domaine de la formulation de médicaments parentéraux à libération prolongée. Ces formulations maximisent la biodisponibilité du principe actif à l'interface hôte-parasite pendant une longue période, étant alors plus efficaces (Hennessy, 1997). Ainsi, de nouveaux systèmes de libération « intelligents » tels que des liposomes (Bassissi et al., 2006), des implants de silicone (Maeda et al., 2003) et des microparticules biodégradables à

base de protéines de maïs (Liu et al., 2005) ou de polyesters synthétiques (Clark et al., 2004; Miller et al., 1999; Miller et al., 1998) ont été développés afin d'augmenter le temps de libération de l'IVM. Cependant, les coûts associés au développement de ces technologies par rapport aux revenus perçus de leur commercialisation, représentent une forte contrainte dans le domaine du développement pharmaceutique vétérinaire. De ce fait, jusqu'à présent, il n'existe pas de produits injectables à libération prolongée à base d'IVM pour le traitement à long terme du « ver du cœur » chez le chien. Néanmoins, la sensibilité au prix des produits pour les animaux de compagnie est moins importante par rapport à celle des produits pour les animaux de ferme qui sont source d'aliments (Rothen-Weinhold et al., 2000). Seul le produit ProHeart® 6 (Fort Dodge) à base de moxidectine (10% w/w) a été mis sur le marché en 2001 aux Etats-Unis pour le traitement de cette parasitose (FDA, 2010). Les versions européenne et Japonaise de ce produit sont commercialisées sous le nom de Guardian® SR (Fort Dodge) (Glickman et al., 2005) et de Moxidect® SR (Fort-Dodge, 2008), respectivement. ProHeart® 6 est une préparation injectable microparticulaire à base de triestearate de glycéryle pour l'administration sous-cutanée, libérant le principe actif pendant 6 mois, ce qui élimine le problème des administrations répétées (Fort-Dodge, 2010). De plus, le produit est administré par un professionnel vétérinaire, garantissant ainsi sa correcte application. Cependant, ce produit a conduit à de nombreux effets indésirables (réactions anaphylactiques, des maladies du foie, des maladies auto-immunes et des convulsions) qui ont conduit au décès de plusieurs chiens aux Etats-Unis. Ainsi, après plusieurs révisions d'étiquette demandées par la FDA et des lettres 'Cher Docteur' (« Dear Doctor ») diffusées aux vétérinaires, le produit a été volontairement retiré du marché en 2004. Sa réintroduction au marché a été réalisée en 2008 suite à la réalisation d'un contrôle strict des risques réalisé par Fort Dodge Animal Health (Fort-Dodge, 2010).

2.3.1 Le système de classification biopharmaceutique (BCS)

Sur la base de leur solubilité et de leur perméabilité intestinale, les principes actifs ont été classés selon un système dit de classification biopharmaceutique (BCS) (Amidon et al., 1995). Ce système comprend quatre groupes différents de molécules (Figure 8). Celles qui possèdent une haute solubilité et une haute perméabilité (Classe I) n'ont généralement pas de problèmes de biodisponibilité, étant rapidement absorbées par l'organisme. Les molécules dont la solubilité dans les fluides du tractus gastro-intestinal est faible (classe II et IV), que leur perméabilité soit élevée ou faible, ont moins de chance d'être absorbées. Enfin, les principes actifs de la classe III, à haute solubilité et basse perméabilité pour lesquels le franchissement de la barrière intestinale est difficile, sont rapidement éliminés par voie digestive.

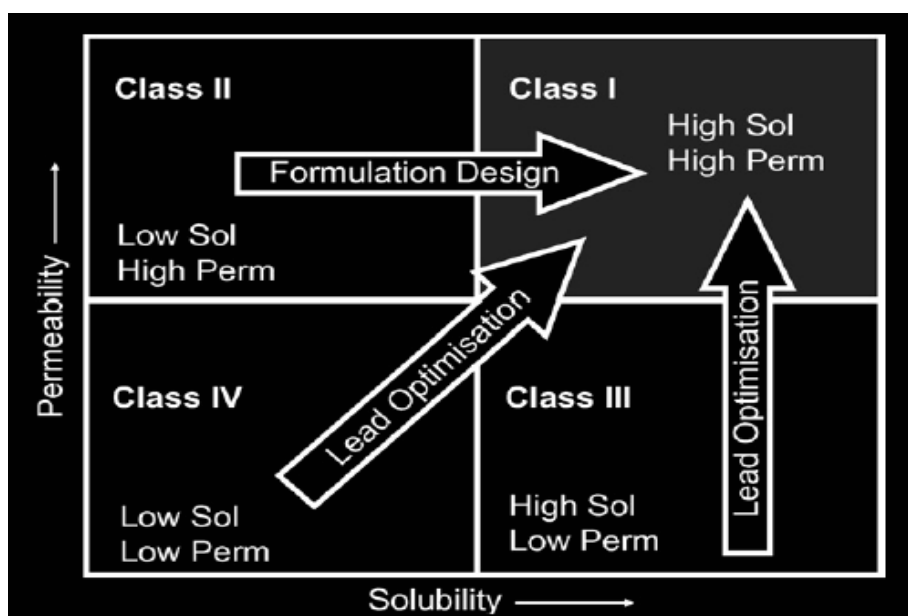


Figure 8. Représentation du système de classification biopharmaceutique (BCS) (Pouton, 2006).

Un des problèmes les plus étudiés par l'industrie pharmaceutique est l'augmentation de la solubilité (Classe II et IV) ou de la perméabilité (Classe III et IV) des principes actifs afin d'améliorer également leur biodisponibilité orale puisque cette voie, la plus naturelle, est la plus souvent utilisée. Plusieurs stratégies ont été utilisées pour augmenter la solubilité aqueuse des principes

actifs très faiblement solubles, telles que i) la réduction de la taille des particules de principe actif par des méthodes physiques (comme par exemple la micronisation) (Pouton, 2006), ii) leur formulation dans des systèmes à base de lipides tels que les nanocapsules lipidiques (Heurtault et al., 2000; Huynh et al., 2009), les nanoparticules solides lipidiques (Lucks and Müller, 1991; Souto and Müller, 2010; Varshosaz et al., 2010) ou les systèmes auto-émulsifiants (Pouton, 2006), iii) leur complexation avec des molécules les rendant plus hydrophiles comme la polyvinyl-pyrrolidone (PVP) (Kubin et al., 2008; Palmieri et al., 2002; Ruan et al., 2005) ou les cyclodextrines (Carrier et al., 2007; Gamsiz et al., 2010; Ruan et al., 2005), iv) sans oublier leur éventuelle modification chimique afin d'obtenir des sels plus solubles dans l'eau (Pouton, 2006; Stella and Nti-Addae, 2007). Cependant, même si la solubilité d'un principe actif a été améliorée par certaines des méthodes précédentes, sa perméabilité intrinsèque n'en sera pas moins affectée par les facteurs environnementaux rencontrés lors de son passage le long du tractus gastrointestinal tels que la présence d'aliments (fixation), le pH (dégradation) ou l'existence de protéines d'efflux comme la glycoprotéine P (efflux) (Huynh et al., 2009; Lespine et al., 2007). La voie orale n'est donc pas toujours recommandée et d'autres voies d'administration doivent alors être utilisées. Ce problème peut devenir plus critique lorsque le patient visé est un enfant, un malade, une personne âgée ou un animal, cas où l'administration orale est beaucoup plus compliquée.

Ainsi, si le recours à la voie orale s'avère impossible, une des voies envisagées peut être la voie parentérale : elle comprend principalement, les voies intraveineuse (IV), intramusculaire (IM) et sous-cutanée (SC). Malgré une acceptation limitée par les patients, la voie parentérale possède un nombre d'avantages importants tels que i) un effet thérapeutique rapide, ii) une complète biodisponibilité du principe actif dans le cas de la voie IV iii) l'affranchissement de l'effet de premier passage hépatique iv) l'absence de dégradation ou de fixation du principe actif lors du transit gastro-intestinal v) ou encore la possibilité de constituer un réservoir à partir duquel la

libération prolongée des principes actifs peut avoir lieu. Ce dernier avantage a été très exploité soit chez l'homme soit chez l'animal, pour des thérapies concernant la fertilité, la vaccination/immunisation, l'hormonothérapie, la thérapie à base de protéines thérapeutiques, le traitement des pathologies chroniques comme les infections bactériennes ou virales, les infestations parasitaires, le cancer, les maladies auto-immunes, les maladies du système nerveux central entre autres, où des traitements à long terme sont souvent nécessaires. Cependant, la toxicité et la pharmacocinétique du principe actif doivent être suffisamment connues et maîtrisées (Burgess et al., 2002).

Les formulations parentérales à libération prolongée ont été utilisées pour améliorer la réponse thérapeutique en assurant des niveaux sanguins plus appropriés et stables par rapport à ceux obtenus avec les formulations à libération immédiate (Figure 9).

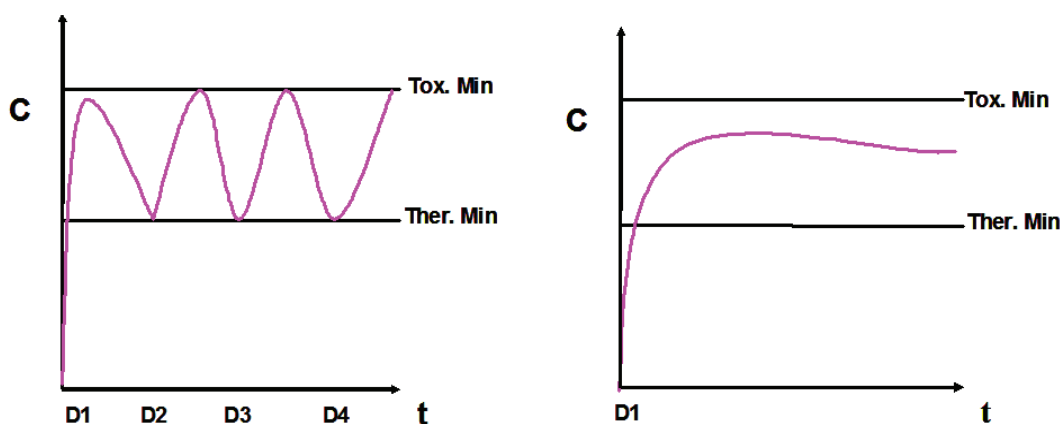


Figure 9. Niveaux systémiques obtenus à partir de formes à libération immédiate (gauche) et prolongée (droite).

En règle générale, moins d'effets indésirables sont observés en raison de la moindre quantité de principe actif nécessaire pour atteindre les niveaux systémiques souhaités. De plus, l'observance et le confort du patient sont améliorés compte tenu du plus faible nombre d'administrations. Parmi les systèmes parentéraux à libération prolongée se trouvent les suspensions, les liposomes, les

microsphères, les gels et les implants. Les microsphères et les implants peuvent être utilisés pour obtenir des profils de libération des principes actifs qui couvrent de très longues périodes (mois, voire années) tandis que les suspensions, liposomes et gels ont des effets généralement beaucoup plus courts (Burgess et al., 2002).

La libération prolongée des principes actifs peut être obtenue par leur incorporation dans des matériaux polymériques (par exemple à base de polymères biodégradables) afin d'obtenir des profils de libération prédéfinis et beaucoup plus reproductibles (Winzenburg et al., 2004).

2.3.2 Polymères biodégradables pour la libération prolongée des principes actifs

La distinction entre polymères dégradables et non-dégradables n'est pas complètement claire et elle est en réalité arbitraire car tous les polymères sont en effet dégradables. Cependant cette différence semble être fondée sur le temps de dégradation du polymère par rapport au temps pendant lequel il est encore fonctionnel. Par exemple, un matériel dégradable peut être défini comme celui dont la dégradation a lieu durant ou tout suite après que son application soit terminée. Par contre, les matériaux non-dégradables sont ceux dont la dégradation couvre un temps beaucoup plus long que la durée de leur application thérapeutique.

Les polymères peuvent être dégradés par plusieurs facteurs tels que les rayons UV, la température, le stress mécanique et par des agents chimiques. Si la dégradation d'un polymère peut être catalysée par le système enzymatique ou l'environnement chimique (ex. acide) généré par l'organisme biologique qui le contient, le terme « biodégradable » est utilisé pour désigner ce polymère. Tous les polymères biodégradables contiennent des liaisons hydrolysables. De ce fait, leur principal mécanisme de dégradation est l'hydrolyse soit chimique soit enzymatique (Bastioli, 2005; Göpferich, 1996).

Dans un premier temps, des polymères non-biodégradables, mais biocompatibles, tels que les silicones (Folkman and Long, 1964; Folkman et al., 1966; Hoffman, 2008), les polyuréthanes et les copolymères d'acétate de vinyle éthylène ont été utilisés pour la fabrication de systèmes parentéraux à libération prolongée notamment dans le domaine vétérinaire (Winzenburg et al., 2004). Malgré leurs bonnes performances, l'utilisation de ces systèmes est limitée car ils doivent être retirés du patient par voie chirurgicale une fois leur fonction achevée (Bodmeier and McGinity, 1988; Uhrich et al., 1999; Winzenburg et al., 2004). Ainsi, des polymères naturels biodégradables tels que l'albumine de sérum bovin (ASB), l'albumine de sérum humain (ASH), le collagène et la gélatine ont été utilisés pour la préparation de systèmes à libération contrôlée. Cependant, en raison de leur coût, de la non reproductibilité des différents lots préparés avec ces polymères, ainsi qu'aux risques de contamination virale ou par des prions (collagène et albumine), ces polymères naturels ont été largement remplacés par des polymères biodégradables synthétiques (Jain, 2000; Matschke et al., 2002).

Ainsi, les polymères synthétiques biodégradables tels que les poly(anhydrides), les poly(orthoesters), les poly(amides) et surtout les poly(esters) aliphatiques [(polymères d'acide lactique (PLA), copolymères d'acides lactique et glycolique (PLGA), et poly-ε-caprolactone (PCL)] sont principalement utilisés pour le développement de formes galéniques innovantes (Matschke et al., 2002; Uhrich et al., 1999). Parmi eux, les polymères les plus attractifs et donc les plus couramment utilisés sont le PLGA, le PLA et la PCL (Winzenburg et al., 2004). De plus, leur utilisation dans la libération des principes actifs (Anderson and Shive, 1997; Jain, 2000; Legrand et al., 2007; Matschke et al., 2002) a été autorisée par la FDA (Food and Drug Administration) ou l'EMA (European Medicines Agency). Le tableau 1 contient une liste de produits commerciaux à libération prolongée fabriqués à partir de PLGA et/or PLA.

Tableau 1 Quelques produits commerciaux à libération prolongée d'administration parentérale à base de PLA ou PLGA

Produit	Laboratoire	Forme Pharmaceutique	Principe actif
Profact® Depot	Aventis Pharma	Implant	Acétate de busereline
Zoladex®	AstraZeneca	Implant	Acétate de gosereline
Lupron Depot®	Takeda-Abbott	Microparticules	Acétate de Leuprolide
Nutropin Depot®	Genetech	Microparticules	Hormone humaine de croissance
Posilac®	Monsanto	Microparticules	Somatropine bovine recombinante
Decapeptyl®	Debiopharm	Microparticules	Triptoreline
Risperidal Consta®	Janssen-Cilag	Microparticules	Risperidone
Trestal® Depot	Dephiopharm	Microparticules	Pamoate de triptoreline
Uropeptyl® Depot	Uropharm	Microparticules	Acétate de triptorelin
Pamorelin® LA	Ipsen Pharma	Microparticules	Acétate de triptorelin
Eligard™	Atrix Laboratoires	Implant injectable	Acétate de leuprolide
Doxirobe™	Pfizer	Implant injectable	Doxycycline
Atridox®	Atrix Laboratoires	Implant injectable	Doxycycline hyclate

Les polyesters à base d'acide lactique (PLA), d'acide glycolique (PGA) et leurs copolymères d'acide lactique-co-glycolique (PLGA) sont les polymères biodégradables les plus étudiés et les mieux caractérisés (Uhrich et al., 1999). Ces polymères ont été les premiers à être utilisés pour la fabrication de sutures utilisables chez l'homme grâce à leurs caractéristiques de résorption (Dexon sutures -1970) (Brannon-Peppas and Vert, 2000).

En effet, leurs excellentes propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité (Anderson and Shive, 1997; Bastioli, 2005; Jain, 2000; Lewis, 1990) en ont fait des polymères très intéressants pour l'obtention de systèmes à libération prolongée (Brannon-Peppas, 1995; Brannon-Peppas and Vert, 2000). Ainsi, lors de leur dégradation dans le corps, ces polymères sont hydrolysés jusqu'à l'obtention de produits facilement assimilés par l'organisme (Park, 1995). Par exemple, le PLGA est dégradé en acide lactique et glycolique. L'acide lactique intègre alors le cycle de l'acide tricarboxylique pour être ensuite métabolisé puis éliminé sous la forme de dioxyde de carbone et

d'eau. L'acide glycolique est éliminé, soit sans être métabolisé, soit après sa transformation par le cycle de l'acide tricarboxylique sous la forme de dioxyde de carbone et d'eau (Jain, 2000) (Figure 10).

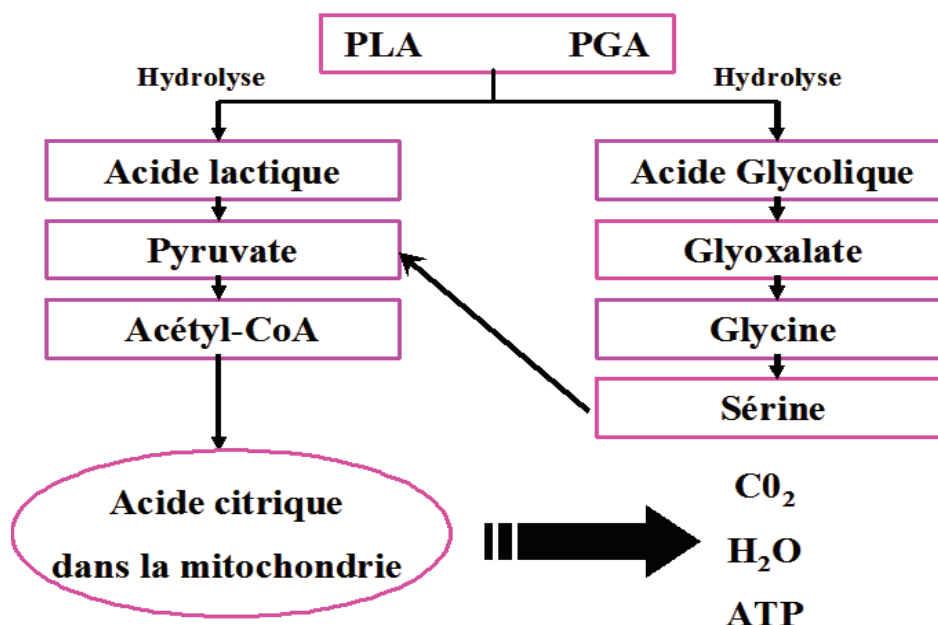


Figure 10. Biodégradation des copolymères d'acide lactique/glycolique (PLGA).

2.3.2.1 Synthèse des polymères d'acide lactique et/ou glycolique

Les deux principales voies de synthèse pour l'obtention de ce type de polyesters sont la polycondensation et la polymérisation par ouverture de cycle des lactones cycliques issues de deux monomères. Cependant, la technique par polymérisation (Figure 11) est la plus souvent utilisée parce que des polymères de masse moléculaire supérieure à 10.000 g/mol peuvent être obtenus tandis que par polycondensation, les masses obtenues sont très faibles < 5.000 g/mol (Brannon-Peppas and Vert, 2000).

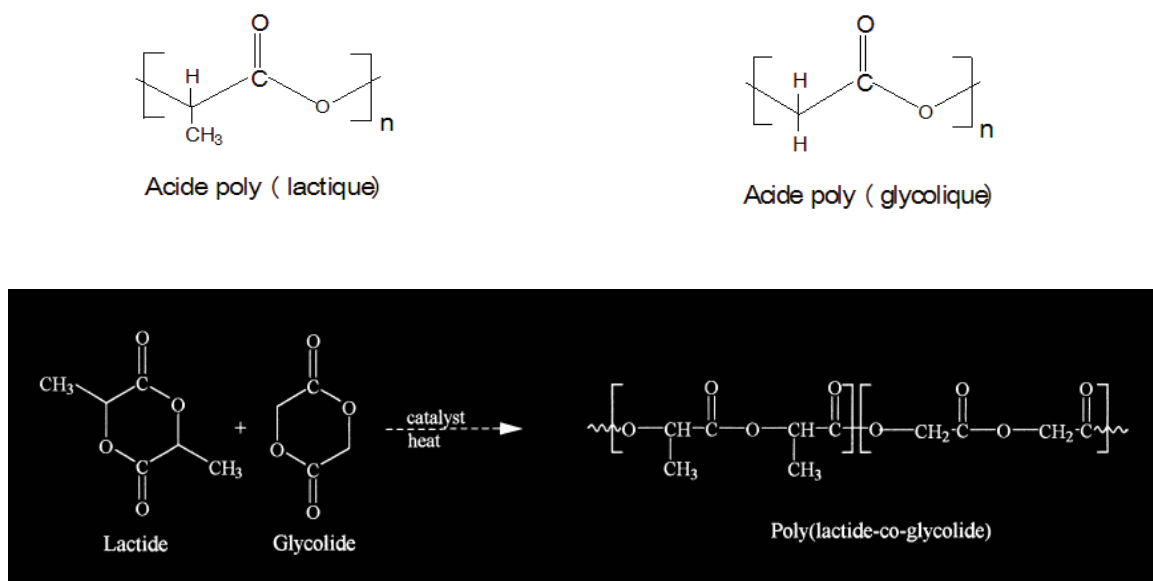


Figure 11. Synthèse de PLGA par ouverture de cycle à partir des lactones cycliques des monomères

De par leur solubilité dans une large variété de solvants organiques et leur possibilité d'être extrudés sous différentes formes, plusieurs systèmes de délivrance de principes actifs tels que des implants, des microparticules, des nanoparticules, des films et des pellets ont été fabriqués avec ces polymères. Cependant, la compréhension préalable des propriétés physico-chimiques des polymères est très importante lorsqu'un système à libération prolongée doit être conçu (Brannon-Peppas and Vert, 2000; Jain, 2000). Un large spectre de performances peut être obtenu avec ces polymères, en fonction de la stéréochimie et du rapport des monomères, de la masse moléculaire, du degré de ramification et de la cristallinité (Park, 1995).

Les premiers travaux concernant ces polymères ont été réalisés avec les polymères de PLA plutôt qu'avec les co-polymères de PLGA notamment en raison de la faible disponibilité du monomère glycolique (Lewis, 1990). L'acide lactique possède un carbone asymétrique (carbone- α) ce qui signifie qu'il peut exister soit sous la forme L (lévogyre) soit sous la forme D (dextrogyre). De ce fait, les polymères correspondants peuvent être D-PLA, L-PLA ou DL-PLA (mélange racémique)

(Yang et al., 2001). Puisque l'acide L-lactique est naturel et endogène, le L-PLA est considéré comme le plus biocompatible des polyesters (Uhrich et al., 1999). Le L-PLA est également un matériau semi-cristallin ($\approx 35\%$ de cristallinité, dû au haut degré de régularité de ses chaînes), avec une température de transition vitreuse (T_g) d'environ 65°C et une température de fusion (T_f) entre 170 et 180°C . En revanche, le DL-PLA avec une distribution plus aléatoire des stéréoisomères est amorphe et avec une T_g qui varie en fonction de sa masse moléculaire (Yang et al., 2001). C'est pourquoi, la vitesse de dégradation du DL-PLA est plus élevée que celle du L-PLA. En outre, puisque le PGA ne possède pas le groupement méthyle porté par le PLA, il est plus cristallin (Jain, 2000; Tice and Cowsar, 1984) ($35\text{-}75\%$ de cristallinité) (Yang et al., 2001) avec une T_g entre $25\text{-}65^\circ\text{C}$ et une T_f entre $185 - 225^\circ\text{C}$. Les PLGA préparés à partir de L-PLA et PGA sont cristallins tandis que ceux issus de D,L-PLA et PGA sont amorphes (Jain, 2000).

2.3.2.2 Dégradation et érosion des polymères d'acide lactique et/ou glycolique

Le terme « dégradation » a un sens plus chimique et consiste en un clivage des chaînes polymériques conduisant à l'obtention d'unités plus petites telles que les oligomères et les monomères. Par contre, « l'érosion » fait référence à la perte physique (diffusion) du matériau (oligomères et monomères) quittant la masse initiale de polymère suite à la dégradation. Tous les polymères biodégradables partagent la propriété d'être érodés après s'être dégradés (Göpferich, 1996).

La dégradation des polyesters aliphatiques en contact avec des tissus vivants ou des fluides corporels possédant des enzymes est vue, de façon générale, comme le résultat d'une hydrolyse abiotique des liaisons ester (Brannon-Peppas and Vert, 2000). En effet, comme ces polymères ne sont pas naturels, le système enzymatique ne participe pas de façon importante, au moins dans les étapes initiales, à la dégradation des polyesters. C'est pourquoi, ils sont principalement dégradés par simple hydrolyse chimique (Vert, 2005). En effet, lorsqu'un système de libération de principes

actifs à base de ces polymères est mis en contact avec un milieu aqueux, l'eau pénètre dans le système induisant l'hydrolyse des liaisons esters. Chaque hydrolyse d'une liaison ester génère un nouveau groupe carboxyle terminal qui peut à son tour catalyser l'hydrolyse d'autres groupes esters ; il s'agit d'un phénomène appelé « autocatalyse » (Grizzi et al., 1995; Pitt et al., 1981; Siepmann et al., 2005). De ce fait, un microenvironnement acide au sein de ces systèmes a été constaté (Fu et al., 2000). Ceci explique que l'absorption d'eau est un paramètre critique dans la biodégradation de ces polymères. Ensuite, les macromolécules partiellement dégradées restent insolubles dans l'environnement aqueux et la dégradation continue de façon homogène. Néanmoins, une fois que la masse moléculaire des macromolécules partiellement dégradées soit devenue suffisamment faible pour permettre la solubilisation des oligomères dans le milieu aqueux environnant, ceux-ci diffusent dans la masse en se déplaçant lentement vers et hors de la surface tout en continuant à se dégrader. Ce processus impliquant des phénomènes de diffusion, de réaction chimique et de solubilisation conduit à une différence entre les vitesses de dégradation à la surface et à l'intérieur de la matrice de libération. En effet, les oligomères quittent la surface du système de libération avant qu'ils soient complètement dégradés contrairement à ceux issus de la dégradation interne. Ainsi, l'effet catalytique à la surface est faible en comparaison avec celui subi à l'intérieur. La perte des chaînes oligomériques à partir de la matrice de libération entraîne « l'érosion » de cette dernière (Brannon-Peppas and Vert, 2000; Vert, 2005).

Les poly(esters) subissent donc une érosion dans la masse (« bulk erosion ») (homogène) résultant d'une vitesse de dégradation des chaînes polymériques plus faible par rapport à la vitesse de pénétration de l'eau à l'intérieur de la matrice. Dans ce type d'érosion, la matrice entière subit la perte de masse de façon homogène et donc, la taille de la matrice reste constante durant un temps considérable. Par contre, lorsque la vitesse de dégradation du polymère est plus importante par rapport à la vitesse de diffusion de l'eau à l'intérieur de la matrice, l'érosion a lieu à la surface

(« surface erosion ») (hétérogène) et la matrice devient plus réduite au cours du temps bien qu'elle conserve sa forme (Göpferich, 1996; Shah et al., 1992) (Figure 12). Les systèmes à base de poly(ortho-esters) ou poly(anhydrides) subissent ce type d'érosion dû au fait qu'ils possèdent des liaisons chimiques plus sensibles à l'hydrolyse (Arifin et al., 2006; Göpferich, 1996, 1997; Uhrich et al., 1999).

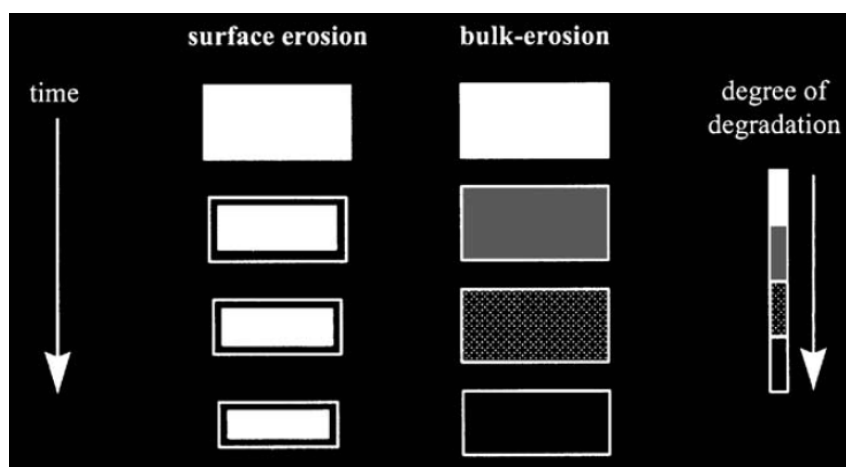


Figure 12. Changements physiques subis dans une matrice polymérique suite à une dégradation dans la masse ou à la surface (Burkersroda et al., 2002)

Suite à l'érosion de la matrice, des structures poreuses peuvent être obtenues notamment lorsque des polymères amorphes ont été utilisés (Shah et al., 1992), ce qui n'est pas le cas avec les polymères cristallins, pour lesquels la cristallisation des produits de dégradation suite à leur dégradation empêche la formation des pores (Brannon-Peppas and Vert, 2000). La porosité acquise par le système de libération lors de son érosion peut être mise en évidence par des méthodes comme la porosimétrie au mercure (Göpferich, 1996) ou la microscopie électronique à balayage (MEB) (Shah et al., 1992). Le processus d'érosion peut également être suivi par la diminution de la masse molaire du polymère (Pitt et al., 1981) ou par la perte gravimétrique de l'échantillon étudié (Göpferich, 1996).

Plusieurs facteurs peuvent affecter la dégradation du système de libération et donc la libération du principe actif. Parmi eux, les plus importants sont la composition chimique de la matrice, la masse molaire du polymère, la morphologie et la taille de la matrice et logiquement, la nature du milieu dans lequel la dégradation a lieu (pH, enzymes...) (Brannon-Peppas and Vert, 2000). Certains de ces facteurs ont une influence sur le processus sans doute le plus critique pour la dégradation des polyesters à savoir la pénétration d'eau dans la matrice (Göpferich, 1996; Pitt and Shah, 1995).

La composition chimique du polymère détermine les deux propriétés fondamentales pour sa dégradation que sont la cristallinité et l'hydrophobicité. En effet, plus la cristallinité et l'hydrophobicité du polymère augmentent, moins sa vitesse de dégradation est importante. D'un point de vue chimique, la dégradation du polymère doit être comprise comme un phénomène complexe et multifactoriel. Par exemple, le monomère glycolique est plus hydrophile que le monomère lactique, porteur d'un groupement méthyle exerçant un effet stérique sur la molécule d'eau et gênant ainsi son approche. Toutefois, malgré le degré de cristallinité plus faible des homopolymères de PLA par rapport à ceux de PGA, les premiers sont plus lentement dégradés (Uhrich et al., 1999). Ainsi, comme le PLA est plus hydrophobe que le PGA, les copolymères de PLGA à teneur élevée en PLA sont moins hydrophiles, absorbent moins d'eau et donc sont dégradés plus lentement (Jain, 2000). De plus, l'hydrolyse des régions amorphes du polymère est plus rapide que celle des régions cristallines (Huang, 2005). C'est pourquoi, différents temps de dégradation peuvent être obtenus avec les copolymères de PLGA simplement en modifiant le rapport lactique/glycolique (Frank et al., 2005; Park, 1995; Yang et al., 2001). La cristallinité des PLGA dépend du type et du rapport molaire des monomères dans les chaînes du copolymère. C'est pourquoi, les PLGA de rapport lactique : glycolique (50:50) sont dégradés plus rapidement que ceux contenant des proportions plus élevées d'un des deux monomères (Brannon-Peppas and Vert, 2000) (Figure 13). Ces copolymères sont actuellement les plus utilisés pour des applications biomédicales telles que la libération prolongée de principes actifs (Huang, 2005)

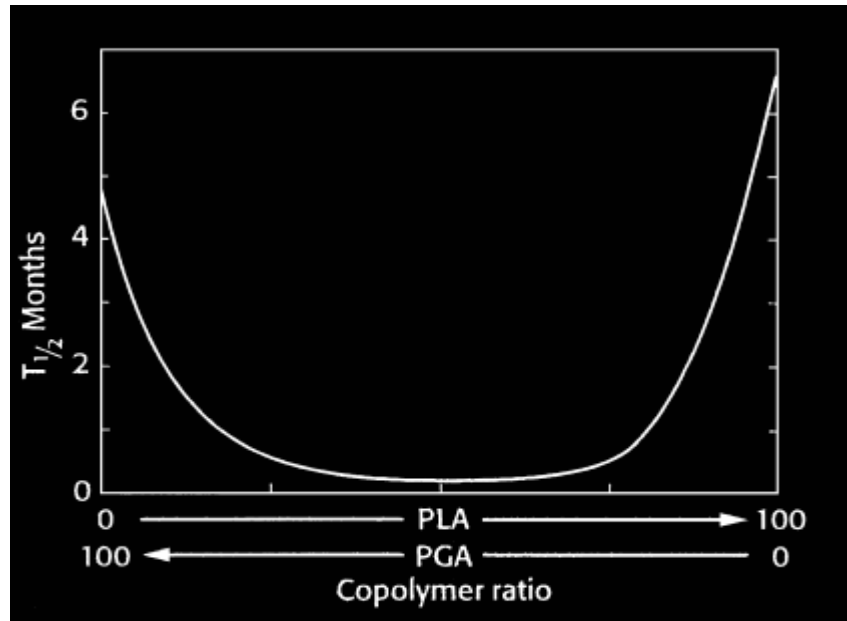


Figure 13. Demi-vie chez le rat des implants à base des homopolymères de PLA et PGA et de leurs copolymères de PLGA (Miller et al., 1977).

Les extrémités des chaînes polymériques peuvent également affecter l'hydrophilie des polymères et ce, quelle que soit leur composition de base (PLA, PGA ou PLGA). En effet, en modifiant ces terminaisons par des procédés chimiques comme l'estérification du groupement acide carboxylique, des polymères plus hydrophobes sont obtenus. Ces dérivés plus hydrophobes, sont dégradés moins vite, induisant une vitesse de libération moins importante des principes actifs qu'ils contiennent (Chhabra et al., 2007; Tracy et al., 1999).

En ce qui concerne la masse molaire des polymères utilisés pour la fabrication des systèmes à libération prolongée, il a été observé que plus la masse molaire augmentait, moins la vitesse de dégradation était importante (Jaraswekin et al., 2007; Zolnik and Burgess, 2008). Ce comportement est le résultat d'une différence dans les T_g et en conséquence des volumes libres entre les chaînes des polymères (Freiberg and Zhu, 2004). En effet, pour une température donnée, moins la T_g d'un polymère est importante, plus le volume libre entre ses chaînes est grand et plus le taux de pénétration d'eau dans le système et sa dégradation sont élevés. L'eau diminue la T_g des polymères

en raison de son rôle de plastifiant (Blasi et al., 2005) ce qui a pour conséquence d'augmenter leur vitesse de dégradation.

La vitesse de dégradation des polyesters augmente parallèlement avec une augmentation de la taille du système de libération. Ce comportement est le résultat d'un effet autocatalytique plus important dans les systèmes de plus grande taille. En effet, plus la taille du système est élevée, plus le temps nécessaire pour que les produits de dégradation acides quittent le système sera long et plus ils auront du temps pour exercer leur effet catalytique sur l'hydrolyse des groupements esters (Figure 14). En revanche, pour des systèmes de même taille, plus la porosité est élevée et moins la vitesse de dégradation est importante. En effet, lorsque la porosité du système augmente, les produits de dégradation acides quittent plus facilement le système réduisant ainsi leur effet catalytique sur la dégradation (Dunne et al., 2000; Grizzi et al., 1995; Klose et al., 2006; Klose et al., 2008; Siepmann et al., 2005; Vert, 2005)

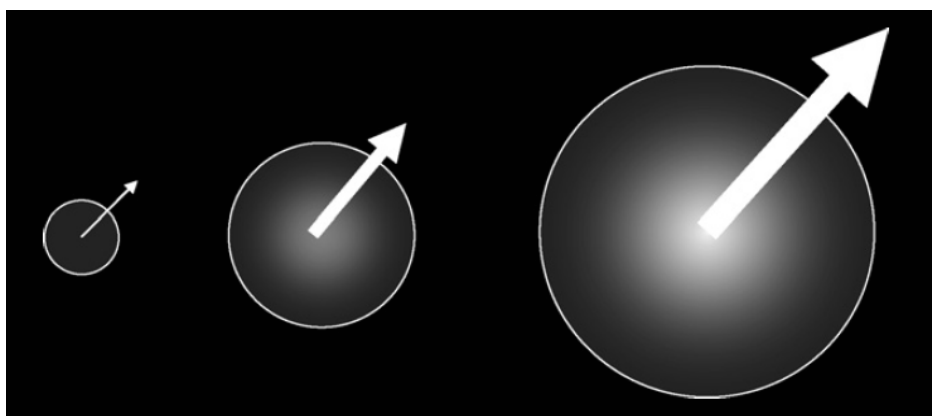


Figure 14. Importance de la taille sur l'effet « autocatalytique » lors de la dégradation de microparticules à base des polyesters d'acide lactique et/ou glycolique. Les régions sombres au centre des cercles représentent le micro-pH acide à l'intérieur du système (région claire: pH neutre ; région foncée: pH faible) (Klose et al., 2008).

En ce qui concerne l'effet de la nature du milieu dans lequel la dégradation a lieu, il a été observé que, de façon générale, la vitesse de dégradation des systèmes à base de polyesters est plus

importante *in vivo* qu'*in vitro*, ce qui entraîne également une libération plus rapide du principe actif (Tracy et al., 1999; Zolnik and Burgess, 2008).

2.3.2.3 Mécanisme de libération des principes actifs à partir des polymères d'acide lactique et/ou glycolique

La libération des principes actifs à partir des systèmes polymériques biodégradables à base de polyesters, destinés à la voie parentérale, se fait par deux phénomènes principaux; i) la diffusion des principes actifs dans les matrices plus ou moins dégradées et ii) la dégradation des polymères (Arifin et al., 2006). La dégradation joue un rôle fondamental dans la libération prolongée des principes actifs à partir de ces systèmes. De ce fait, l'érosion n'est pas le seul processus qui contribue au contrôle de la libération du principe actif. En effet, une fois que l'eau a pénétré à l'intérieur du système de libération, la solubilisation du principe actif ainsi que le clivage des groupements esters va avoir lieu. En même temps, le principe actif va diffuser vers l'extérieur du système selon un gradient de concentration. La diffusion du principe actif peut avoir lieu par plusieurs mécanismes tels que i) la diffusion à travers de la matrice polymérique, ii) la diffusion à travers des pores remplis d'eau, iii) ou encore la diffusion à travers le réseau macromoléculaire et les cavités remplies d'eau en parallèle et/ou en séquence. Contrairement aux systèmes contrôlés seulement par diffusion, dans ces systèmes le processus de diffusion au cours du temps peut être compensé par une perméabilité/porosité plus importante du système en cours d'érosion. Ceci peut être mis en évidence soit par une libération constante du principe actif ou par une augmentation de la libération de ce dernier (Faisant et al., 2002).

Plusieurs modèles mathématiques ont été développés afin d'expliquer la libération des principes actifs à partir des systèmes contrôlés par érosion. Ils peuvent être classés en deux catégories : i) les modèles empiriques qui font l'hypothèse d'une cinétique d'ordre zéro pour tout le processus de libération du principe actif et ii) les modèles qui prennent en compte les phénomènes physico-

chimiques tels que le processus de transfert de masse par diffusion et /ou par réactions chimiques. Le processus de transfert de masse par diffusion est souvent décrit par la deuxième loi de diffusion de Fick (Faisant et al., 2002).

D'autres facteurs environnementaux ou intrinsèques au système de délivrance peuvent aussi modifier la libération du principe actif *in vivo* par voie parentérale. On peut par exemple citer a) les barrières physiologiques naturelles s'opposant à la diffusion du principe actif telles que la viscosité liée aux fluides biologiques ou au tissu conjonctif b) le partage du principe actif au niveau du site d'application, comme par exemple dans le tissu adipeux c) le volume des fluides présents au site d'injection ou encore d) les mouvements musculaires dans le cas de la voie intramusculaire. Les facteurs dépendants du système de libération peuvent être 1) la dégradation enzymatique pour les polymères qui y sont sensibles 2) l'adsorption des protéines et 3) la phagocytose et / ou la possibilité d'une réaction inflammatoire induite par le système de libération (Zolnik and Burgess, 2008).

2.3.3 Systèmes implantables biodégradables

Les systèmes implantables peuvent être classés selon qu'ils sont élaborés industriellement pour être administrés chez le patient (systèmes préformés) ou qu'ils sont formés *in situ* lors de leur administration (systèmes *in situ*). Dans les deux cas, ce sont les mêmes types de systèmes de délivrance à savoir, les implants monolithiques et les microparticules (systèmes multiparticulaires).

2.3.3.1 Systèmes préformés

Les systèmes préformés ont été les premiers à être développés dans le cadre de l'usage des polyesters biodégradables pour l'élaboration de systèmes à libération prolongée destinés à la voie parentérale.

2.3.3.1.1 Implants monolithiques

Les implants monolithiques sont des systèmes de délivrance de médicaments, solides, pour l'application soit intramusculaire, soit sous-cutanée. Ces systèmes sont administrés par procédures chirurgicales ou via des dispositifs biomédicaux appropriés tels que des pistolets ou des aiguilles de gros calibre (trocart) (Jain, 2000; Shively et al., 1995; Szymanski, 1971) (Figure 15).

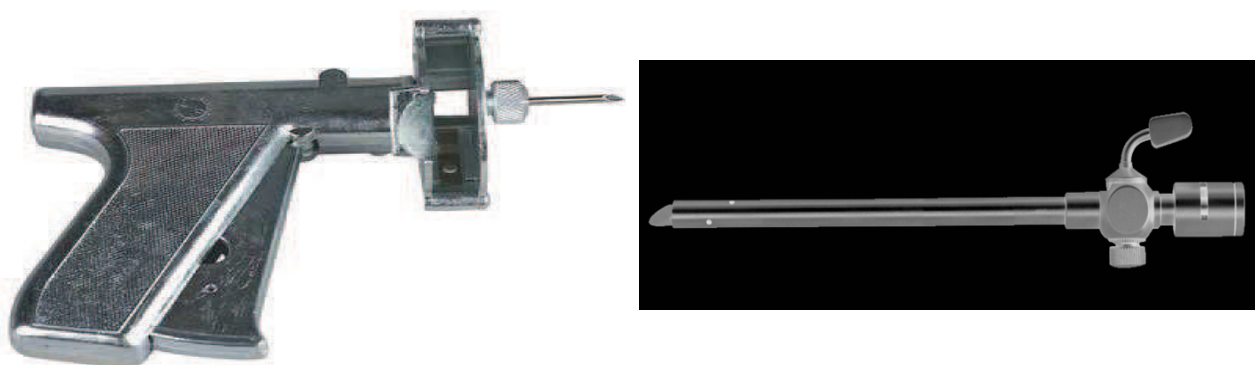


Figure 15. Dispositifs pour l'administration d'implants. Pistolet Ralgro® Gun (Intervet Schering-Plough) (gauche) et trocart KangYou® (Hangzhou Kangyou Medical Equipment Co., Ltd.).

Ainsi, même s'ils ne sont pas retirés à la fin du traitement, la douleur et la gêne ressentie par les patients lors de l'administration de ces systèmes représentent sans doute leurs principaux désavantages (Jain, 2000; Shah et al., 1993). Pour la fabrication des implants biodégradables, le principe actif est mélangé avec le diluant (polymère) et éventuellement avec les autres adjuvants de formulation, pour être ensuite soumis à des procédés tels que l'extrusion par fusion (« melt extrusion ») (Bhardwaj and Blanchard, 1997; Zhang et al., 1994), le moulage par injection (« injection molding ») (Lim et al., 2008; Sundback et al., 2003), la compression directe (Bodmeier and Chen, 1989b), la formation de films suite à l'évaporation du solvant des solutions de polymère (Mauduit et al., 1993) ou encore le filage de fibres (« fiber spinning ») (Eenink et al., 1987; Lim et al., 2008; Schakenraad et al., 1988; Van de Witte et al., 1993). Ainsi, des implants de toutes tailles

et formes tels que des extrudés cylindriques, des comprimés, des films, des fibres pleines ou perforées, peuvent être obtenus à partir de ces polymères (Brannon-Peppas and Vert, 2000).

Dans le domaine vétérinaire, ces systèmes représentent une alternative importante aux implants « non biodégradables » (Winzenburg et al., 2004). Cependant, la plupart des implants sur le marché des produits pour la santé animale sont encore réalisés à base de matériaux non biodégradables avec les désavantages que leur utilisation entraîne. Parmi eux, les implants pour le contrôle du cycle ovarien ou pour le traitement des ectoparasites sont les plus répandus. Des implants cylindriques tels que Compusode™ (17β-estradiol), Syncro MateB™ (norgestomet), Ralgro™ (zeranol) et Synovex™ (testostérone + estradiol) sont parmi les plus cités dans la littérature (Matschke et al., 2002). En revanche, des implants biodégradables tels que Profact® Depot et Zoladex® (Table 1) sont plus fréquemment utilisés dans le secteur pharmaceutique dédié à la santé humaine.

2.3.3.1.2 Microparticules

C'est dans le cas des systèmes multiparticulaires pour la formulation de médicaments à libération prolongée, à base des polyesters de l'acide lactique et glycolique, que le plus de travaux ont été réalisés (Brannon-Peppas and Vert, 2000) (Tableau 1). Le terme « microparticules » est utilisé dans le contexte galénique pour décrire des systèmes particuliers sphériques, de diamètre entre 1 et 1000 µm, utilisés pour transporter des principes actifs. Cependant, d'un point de vue pratique, des tailles entre 1 et 250 µm sont recommandées pour l'administration sous-cutanée et intramusculaire (Couvreur and Puisieux, 1993; Matschke et al., 2002). En fonction de leur architecture, les microparticules peuvent être, soit des microsphères, soit des microcapsules. Les premières sont des structures polymériques pleines alors que les deuxièmes consistent en un cœur de nature différente de la paroi polymérique qui l'entoure. Dans les deux systèmes, le principe actif peut se trouver aussi bien à l'état dispersé qu'à l'état dissous.

Une large variété de principes actifs, sans tenir compte de leur masse moléculaire, solubilité ou activité thérapeutique, a été incorporée dans des microparticules à base de PLA et /ou de PLGA. A titre d'exemple on peut citer l'encapsulation d'oligonucléotides (De Rosa et al., 2002; Freytag et al., 2000), de peptides (Okada, 1997; Woo et al., 2001), de protéines (Jiang et al., 2002), glycosaminoglycanes (Javot et al., 2009), ou encore de petites molécules, soit hydrophobes (Bodmeier and Chen, 1989a), soit hydrophiles (Hombreiro Pérez et al., 2000).

En effet, les microparticules représentent une alternative importante aux problèmes associés à l'administration des implants par des procédures chirurgicales (Jain, 2000). Grâce à leur faible taille, les microparticules peuvent être administrées avec des seringues équipées d'aiguilles conventionnelles (Park et al., 2005), après mise en suspension dans un diluant adéquat. Cependant, un des inconvénients lié à l'utilisation des microparticules est le fait qu'une fois administrées, elles ne peuvent plus être retirées du patient. D'autre part, les procédés de fabrication des microparticules sont souvent complexes et coûteux. Le suivi de multiples opérations pharmaceutiques tels que l'émulsification, la filtration ou la centrifugation, la lyophilisation et la stérilisation par radiations γ ou β font que leur préparation est réputée, à juste titre, difficile (Matschke et al., 2002). Enfin, ils utilisent souvent des solvants toxiques difficiles à éliminer et qui peuvent également affecter la stabilité des principes actifs (Shah et al., 1993).

Plusieurs méthodes pour la préparation de microparticules ont été développées, sachant que la plupart d'entre elle sont fondées sur des procédés d'extraction ou d'évaporation (Brannon-Peppas, 1995). Parmi elles, les méthodes d'émulsion (simple ou multiple) et évaporation/extraction du solvant, de séchage par dispersion (« spray drying ») et de séparation des phases (coacervation) sont les plus souvent utilisées (Brannon-Peppas and Vert, 2000; Freitas et al., 2005; Matschke et al., 2002; Park et al., 2005) (Figure 16) (Mundargi et al., 2008) et sont donc les techniques que nous

discuterons par la suite. Le choix de la méthode dépend des caractéristiques du polymère, du principe actif, du site d'action du principe actif et de la durée envisagée de l'action thérapeutique (Park et al., 2005). Néanmoins, il y a un certain nombre de pré-requis pour toutes ces méthodes, à savoir ; i) la stabilité chimique et l'activité thérapeutique du principe actif doivent être conservées tout au long du processus de fabrication, ii) le taux d'encapsulation ainsi que le rendement doivent être suffisamment élevés pour que la production soit possible, iii) le profil de libération du principe actif à partir des microparticules doit être reproductible et sans une forte libération initiale (« burst ») iv) le processus doit aboutir à des microparticules sous la forme d'une poudre d'écoulement libre et sans aggrégation ou adhésion, afin qu'elles puissent être facilement suspendues dans le véhicule avant leur administration, et v) la taille des microparticules doit permettre l'administration par la voie parentérale en utilisant un système d'aiguille et seringue conventionnelles.

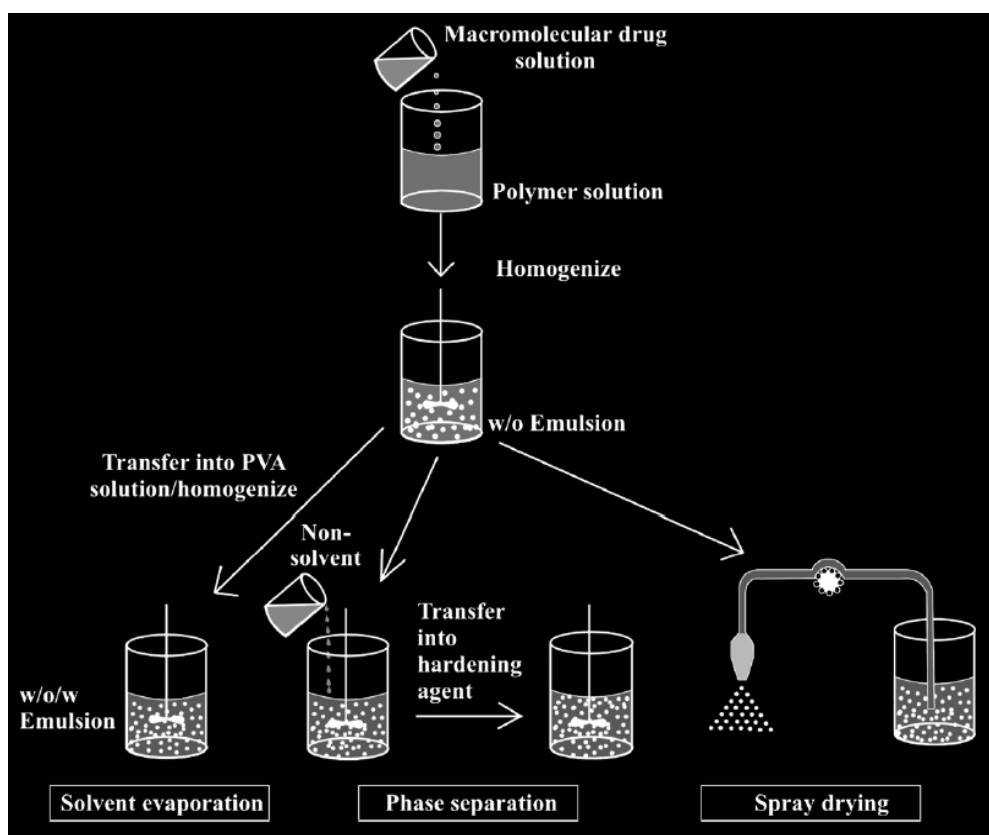


Figure 16. Méthodes les plus utilisées pour l'obtention de microparticules (Mundargi et al., 2008).

2.3.3.1.2.1 Obtention par émulsion et évaporation/extraction de solvant

La méthode d'évaporation de solvant a été largement utilisée pour l'obtention de microparticules à base de PLA ou de PLGA. En fonction des étapes suivies, cette méthode peut permettre l'encapsulation de principes actifs soit hydrophiles soit lipophiles (McGinity and O'Donnell, 1997). La méthode la plus facile à mettre en œuvre est celle dite de la simple émulsion (O/W) ; les autres méthodes dérivent de celle-ci et comprennent la méthode du co-solvant (co-solvant - O/W) et/ou la technique d'émulsion huile dans l'huile (O/O). Une autre méthode dite par émulsion double (eau dans l'huile dans l'eau, W/O/W) est aussi parmi les méthodes d'évaporation-extraction de solvant les plus utilisées.

2.3.3.1.2.1.1 Simple émulsion (O/W)

La préparation de microparticules par cette méthode comprend les cinq étapes fondamentales, décrites Figure 17: i) le polymère et le principe actif sont tout d'abord dissous dans un solvant organique volatil et insoluble dans l'eau, ii) une émulsification est réalisée par agitation de cette solution organique (phase interne) dans un large volume de phase externe aqueuse contenant un tensioactif approprié tel que l'alcool polyvinylique (PVA) pour l'obtention d'une émulsion huile dans l'eau (O/W), iii) l'élimination du solvant organique est effectuée par évaporation et/ou extraction. L'évaporation du solvant peut être réalisée par agitation mécanique de l'émulsion (O/W) avec ou sans l'application de vide et l'extraction par l'ajout de cette première émulsion à un volume important d'eau afin d'augmenter la diffusion du solvant organique vers le milieu extérieur. L'évaporation et / ou l'extraction du solvant induisent la mise en contact direct du polymère avec la phase aqueuse où il est insoluble, ce qui entraîne la précipitation du polymère qui à son tour englobe le principe actif conduisant ainsi à la formation de microparticules solides. iv) les microparticules sont recueillies par filtration ou par centrifugation et v) un séchage des

microparticules est alors effectué dans des conditions appropriées ou par lyophilisation (Freitas et al., 2005; Jain, 2000; McGinity and O'Donnell, 1997).

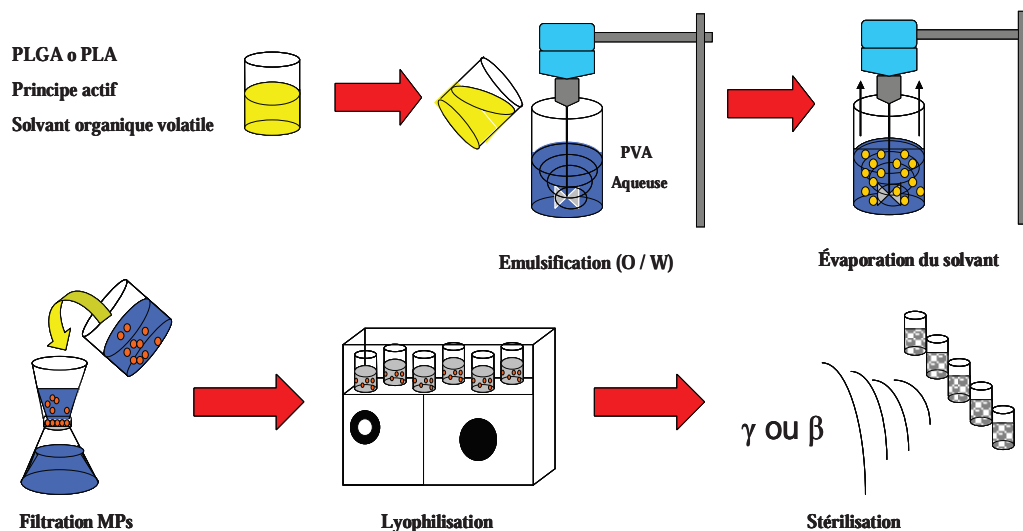


Figure 17. Principales étapes suivies lors de la préparation de microparticules biodégradables par la méthode d'émulsion (O / W) / évaporation de solvant.

La méthode d'évaporation de solvant est similaire à celle d'extraction de solvant puisque, dans le cas de la première méthode, le solvant doit tout d'abord diffuser vers la phase aqueuse externe avant d'être éliminé du système par évaporation. La vitesse d'élimination du solvant par extraction dépend du type de solvant, de la phase externe et de sa température, du rapport phase interne/phase externe et des propriétés physico-chimiques du polymère (Jain, 2000). Récemment, la description détaillée de la cinétique des processus d'extraction/évaporation du solvant lors de la formation de microparticules de PLGA a été publiée (Katou et al., 2008; Rosca et al., 2004). L'évaporation complète du solvant peut pendre entre 8 voire 10 h dans certain cas (Brannon-Peppas and Vert, 2000). L'augmentation de la vitesse d'évaporation du solvant, et donc de l'obtention des microparticles, peut être obtenue par l'évaporation du solvant sous vide et/ou l'augmentation de la température (Brannon-Peppas and Vert, 2000). Cependant, l'évaporation trop rapide du solvant peut

entraîner l'explosion des gouttelettes de solvant à l'intérieur des microparticules en formation, ce qui a pour effet l'obtention de microparticules poreuses. Puisque l'élimination du solvant par la méthode d'extraction est plus rapide que par évaporation, toutes conditions égales par ailleurs, les microparticules obtenues par extraction sont généralement plus poreuses (Jain, 2000).

Les principaux facteurs qui déterminent la taille et la distribution de tailles des particules ainsi que le taux d'encapsulation du principe actif sont ; i) la nature et la solubilité du principe actif à encapsuler ii) le type de solvant, iii) la concentration du polymère dans la phase organique, iv) le pourcentage et le type de tensioactif et v) la vitesse d'agitation. Cette méthode est plus appropriée pour l'incorporation de principes actifs qui sont solubles dans les solvants organiques où le polymère est soluble lui aussi (Bodmeier and McGinity, 1987; Brannon-Peppas and Vert, 2000; McGinity and O'Donnell, 1997). C'est pourquoi des principes actifs hydrophobes tels que chlorpromazine (Suzuki and Price, 1985), prednisolone (Smith and Hunneyball, 1986), hydrocortisone (Cavalier et al., 1986), cisplatine (Verrijk et al., 1992), 5- fluorouracile (Boisdron-Celle et al., 1995), lidocaïne (Lalla and Sapna, 1993) et progestérone (Cowsar et al., 1985) entre autres ont été encapsulés par cette méthode. Les solvants les plus utilisés dans la procédure de simple émulsion sont le dichlorométhane, l'acétone, l'acétonitrile, le méthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme ou encore le tétrachlorure de carbone (Brannon-Peppas and Vert, 2000). Cependant, la toxicité de ces solvants représente un des obstacles majeurs de cette méthode (EMEA, 1997). Les tensioactifs les plus couramment utilisés sont l'alcool polyvinylique, la méthylcellulose, la gélatine, la polyvinylpyrrolidone et le Tween[®] 20 à une concentration entre 0,1 et 1,0 % m/v (Brannon-Peppas and Vert, 2000).

L'influence de quelques facteurs sur les caractéristiques des microparticules de nifédipine, un inhibiteur de flux calcique, a été étudiée (Sansdrap and Moes, 1993). Ainsi, il a été observé que la

taille des microparticules diminuait de 28,5 à 12,9 μm pour une augmentation de la concentration du tensioactif (hydroxypropylméthylcellulose) de 0,4 à 2,4% (m/v), ce qui permettait une meilleure stabilisation de l'émulsion. De la même façon, la taille des microparticules s'est révélée plus faible lorsque la vitesse d'émulsification était plus grande. Ceci s'explique par le fait qu'en augmentant la vitesse d'agitation, les forces de cisaillement deviennent plus importantes, ce qui permet une plus grande dispersion et division de la phase organique. Une diminution de la taille des microparticules a été également obtenue lorsque le volume de la phase organique a été augmenté, ce qui diminue la viscosité du système. Le taux d'encapsulation du principe actif dans les microparticules est fortement dépendant des propriétés physico-chimiques du solvant utilisé (Bodmeier and McGinity, 1988) ; en particulier, leur non miscibilité dans l'eau est une caractéristique très importante. C'est pourquoi, des solvants de solubilité très élevée dans l'eau tels que le diméthyl sulfoxyde, l'acétone ou l'éthanol ne permettent pas l'obtention de microparticules mais conduisent à des agglomérats de polymère à cause de leur diffusion très rapide vers la phase externe. Cependant, pour des solvants de faible solubilité dans l'eau, plus la solubilité dans l'eau est élevée et plus la vitesse de précipitation du polymère est importante, conduisant ainsi à une augmentation de l'incorporation du principe actif dans les microparticules. En revanche, lorsque le solvant diffuse très lentement vers la phase externe aqueuse, les globules dispersés de phase organique restent liquides pendant beaucoup plus longtemps, ce qui entraîne une diffusion plus importante du principe actif vers le milieu extérieur et donc un plus faible taux d'incorporation (Bodmeier and McGinity, 1988).

La méthode d'émulsion simple (évaporation ou extraction de solvant) n'est cependant pas adéquate pour l'incorporation de principes actifs hydrophiles principalement par les raisons suivantes : 1) le principe actif ne peut pas être dissous dans le solvant organique et 2) pendant le processus d'émulsification, le principe actif peut rapidement diffuser vers la phase externe aqueuse en raison de son caractère hydrophile ce qui entraîne une perte importante du principe actif et donc un très

faible taux d'incorporation dans les microparticules. Pour surmonter ce problème, plusieurs variations de la méthode d'émulsion simple (O/W) ont été développées (Li et al., 2008) telles que i) l'addition de solvants hydrosolubles aux solutions polymériques des solvants très peu solubles dans l'eau, afin de pouvoir dissoudre les principes actifs hydrophiles dans la phase organique, ce qui entraîne une augmentation de leur taux d'incorporation dans les microparticules (Méthode du co-solvant - O/W) (Luan et al., 2006; Woo et al., 2001)

2.3.3.1.2.1.2 Double émulsion (W/O/W)

Dans cette méthode, tout d'abord une solution aqueuse du principe actif (parfois contenant un agent de viscosité) est tout d'abord émulsifiée sous forte agitation avec une solution du polymère dans un solvant organique non-miscible à l'eau tel que le chlorure de méthylène. De ce fait, une première émulsion W/O qui deviendra, à la fin du processus, le cœur central des microparticules est obtenue. Ensuite, cette première émulsion est dispersée sous agitation dans un large volume d'une phase aqueuse externe contenant un tensioactif hydrophile tel que le PVA pour obtenir une émulsion multiple W/O/W (eau-dans-huile-dans-eau). En effet, la phase organique qui sépare la phase aqueuse interne de l'externe, agit comme une barrière qui empêche la fuite du principe actif vers le milieu extérieur, ce qui contribue à l'encapsulation du principe actif. Les étapes suivantes du processus sont les mêmes que pour la méthode d'émulsion simple. Ainsi, l'élimination du solvant étant réalisée par évaporation et/ ou extraction, les microparticules sont recueillies par filtration ou centrifugation. Finalement, elles sont soumises au séchage jusqu'à l'obtention d'une poudre de libre écoulement. Cette méthode est très utile pour l'encapsulation de principes actifs très hydrophiles tels que protéines (Conway and Oya Alpar, 1996), peptides (Herrmann and Bodmeier, 1995; Okada, 1997), vaccins (Alonso et al., 1994) et petites molécules (Erden and Celebi, 1996; Hombreiro Pérez et al., 2000). Le produit pharmaceutique peut-être le plus célèbre, préparé par cette méthode est l'Enantone[®] Depot (Okada, 1997; Okada et al., 1987) (Tableau 1). Ce produit contient comme

principe actif l'acétate de leuprolide, un analogue de l'hormone de libération de la lutéinostimuline (LH-RH) pour le traitement prolongé de l'endométriose et/ou du cancer de la prostate. En effet, en fonction du polymère employé pour la fabrication des microparticules, PLGA ou PLA, la libération du principe actif peut être respectivement prolongée de 1 à 3 mois.

2.3.3.1.2.2 Obtention par séparation de phases (coacervation)

Le terme coacervation a été utilisé pour la première fois par Bungenburg de Jong and Kruyt pour décrire le phénomène de séparation des phases dans les systèmes colloïdaux (Süheyla Kas and Öner, 2000). Ce processus consiste à diminuer la solubilité d'un polymère en solution, par l'ajout d'un troisième composant. Le matériau issu de la séparation initiale du polymère juste avant sa précipitation est appelé le coacervat. La déposition du coacervat autour du principe actif dispersé ou solubilisé dans le liquide en équilibre conduit à des capsules embryonnaires. Enfin, la propagation et la poursuite de la coalescence des particules du coacervat forment des microcapsules (Nihant et al., 1995). La partie intérieure de la microcapsule contenant le principe actif est appelée « le cœur » et le matériel polymérique constituant la partie extérieure est appelé « paroi ». Le cœur des microcapsules peut exister sous différentes configurations telles que liquide, solide, gaz, suspension, émulsion. Le phénomène de séparation des phases/coacervation peut être induit par différents facteurs tels que le changement de température, l'addition d'un non-solvant, l'addition de sels, l'addition d'un polymère incompatible ou encore par des interactions polymère - polymère. Les polymères PLA, PGA et PLGA ont été utilisés comme matériaux des parois pour la préparation de microcapsules. Dans ce cas, c'est l'ajout d'un non-solvant du polymère sur leurs solutions organiques qui induit leur séparation (Süheyla Kas and Öner, 2000). Ainsi, des principes actifs très hydrophiles tels que peptides (Blanco-Prieto et al., 2004), protéines (Nihant et al., 1995) et vaccins (Johansen et al., 2000) mais aussi hydrophobes tels que les stéroïdes (Leelarasamee et al., 1986; Leelarasamee et al., 1988) peuvent être incorporés dans des capsules à base des ces polymères en

utilisant cette méthode de séparation. En effet, une fois le polymère dissous dans un solvant organique, le principe actif peut être rajouté soit sous la forme d'une solution aqueuse afin de former une émulsion W/O (molécules hydrophiles) soit dispersé ou dissous dans la même solution du polymère (molécules hydrophobes). Lorsque le non-solvant est ajouté, sous agitation faible, à ce système polymère-principe actif-solvant, il extrait au fur et à mesure le solvant induisant la coacervation du polymère ce qui entraîne l'encapsulation du principe actif. Ce système est alors transféré dans un large volume d'un autre non-solvant organique afin de durcir les microcapsules. Ces dernières sont ensuite recueillies par filtration ou centrifugation, lavées et séchées (Jain, 2000). Parmi les solvants des polymères, utilisés par cette méthode, on peut citer le chlorure de méthylène, l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle. Parmi les huiles utilisées initialement comme non- solvant, il y a l'huile de silicone, les huiles végétales, la paraffine liquide, le polybutadiène de faible masse moléculaire et les polymères méthacryliques liquides. Comme deuxièmes non-solvants on peut citer l'hexane, l'heptane et l'éther de pétrole.

Plusieurs facteurs tels que la vitesse d'addition du non-solvant, la concentration et la masse molaire du polymère, la vitesse de dispersion de la phase aqueuse, le rapport phase aqueuse/phase organique, la nature du non-solvant, la température de coacervation et le comportement rhéologique du système déterminent les caractéristiques des microcapsules obtenues (Nihant et al., 1995; Thomasin et al., 1998)

2.3.3.1.2.3 Obtention par séchage par dispersion (« spray drying »)

Le séchage par dispersion peut être défini comme le processus de transformation d'un matériel sous la forme d'un liquide à un autre sous l'état particulaire et sec (Rattes and Oliveira, 2007). Ce processus est réalisé par atomisation, le plus souvent à l'aide d'air comprimé, d'une solution du polymère contenant le principe actif (dissous ou suspendu), dans une chambre remplie en air sec et chaud. Une fois dispersé sous forme de gouttelettes, le liquide pénètre dans la chambre alimentée en

air chaud et l'évaporation immédiate du solvant induit la précipitation du polymère qui à son tour incorpore le principe actif. L'architecture des microparticules obtenues par cette méthode dépend fondamentalement de l'état initial du principe actif dans le liquide à nébuliser. Si le principe actif se trouve dissous ou dispersé dans la solution du polymère, des microsphères sont obtenues (Kissel et al., 2006). En revanche, des microcapsules sont obtenues quand le liquide nébulisé consiste en une émulsion principe actif/polymère. Le processus d'obtention de microparticules par cette méthode peut être résumé en 4 étapes ; a) atomisation du liquide, b) mélange du nébulisât avec l'air chaud, c) évaporation du solvant et d) séparation du produit. (Kissel et al., 2006).

Malgré les très hautes températures utilisées, le séchage par atomisation a été utilisé pour l'obtention de microparticules contenant des substances sensibles telles que des peptides (Blanco-Prieto et al., 2004; Witschi and Doelker, 1998), des vaccins (Johansen et al., 2000), des vitamines, des parfums, et des huiles essentielles (Kissel et al., 2006) en raison de la haute vitesse d'évaporation des solvants (Rattes and Oliveira, 2007). Le premier principe actif à avoir été encapsulé par cette méthode en utilisant le PLA a été la bromocriptine. Ensuite, , un médicament destiné au traitement du cancer sous le nom Parlodel LAR TM (Sandoz Pharma), d'administration parentérale, a été développé à base de polyesters en étoile de poly(D,L-lactique-co-glycolique-D-glucose) permettant lors de son injection, la libération prolongée de la bromocriptine pendant un mois (Bodmer et al., 1992; Kissel et al., 1991). D'autres principes actifs tels que la progestérone, la théophylline (Bodmeier and Chen, 1988) et le captopril (Volland et al., 1994) ont été respectivement incorporés dans des microparticules à base de PLA et PLGA en utilisant cette méthode.

Bien que le séchage par dispersion soit une méthode rapide, relativement simple à mettre en œuvre au niveau industriel, et « universelle » dans le sens où des principes actifs lipophiles autant que

hydrophiles peuvent être encapsulés (Bodmeier and Chen, 1988), certains inconvénients tels que les pertes de produit à cause d'une adhésion aux parois de l'appareillage et de son agglomération doivent être pris en compte (Broadhead et al., 1992). Parmi les paramètres et facteurs qui déterminent la qualité du produit, on peut citer le type de solvant, la température d'entrée et de sortie de l'air de séchage et la viscosité de la solution à nébuliser (Ré, 1998).

2.3.3.2 *Systèmes in situ*

Les méthodes traditionnelles pour la préparation des implants et des microparticules à libération prolongée à base des polyesters de l'acide lactique et / ou glycolique, possèdent un certain nombre d'inconvénients qui rendent difficile leur fabrication et/ou leur utilisation (sections 1.4.2.1.1 et 1.4.2.1.2.). Afin de surmonter quelques-uns de ces problèmes, de nouvelles méthodes pour l'obtention de systèmes se formant spontanément au site d'application (*in situ*) ont été développées (Dunn et al., 1990). Ces systèmes sont également appelés dans la littérature « dépôts de formation *in-situ* » et leur administration peut être réalisée par la voie intramusculaire ou sous-cutanée (Matschke et al., 2002). En fonction des mécanismes participant à la formation des dépôts, ils peuvent être classés ainsi (Figure 18); i) pâtes thermoplastiques, ii) systèmes polymériques de réticulation *in situ*, iii) systèmes de gélification induite par la température, iv) cubosomes *in situ* et v) systèmes *in situ* par précipitation du polymère. Jusqu'à présent, la plupart de ces systèmes ont été utilisés pour la formation d'implants monolithiques (ISI).

2.3.3.2.1 Implants *in situ* (ISI)

2.3.3.2.1.1 *Pâtes thermoplastiques*

Les pâtes thermoplastiques sont des dépôts semi-solides obtenus suite au refroidissement induit par la température corporelle, d'un système polymérique injecté à l'état fondu (Dunn and Tipton, 1997; Packhaeuser et al., 2004). Ces systèmes sont caractérisés par un point de fusion faible, généralement

entre 25-65°C et des viscosités intrinsèques entre 0,05 et 0,8 dL/g. Ici, le principe actif est incorporé dans le polymère fondu par simple agitation sans l'ajout d'un solvant. Leur facilité à être injectés à l'état fondu peut s'expliquer par la faible masse molaire et la faible T_g des polymères utilisés pour leur préparation. Cependant quelques inconvénients liés à l'utilisation de ces systèmes, (notamment lorsque la température d'application dépasse les 60°C), sont la douleur intense, la probabilité de nécrose et de cicatrices suite à leur injection. C'est pourquoi, des polymères de faible masse molaire sont plus recommandés (Hatefi and Amsden, 2002). Une formulation sous cette forme d'implant en utilisant le polymère thermoplastique triblock de poly(D,L-lactique)-block-poly(éthylène glycol)-block-poly(D,L-lactique) a été ainsi développée pour la libération prolongée de Taxol™ après administration intra-tumorale (Zhang et al., 1996).

2.3.3.2.1.2 Systèmes polymériques de réticulation *in situ*

La réticulation *in situ* des polymères peut donner lieu soit à des systèmes polymériques soit à des gels. Plusieurs facteurs tels que ; i) la chaleur (thermosets), ii) l'absorption de photons et iii) les interactions ioniques entre cations et polymères anioniques, peuvent induire la réticulation des polymères.

2.3.3.2.1.2.1 Thermosets

Les polymères appelés « thermosets » peuvent s'écouler et être moulés tout suite après fabrication; cependant, une fois chauffés, ils conservent leur forme finale (Dunn et al., 1994; Dunn et al., 1997). Ce durcissement (« curing ») est dû à la formation de réticulations covalentes entre les chaînes du polymère entraînant la formation d'un réseau macromoléculaire. Cet état n'est pas réversible et le réchauffage ultérieur du polymère, n'induit que sa dégradation. Le durcissement est normalement initié chimiquement par le chauffage. Cependant, cette méthode présente certaines limites et des effets indésirables qui la rendent difficile à mettre en œuvre. En particulier, les conditions de réaction pour les applications *in vivo* sont assez strictes : un étroit intervalle de températures

physiologiques dans laquelle elle est acceptable, les spécifications de toxicité des monomères et / ou des solvants, un environnement riche en humidité et oxygène, le besoin d'une injection rapide, et des vitesses de réticulation appropriées conditionnent par exemple la réticulation (Hatefi and Amsden, 2002). Des copolymères d'acide DL-lactique ou L-lactique avec ϵ -caprolactone ont été utilisés pour la préparation d'un « thermoset » comme implant prostatique pour la libération prolongée des principes actifs. Ce système est liquide en dehors du corps et peut être facilement injecté (système d'aiguille et seringue). Une fois à l'intérieur du corps, il durcit (Dunn et al., 1994).

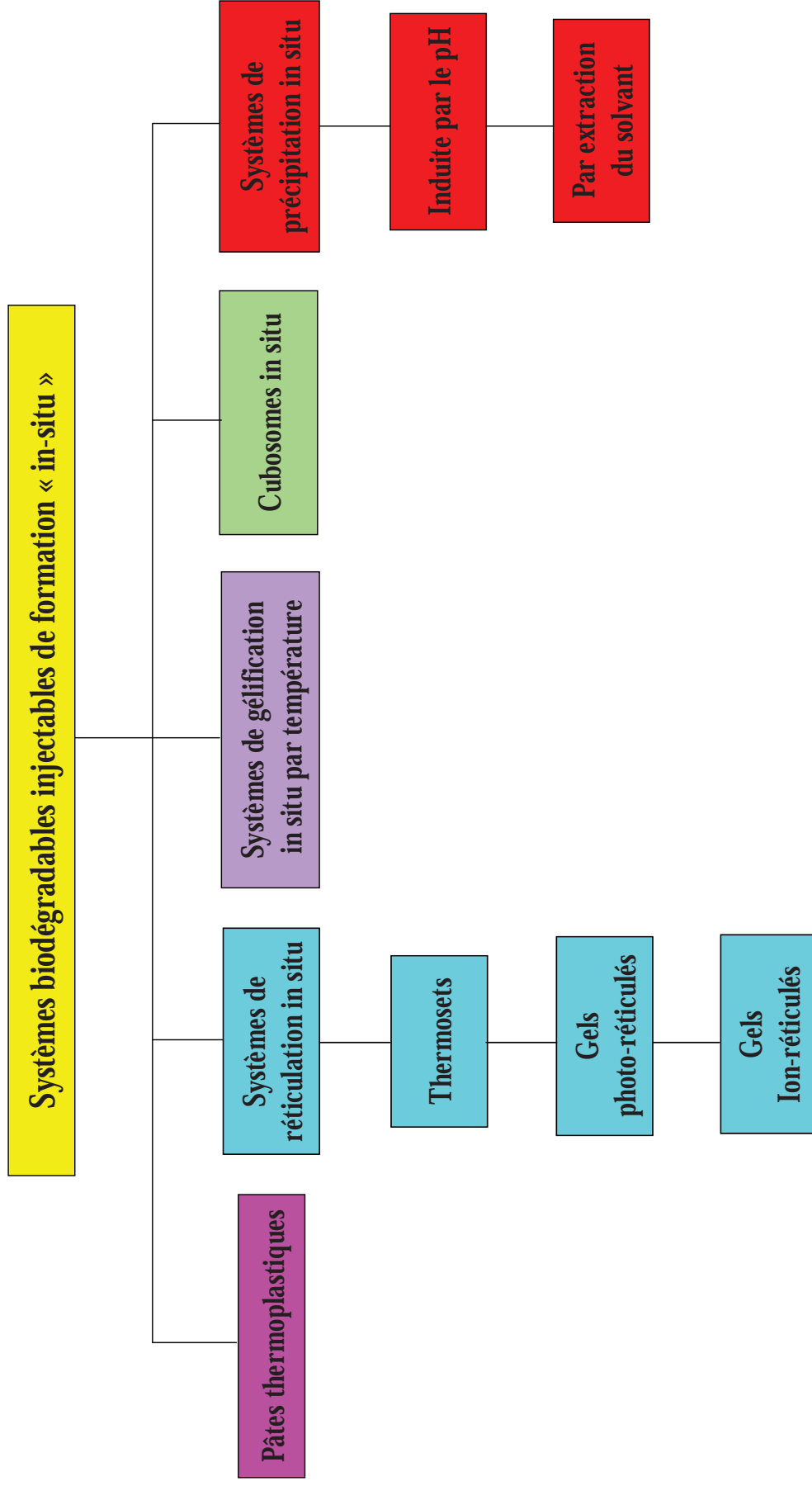


Figure 18. Classification des dépôts *in situ* en fonction des mécanismes participant dans leur formation.

2.3.3.2.1.2.2 Gels ion – réticulés

La réticulation des solutions polymériques pour former des gels, peut aussi être induite par des ions de charge opposée à celle du polymère. Ce type de réticulation a été décrite spécialement pour des polymères tels que les alginates/(Ca⁺⁺) et les chitosans/(PO₄⁼) (Berger et al., 2004; Packhaeuser et al., 2004), lesquels sont biocompatibles mais non-biodégradables. Cependant, les concentrations physiologiques de ces contre ions *in vivo* (IM ou SC), ne sont pas suffisamment importantes pour permettre la réticulation de ces systèmes dans les conditions *in situ* (Packhaeuser et al., 2004), excepté dans l'œil où la concentration de calcium atteint environ 0,008% (Hatefi and Amsden, 2002).

2.3.3.2.1.3 Systèmes de gélification *in situ* par température

Certains polymères subissent des transitions sol/gel à la suite de modifications de la température environnementale. Cette propriété a permis l'utilisation de ces polymères pour la préparation de systèmes *in situ*. Comme les solutions aqueuses de ces polymères possèdent une faible viscosité, elles peuvent, à l'image des formes pharmaceutiques liquides conventionnelles, être facilement manipulées au niveau industriel pour les opérations de mélange, stérilisation et remplissage. Cependant, lorsque ces solutions sont injectées dans le corps, elles subissent une transition sol-gel due au changement de température (Ruel-Gariépy and Leroux, 2004). Ainsi, les principes actifs dissous initialement dans la solution du polymère, sont retenus dans la nouvelle structure, d'où ils seront libérés selon plusieurs mécanismes physico-chimiques tels que la diffusion, la solubilisation et la dégradation du polymère (Ghahremankhani et al., 2007). Il existe différents polymères qui subissent ce type de transition sol-gel, intéressants pour la formulation des systèmes *in situ*. Parmi eux, les copolymères tri-bloc de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) et poly(oxyde de propylène) (PPO), PEO-PPO-PEO (Pluronic[®] ou Poloxamers[®]) sont très utilisés et leurs propriétés de gélification on

été bien étudiées (Linse and Malmsten, 1992). Etant le moins toxique des Pluronic[®], le Pluronic[®] F127 a été largement utilisé dans des études de libération de principes actifs. Cependant, les copolymères de PEG (polyéthylène glycol)/PLGA sont encore plus intéressants en raison de leur biocompatibilité et biodégradabilité. Ainsi, des copolymères tri-bloc de PLGA-PEG-PLGA ont été utilisés pour la fabrication d'implants parentéraux par gélification thermique *in situ* pour délivrer de façon prolongée de la calcitonine (Ghahremankhani et al., 2007).

2.3.3.2.1.4 Cubosomes *in situ*

Les « cubosomes » ou « organogels » sont des phases cristallines liquides, formées par l'assemblage spontané, de lipides amphiphiles polaires insolubles dans l'eau. En effet, lorsque ces composés sont mis en contact avec l'eau, leur gonflement induit la formation d'une phase cristalline cubique tridimensionnelle en bicouche et séparée par des canaux aqueux (Figure 19) (Shah et al., 2001). Les caractéristiques de cette structure dépendent des propriétés structurales des lipides, de la température, de la nature du principe actif incorporé et de la teneur en eau dans le système (Engstrom and Engstrom, 1992). Ces systèmes sont gélatineux et très visqueux, d'où leur utilisation dans la formation de dépôts *in situ* afin d'obtenir la libération prolongée des principes actifs hydrophiles ainsi que lipophiles (Shah et al., 2001). Parmi les lipides amphiphiles les plus utilisés jusqu'à présent dans la préparation des cubosomes, on peut citer les esters de glycérol des acides gras tels que le monooléate de glycérol, le monopalmitostéarate de glycérol et le monolinoléate de glycérol (Hatefi and Amsden, 2002). L'utilisation de ces composés est intéressante car ils sont considérés comme non toxiques, biocompatibles et biodégradables par les lipases endogènes de l'organisme.

Plusieurs types de principes actifs hydrophiles tels que des oligonucléotides (Ahmed et al., 2010) et des peptides (Lee and Kellaway, 2000), de principes actifs amphiphiles comme le maléate de chlorpheniramine (Chang and Bodmeier, 1997) et de principes actifs lipophiles tels que le

lévonorgestrel et l'éthinyl estradiol (Gao et al., 1995a; Gao et al., 1995b) ont été incorporés dans ces systèmes. La libération des principes actifs lipophiles à partir de ces systèmes dépend aussi de leur solubilité dans la phase cubique. Récemment, des formulations de monoglycérides de faible viscosité ont été développées en utilisant des co-solvants solubles dans l'eau tels que l'éthanol, le polyéthylène glycol 300, la 2-pyrrolidone et le DMSO, afin d'améliorer l'injectabilité de ces systèmes (Ahmed et al., 2010).

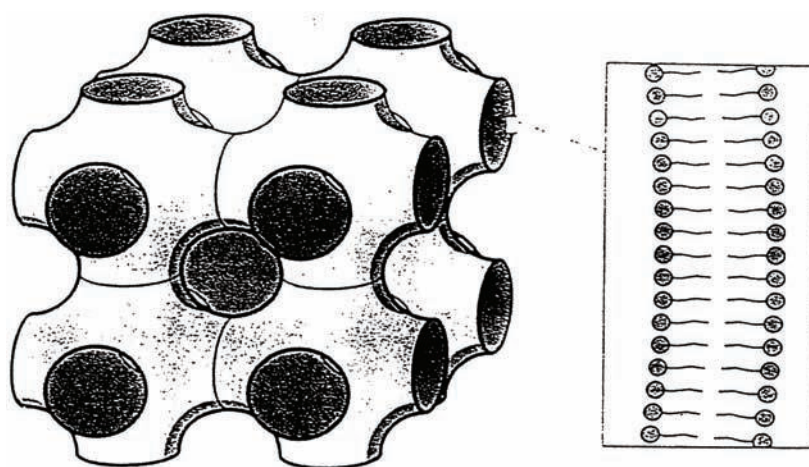


Figure 19. Structure cubique tridimensionnelle de la phase cristalline glycerilmonooleate – eau (Shah et al., 2001).

2.3.3.2.1.5 Systèmes *in situ* par précipitation

D'autres méthodes pour l'obtention de dépôts *in situ* sont fondées sur les phénomènes de précipitation. Ce phénomène peut être induit par différents facteurs tels que ; i) un changement du pH ou ii) l'extraction du solvant dans lequel le polymère ou la substance constituant la matrice sont dissous.

2.3.3.2.1.5.1 Systèmes par précipitation pH dépendante

L'obtention d'un gel suite à la précipitation d'un polymère par un changement de pH, constitue une autre méthode pour l'obtention de dépôts *in situ*. Ce phénomène a lieu notamment lorsque le

polymère possède des groupements acides ou basiques faibles. Ainsi, si le polymère possède des groupements acides faibles, il sera plus hydraté pour des valeurs de pH basiques où sa charge négative prédomine. En revanche, pour des valeurs de pH faibles, le groupement acide ne sera plus ionisé et la solubilité du polymère diminuera entraînant sa précipitation. Cependant, la plupart des travaux utilisant cette méthode, ont été réalisés avec des polymères biocompatibles mais non biodégradables tels que le chitosane et les méthacrylates (Siegel and Firestone, 1988) et qui ne sont pas autorisés pour la voie parentérale, ni par la FDA, ni par l'EMA.

2.3.3.2.1.5.2 Systèmes par précipitation-extraction dépendante

En fonction de la nature de la matrice responsable de la libération prolongée du principe actif, ces systèmes peuvent être classés comme des systèmes non-polymériques ou polymériques.

2.3.3.2.1.5.2.1 Systèmes non polymériques

Le système non-polymérique se formant *in situ* par précipitation décrit dans la littérature, utilise l'acétate isobutyrate de saccharose (SAIB), un composé biodégradable et insoluble dans l'eau (Tipton and Richard, 1998). La lipophilicité de SAIB (Figure 20) est due à l'estérification de tous les groupements -OH saccharose, un disaccharide très soluble dans l'eau.

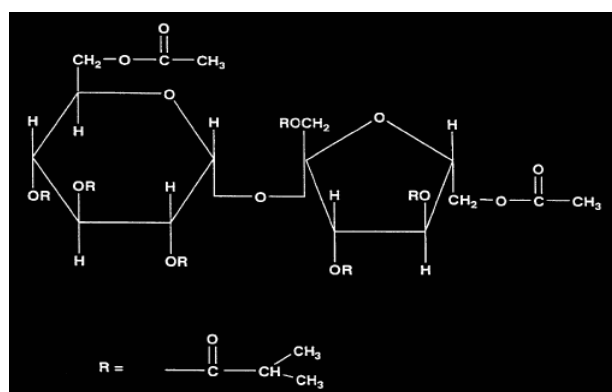


Figure 20. Structure chimique de l'acétate isobutyrate de Saccharose (SAIB) (Okumu et al., 2002).

Ce composé non cristallin et hautement visqueux, est couramment utilisé comme agent émulsifiant, stabilisant ou directement en tant qu'additif dans l'industrie alimentaire humaine (Matschke et al., 2002). La plateforme brevetée utilisant cette technologie est appelée **SABER™ Delivery System** (Durect Corporation, USA). Dans ce système, le SAIB est dissous dans un solvant organique soluble dans l'eau tel que le DMSO, l'éthanol, la NMP, la 2-pyrrolidone ou le benzoate de benzyle dans lequel le principe actif est également dissous ou suspendu. L'un des avantages de ce système est la faible viscosité des solutions de SAIB les rendant facilement injectables (Hatefi and Amsden, 2002). Lors de l'injection de ce système, le solvant hydrosoluble diffuse vers le milieu environnant aqueux induisant la précipitation du SAIB et la formation d'un dépôt très visqueux contenant le principe actif. Une fois formé, le système permet la libération du principe actif de façon prolongée en fonction de certains paramètres tels que la solubilité du principe actif dans le solvant, sa concentration et sa solubilité dans la matrice SAIB. La libération du principe actif peut aussi être modulée par l'ajout d'un excipient tel que le PLGA, qui modifie la diffusivité du principe actif dans le SAIB. Le système SABER™ a été utilisé pour l'administration de principes actifs tels que des protéines, des peptides et des petites molécules (Okumu et al., 2002). Des produits vétérinaires basés sur ce système sont actuellement développés par Thorn Bioscience LLC. Par exemple, ils ont utilisé le SAIB chez la jument et chez le porc pour la libération de desloréline, un puissant analogue de l'hormone de libération de la gonadotrophine (GnRH), afin d'induire et de contrôler le moment de l'ovulation, avant une insémination artificielle. Parmi les autres produits en développement dans le même domaine figure le SABER™ Mate B (Bovine) pour la libération contrôlée de l'acétate de desloréline dans le cadre du protocole de traitement Ovsynch® (GnRH/PGF_{2α}/GnRH) qui apporte une synchronisation du développement folliculaire, de la régression lutéale (progésterone) et de l'ovulation, permettant ainsi l'insémination dans les 12 à 24 h après la fin du protocole (Rathbone and Martinez, 2002). Cependant, le SAIB n'a pas encore été autorisé pour une utilisation parentérale (Hatefi and Amsden, 2002).

2.3.3.2.1.5.2.2 Systèmes polymériques

Le concept de formation d'implants polymériques par la méthode de précipitation du polymère *in situ* par extraction de solvant développé en 1990 (Dunn et al., 1990, 1998), a été utilisé dans le domaine humain et vétérinaire pour la formulation de certains produits pharmaceutiques (tableau 1). Dans cette méthode, un polymère biodégradable insoluble dans l'eau tels que l'acide poly(D,L-lactique) ou le poly(D,L-lactique-co-glycolique), est dissous dans un solvant organique biocompatible où le principe actif est aussi solubilisé ou suspendu. Lorsque cette formulation est injectée dans le corps (IM ou SC), le solvant organique diffuse vers le milieu physiologique aqueux, tandis que l'eau pénètre dans la solution polymérique. Ce phénomène conduit à une séparation de phases et à la précipitation du polymère aboutissant à la formation d'un implant *in situ* et à l'incorporation du principe actif au sein de la matrice formée. Puisque les implants injectables sont administrés à l'état liquide, il existe un temps de latence (« lag time ») entre le moment de l'injection et la formation de l'implant solide. Pendant ce temps, le solvant biocompatible diffuse emportant avec lui le principe actif ce qui entraîne une forte libération initiale du principe actif (« burst ») plus élevée que dans le cas des implants préformés (section 1.4.2.1) (Shively et al., 1995)

Cette technologie a été utilisée pour la libération prolongée de différentes molécules : des protéines (Brodbeck et al., 1999; Eliaz and Kost, 2000; Eliaz et al., 2000; Lambert and Peck, 1995), des antagonistes de la LHRH (Ravivarapu et al., 2000; Sartor, 2003), des anticancéreux (Havlicek et al., 2009), des antagonistes d'opiacés, des facteurs de croissance, des anti-inflammatoires (Shah et al., 1993; Shively et al., 1995), de l'ADN (Eliaz and Szoka Jr, 2002) et des antibiotiques (Steinberg and Friedman, 1999).

Toute une variété de solvants biocompatibles tels que la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP), le propylène glycol, l'acétone, le diméthylsulfoxyde (DMSO), la 2-pyrrolidone (2P), la triacétine (TA)

(Hatefi and Amsden, 2002), le benzoate de benzyle (BB), le glycofurol (Eliaz et al., 2000; Matschke et al., 2002), le benzoate d'éthyle (Brodbeck et al., 1999), le citrate de triéthyle, le PEG 400 (polyéthylène glycol), l'acétate d'éthyle (Dong et al., 2006), l'alcool benzylique et le carbonate de propylène (Rungseevijitprapa et al., 2008) ont été utilisés dans la formulation de ces systèmes. Pour être applicable à la voie parentérale, le solvant doit être non seulement biocompatible et non toxique (Matschke et al., 2002), mais aussi dans le cas des implants *in situ*, permettre une bonne solubilisation du polymère afin d'obtenir des solutions concentrées (>100 mg/mL) permettant un taux élevé d'incorporation du principe actif dans le dépôt et sa libération prolongée (Shively et al., 1995). En outre, le solvant doit permettre l'obtention de solutions polymériques de viscosité facilement injectables en utilisant une seringue conventionnelle (Rungseevijitprapa and Bodmeier, 2009). Enfin, le solvant ne doit pas compromettre la stabilité du polymère ni celle du principe actif (Dong et al., 2006; Ravivarapu et al., 2000).

En ce qui concerne la toxicité des solvants, les normes de l'EMA basées sur les directives ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) (Q3C Impuretés : solvants résiduels), reprennent les niveaux limites résiduels d'exposition autorisés chez l'Homme. Cette norme classe les solvants organiques par rapport à leur degré de toxicité dans 3 groupes, à savoir :

- la Classe 1 : comprend les solvants toxiques, qui doivent être évités car ils sont carcinogènes ou suspectés de l'être et qui sont dangereux pour l'environnement,
- la Classe 2 : comprend les solvants dont l'usage doit être limité bien que leur toxicité soit réversible
- et enfin, la Classe 3 : regroupe les solvants avec un faible potentiel de toxicité et dont l'exposition journalière autorisée (PDE : permitted daily exposure) est ≥ 50 mg / jour (EMA, 1998).

La NMP, le DMSO et le PEG 400 sont déjà utilisés dans des produits commerciaux destinés à la voie parentérale chez l'Homme (Strickley, 2004). Le NMP et le DMSO sont des solvants classés dans les groupes 2 et 3 mais avec des PDE très similaires, 48 et 50 mg/jour, respectivement. Leurs LD₅₀ IV chez le rat sont 2,4 g/kg (NMP) et 5,2 g/kg (DMSO). Dans une étude sur le macaque Rhésus (*Macaca mullata*), où ces deux solvants ont été utilisés à 60%, pour des formulations d'implants *in situ* à base du copolymère DL-lactique/ε-caprolactone administrées par les voies IM et SC, les résultats histologiques et de comportement ont montré une bonne tolérance des animaux à ces solvants (Royals et al., 1999). Une autre étude de myotoxicité des implants de PLA et PLGA (40%), formulés à base de NMP, DMSO ou 2-pyrrolidone, a montré l'ordre de toxicité suivant pour ces solvants : NMP>DMSO>2-pyrrolidone. En effet, la quantité de créatine kinase libérée, à partir du muscle squelettique de rat isolé, un indicateur de dommage tissulaire, a été la plus grande pour les formulations à base de NMP (Kranz et al., 2001). Une étude similaire utilisant des solvants moyennement solubles dans l'eau, a montré l'ordre suivant de myotoxicité: alcool benzylique>citrate de triéthyle>triacétine>carbonate de propylène>acétate d'éthyle (Rungseevijitprapa et al., 2008). Le glycérol formol et le propylène glycol sont utilisés dans la formulation d'un produit vétérinaire à base d'ivermectine (Ivomec[®] 1% ; SC). Dans le même domaine, la NMP est utilisée pour la formulation du Nuflor[®] Swine (IM) contenant l'antibiotique florfénicol. La 2-pyrrolidone (Soluphor[®] P ; BASF) fait partie des solvants fréquemment utilisés dans les formulations vétérinaires injectables à libération prolongée d'oxytétracycline (BASF, 1991). La triacétine et le citrate de triéthyle sont utilisés pour la fabrication de formes pharmaceutiques orales et sont généralement considérés comme sûrs (GRAS : Generally Recognized As Safe). La triacétine est considérée comme un nutriment parentéral potentiel et a été utilisée dans ce but chez le rat (Bailey et al., 1992) et chez le chien (Bleiberg et al., 1993). Le glycofurol a été utilisé comme solvant dans des produits injectables à une concentration pouvant

atteindre 50% v/v (Eliaz and Kost, 2000). De même, le benzoate de benzyle peut être utilisé pour la voie parentérale à des concentrations pouvant aller jusqu'à 46% (v/v) (Rowe et al., 2006). Enfin, l'acétate d'éthyle, solvant de Classe 3, peut également être utilisé pour la fabrication de ces implants (Dong et al., 2006).

En fonction de la solubilité dans l'eau du solvant biocompatible, la libération du principe actif à partir des implants peut être plus ou moins rapide. De ce fait, plusieurs types de systèmes ont été développés en utilisant la méthode de précipitation du polymère *in situ* par extraction du solvant. Le premier est le système ou **Technologie Atrigel™** (Atrix laboratories) développé à partir du brevet de Dunn et collaborateurs en 1990 (Dunn et al., 1990, 1998). Cette technologie utilise des solvants organiques de solubilité dans l'eau supérieure à 7 %. Jusqu'à présent, deux produits pharmaceutiques commercialisés utilisent la technologie Atrigel™. Le plus connu est Eligard™ (Atrix laboratories, Fort Collins, USA), contenant l'acétate de leuprolide, un agoniste de la LHRH, utilisé pour le traitement du cancer de la prostate. Dans ce système, le principe actif (7,5, 22,5 ou 30 mg) et le polymère (PLGA 75/25) ($\approx 40\%$) sont dissous dans le solvant hydrophile NMP (Sartor, 2003). Ce système permet l'inhibition de la production de testostérone chez le chien pendant environ 91 jours (Packhaeuser et al., 2004). Par ailleurs, il existe aussi la spécialité Atridox® (Atrix laboratories, Fort Collins, USA) utilisé pour la libération prolongée de l'hyclate de doxycycline dans le traitement de la maladie périodontale chez l'homme (Steinberg and Friedman, 1999). Ce produit contient une solution de PLA (36.7%) dans la NMP (63.3%) où le principe actif (42.5 mg) est dissous juste avant injection chez le patient. Lors de l'injection, le polymère précipite ce qui entraîne la formation d'un dépôt *in situ* à partir duquel la libération du principe actif est prolongée pendant 7 jours. Une formulation similaire de doxycycline commercialisée sous le nom de Doxirobe™ est également utilisée pour le traitement de la maladie périodontale chez le chien (Atrix laboratories, Fort Collins, USA).

D'autres solvants miscibles à l'eau, autres que la NMP, peuvent être utilisés pour la formulation de ces systèmes *in situ*. De façon générale, les solvants avec un paramètre de solubilité d'Hildebrand (HLB) compris entre 9 et 13 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$ permettent une solubilisation adéquate des polymères (Shively et al., 1995) (Atrix Laboratories, Canada). Ainsi, des solvants tels que le DMSO, l'acétate d'éthyle, l'acétone (Lambert and Peck, 1995) (Pfizer), la 2-pyrrolidone, le propylène glycol, le carbonate de propylène (Dunn et al., 1997) et le glycofurol (Eliaz and Kost, 1997; Eliaz and Kost, 2000; Eliaz et al., 2000) ont été utilisés pour la formulation de ces systèmes.

Un des problèmes des systèmes *in situ* est la libération initiale rapide du principe actif, notamment lorsque des solvants d'une relativement haute solubilité dans l'eau sont utilisés (Ruel-Gariépy and Leroux, 2004). D'autre part, lors de l'injection des solutions polymériques, les formes finales des implants obtenues ne sont pas couramment reproductibles, ce qui peut entraîner différents profils de libération pour une même formulation (Bodmeier, 1998). Ceci peut être notamment dangereux dans le cas de principes actifs à faible indice thérapeutique tels que les anticancéreux (5-fluorouracile), les anticonvulsivants (carbamazépine), ou encore des hormones comme l'hormone de croissance humaine (Wang et al., 2004). En effet, dans les formulations *in situ*, le burst est un phénomène principalement contrôlé par la dynamique d'inversion des phases qui est d'ailleurs un processus complexe. Puisque, avec les solvants hydrophiles, la diffusion du solvant vers le milieu physiologique (efflux) est rapide et que l'affinité de l'eau pour la phase polymérique est importante elle aussi (influx), la diffusion du principe actif vers le milieu extérieur est favorisée (Graham et al., 1999). La grande vitesse à laquelle ce phénomène a lieu, induit la formation d'implants contenant de nombreux pores digités qui communiquent entre eux depuis l'intérieur vers la surface du système, constituant un réseau qui favorise la diffusion du principe actif vers l'extérieur du dépôt (Brodbeck et al., 1999). Certains paramètres ralentissant cette dynamique d'inversion des phases contribuent à la réduction du « burst » des formulations. Ainsi, l'ajout de solvants lipophiles aux

solutions du polymère dans des solvants hydrophiles diminue l'affinité de l'eau pour la phase polymérique (Matschke et al., 2002). Par exemple, Graham et col. ont démontré une réduction significative de la libération initiale de lysozyme, lorsque la triacétine (lipophile) a été rajoutée à des solutions de PLGA dans la NMP (hydrophile) (Graham et al., 1999). De façon similaire, le mélange glycofurol (hydrophile) / triacétine (lipophile) a également été utilisé pour atténuer l'« effet burst » des formulations (Chern and Zingerman, 1999) (Merck).

Une autre technologie développée afin de diminuer le « burst » des systèmes *in situ*, est celle appelée **Dépôt Alzamer[®]** (Alza corporation, Canada) (Brodbeck et al., 2000). Ce système est un peu plus complexe. Il est constitué d'un polymère biodégradable, d'un solvant peu soluble dans l'eau (< 7%) et de microparticules préalablement formulées et qui contiennent le principe actif (Chen and Junnarkar, 2008). Parmi les solvants utilisés dans cette technologie peuvent être cités le benzoate de benzyle (Brodbeck et al., 2000), le benzoate d'éthyle (Brodbeck et al., 1999), la triacétine, le citrate de triéthyle (Shah et al., 1993) et l'alcool benzylique (Chhabra et al., 2007). En utilisant ces solvants, la dynamique d'inversion de phases est ralentie de façon importante en raison d'une faible incorporation d'eau dans la phase polymérique et d'une faible diffusion du solvant vers le milieu extérieur. Ceci est mis en évidence par une diminution de la vitesse de précipitation du polymère, ce qui conduit par ailleurs à l'obtention d'implants moins poreux par opposition à ceux issus de l'utilisation de solvants hydrophiles. Ici, la structure des implants obtenus est assimilable plutôt à celle d'une « éponge » où les pores ne communiquent pas entre eux, ce qui oblige le principe actif à diffuser avec le solvant à travers la matrice polymérique. Tout ceci conduit à une faible diffusion du principe actif et donc à un faible « burst ». Dans ce système, le principe actif peut être mis en suspension dans le solvant à des concentrations supérieures à celle de sa saturation dans l'eau, permettant ainsi l'obtention de cinétiques de libération d'ordre zéro (Brodbeck et al., 2000). Ainsi, cette technologie est utilisée pour la formulation de systèmes *in situ* contenant des

principes actifs tels que des protéines, des peptides mais aussi de petites molécules (Chen and Junnarkar, 2008). On peut citer à titre d'exemple, l'utilisation de la triacétine et du benzoate d'éthyle pour la réduction significative du « burst » dans la libération de lysozyme à partir d'implants de PLGA initialement formulés avec la NMP (Brodbeck et al., 1999) et des travaux comparant l'influence des mécanismes de formation des dépôts de PLGA avec la NMP, la triacétine et le benzoate de benzyle comme solvants, sur la cinétique de libération du métochloramide (Wang et al., 2004).

Différents paramètres autres que le solvant, peuvent également aboutir à une réduction du « burst » ou contribuer à moduler la libération du principe actif à partir des systèmes *in situ*. Une équation simple mettant en rapport ces paramètres avec la quantité de principe actif libéré au cours du temps a été proposée (Shah et al., 1993) ;

$$Q_t = f(a_1, a_2, b, c, d)$$

(Q_t) étant la quantité de principe actif libéré au temps t , (a_1) le rapport lactique/glycolique dans le polymère, (a_2) la masse moléculaire du polymère, (b) la concentration du polymère, (c) la concentration d'un additif (hydrophile ou lipophile) et (d) la concentration du principe actif. De nombreux travaux mettant en évidence l'effet de ces variables sur la libération de principes actifs ont été publiés. Ainsi, la libération initiale d'une protéine récepteur du facteur de nécrose tumorale ($TNF\alpha$), à partir d'implants de PLGA formulés en glycofurol, a été ralentie en modifiant plusieurs paramètres liés au polymère comme une augmentation de sa concentration, de sa masse moléculaire et du rapport d'acide lactique / acide lactique dans le copolymère. La première modification agit plutôt par une augmentation de la viscosité alors que les deux dernières le font par une augmentation de l'hydrophobicité de la solution polymérique qui induit une précipitation plus rapide du polymère. En revanche, une importante augmentation de la libération de la protéine a été

observée par une élévation de sa concentration dans la solution polymérique de 3 à 10%. En effet, en augmentant la concentration, la force de diffusion de la protéine pour quitter le système est plus élevée, ce qui favorise sa libération. D'autre part, quand la concentration de la protéine suspendue augmente, sa solubilisation et sa diffusion vers l'extérieur créent une matrice plus poreuse et de plus faible tortuosité qui accélère la vitesse de dégradation du polymère et la libération de la protéine (Eliaz and Kost, 2000). L'état physique, dissous ou suspendu, du principe actif a aussi un effet sur la vitesse de libération. En général, la vitesse de libération augmente lorsque le principe actif est suspendu (Körber and Bodmeier, 2008; Shah et al., 1993). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un principe actif en suspension, comme expliqué précédemment, crée un réseau poreux lorsque il est solubilisé par l'eau, ce qui contribue à sa libération rapide. En revanche, le principe actif dissous, subissant un phénomène de partage entre l'eau et le système polymère/solvant, a une vitesse de diffusion plus faible. En outre, il a été observé que les additifs qui augmentent le taux d'incorporation d'eau dans la solution polymérique tels que le mannitol, le chlorure de sodium (Shah et al., 1993) et la polyvinylpyrrolidone (Graham et al., 1999), favorisent la libération du principe actif, tandis que ceux qui la rendent plus hydrophobe comme c'est le cas des triglycérides de chaîne moyenne, la diminuent. Ainsi, une augmentation de la vitesse de libération de la myoglobine à partir d'implants formés à l'injection d'une solution de PLGA dans la triacétine a été obtenue par l'addition de mannitol alors qu'une réduction a été constatée par celle de miglyol[®] 812 (triglycéride de chaîne moyenne) (Shah et al., 1993). Les implants *in situ* (ISI) possèdent des avantages sur les systèmes implantables préformés, mais ils présentent plusieurs inconvénients liés à la haute viscosité des solutions polymériques les rendant difficiles à injecter, à la libération rapide du principe actif en raison du temps de latence entre l'injection et la formation du système (« lag time ») et à la toxicité éventuelle des solvants utilisés (Kranz and Bodmeier, 2008).

2.3.3.3 Microparticules *in situ* (ISM)

En réponse aux problèmes associés à l'utilisation des microparticules préformées et des implants *in situ*, de nouvelles méthodologies pour l'obtention de microparticules *in situ* (ISM) ont été développées. De façon générale, les ISM peuvent être obtenues par deux mécanismes : la coacervation ou l'extraction de solvant.

2.3.3.3.1 ISM par coacervation

Cette méthode consiste en une dispersion stable de microglobules ('pré-microsphères' ou 'microsphères embryonnaires') de PLGA dans une phase dispersante appropriée. Lors de son injection dans le corps, le milieu physiologique aqueux induit le durcissement des microglobules sous la forme de microparticules et le principe actif est incorporé dans la matrice solide formée. Le principe actif est ensuite libéré de façon prolongée à partir des microsphères. Cette méthode a été initialement conçue pour la libération prolongée de peptides et de protéines (Jain et al., 2000). Dans la préparation de ce système Jain et al. ont préparé tout d'abord une solution de PLGA dans la triacétine à laquelle une solution de Tween[®] 80 dans du PEG 400 contenant une protéine modèle (cytochrome c) a été ajoutée constituant ainsi une première phase huileuse. Cette phase huileuse 1 est ajoutée goutte à goutte, sous agitation continue à une deuxième phase huileuse constituée de Miglyol[®] 812 et du Span[®] 80, ce qui entraîne la séparation « coacervation » du PLGA et la formation des microglobules de PLGA contenant la protéine. Cette préparation est décrite comme possédant une viscosité permettant son injection chez le patient. L'injection de ce système induit le durcissement des microparticules de PLGA contenant le principe actif comme décrit précédemment (Jain, 2000).

L'influence de plusieurs paramètres sur le taux d'encapsulation et la vitesse de libération *in vitro* du cytochrome c à partir de ce système ont été étudiées. Ainsi, il a été observé que le taux

d'encapsulation de la protéine augmentait en diminuant la concentration de PEG 400 dans la phase huileuse 2 et en augmentant la concentration du principe actif. La vitesse de libération du cytochrome c augmente avec son taux d'incorporation dans les microsphères et avec la proportion de mannitol (Jain et al., 2000).

2.3.3.3.2 ISM par extraction de solvant

Dans cette méthode, une phase polymérique semblable à celle utilisée pour la fabrication des ISI et contenant le principe actif (suspendu ou dissous), est émulsifiée, juste avant injection, avec une autre phase soit organique (par exemple une huile végétale) (ISM-O/O), soit aqueuse (par exemple de l'eau) (ISM-O/W) à l'aide d'un système de va-et-vient constitué de deux seringues contenant chacune une phase et reliées par un connecteur. L'émulsification a lieu, par le passage répété de chacune des phases d'une seringue à l'autre à travers le connecteur (faible en diamètre). Chaque aller-retour du système constitue un cycle d'émulsification et la vitesse d'émulsification est exprimée en nombre de cycles par seconde (c/s) (Figure 21).

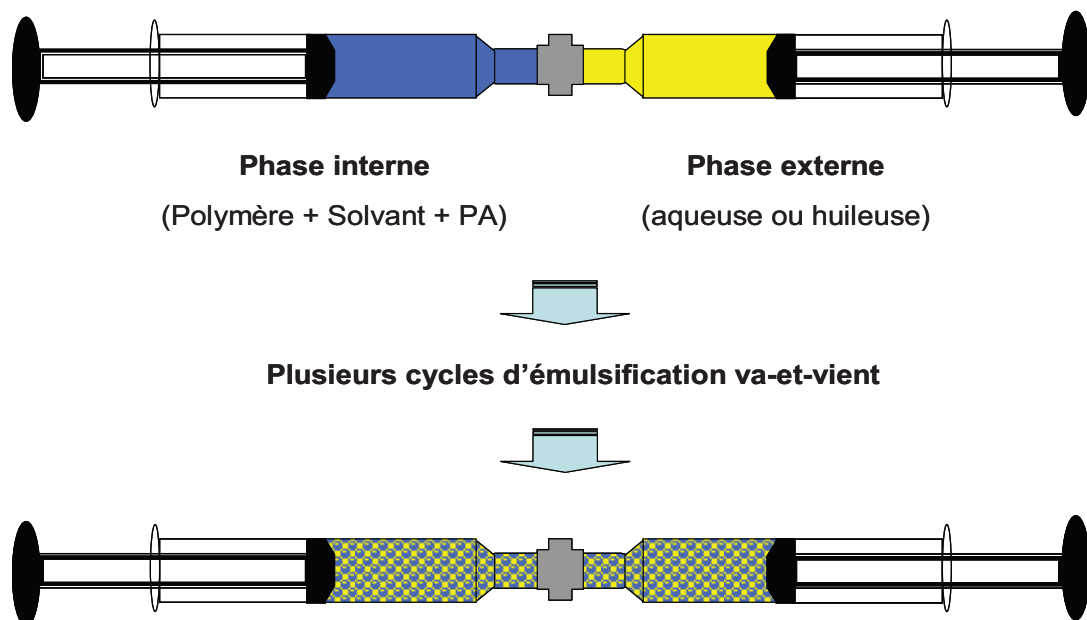


Figure 21. Dispositif utilisé pour l'émulsification de phases avant l'injection chez le patient.

Lors de l'injection de cette émulsion, le système entre en contact avec l'environnement aqueux des fluides physiologiques, ce qui entraîne la diffusion du solvant organique de la phase polymérique (phase interne) vers le milieu aqueux environnant, conduisant ainsi à la précipitation du polymère sous la forme de microparticules où le principe actif est retenu (Bodmeier, 1998; Kranz and Bodmeier, 2007) (Figure 22).

Les solvants utilisés pour la préparation des ISI par précipitation du polymère, peuvent être utilisés pour la préparation des phases polymériques (internes) des ISM. Cependant, en fonction de leur solubilité dans l'eau, ils sont employés soit pour des ISM-O/O (solvants hydrophiles) soit pour des ISM-O/W (solvants hydrophobes). De ce fait, le solvant choisi doit être insoluble dans la phase externe de l'émulsion afin de garantir l'existence des deux phases. En ce qui concerne la phase externe des ISM-O/O, les huiles végétales le plus couramment utilisées sont l'huile d'arachide, l'huile de sésame et l'huile de soja auxquelles un tensioactif hydrophobe (ex. Span[®] 80) et des stabilisants de l'émulsion (ex. monostéarate d'aluminium) peuvent être incorporés (Luan and Bodmeier, 2006a). Dans les ISM-O/W, la phase externe consiste habituellement en une solution aqueuse d'un tensioactif hydrophile (ex. Tween[®] 80, Lutrol[®] 68) (Im-Emsap, 2002).

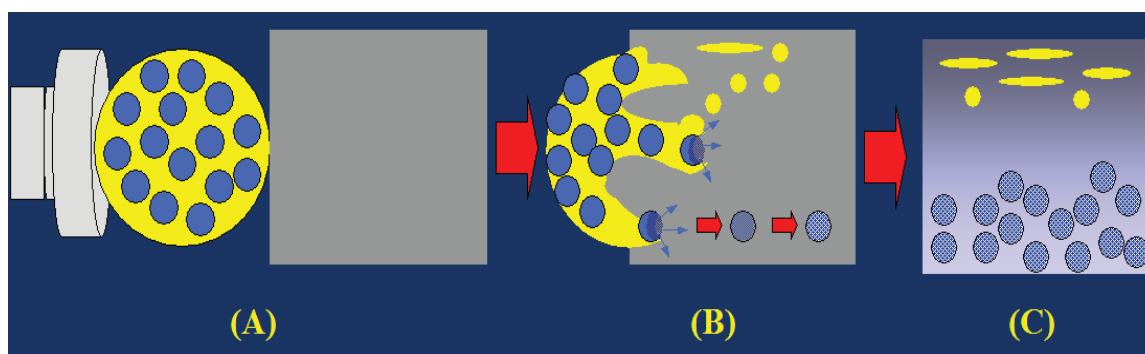


Figure 22. Phénomène d'inversion de phases lors de l'obtention de ISM ; (A) Injection de l'émulsion (O/O) ou (O/W) dans le milieu aqueux ou les tissus (B) diffusion du solvant biocompatible et vers le milieu extérieur (C) précipitation des ISM. (●) phase polymérique interne, (●) phase externe, (●) ISM, (■) milieu aqueux extérieur.

Plusieurs paramètres tels que le type de polymère (Luan and Bodmeier, 2006b), la vitesse d'émulsification, la concentration du polymère et celle du principe actif dans la phase polymérique, le rapport phase polymérique/phase externe, la concentration du tensioactif et la présence d'additifs déterminent la vitesse de libération des principes actifs à partir de ces systèmes (Luan and Bodmeier, 2006a).

Ainsi, les ISM possèdent une plus faible toxicité et sont aussi plus facilement injectables que les ISI (Rungseevijitprapa and Bodmeier, 2009). Ceci s'explique par la biocompatibilité des huiles végétales utilisées qui également déterminent une viscosité de la préparation plus faible que celle de la phase polymérique. La myotoxicité des ISM (ISM-O/W ou ISM-O/O) a été étudiée sur le muscle isolé de rat (Kranz et al., 2001; Rungseevijitprapa et al., 2008). Dans ces études, une moindre toxicité des ISM a été constatée par rapport aux ISI et aux solvants biocompatibles purs. D'autre part, la méthode de préparation des microparticules *in situ* est plus simple que les méthodes classiques de préparation de microparticules. Par exemple, en ce qui concerne la stérilisation, le produit peut être fabriqué dans des conditions aseptiques en rajoutant une filtration finale. Sinon, une stérilisation finale par rayons gamma peut aussi être réalisée (Kranz and Bodmeier, 2007).

2.4 Caractérisation physicochimique et comportement des polymères en solution

La capacité d'un solvant pour dissoudre un polymère, est une caractéristique très importante lorsqu'il est utilisé pour la préparation de systèmes de libération prolongée de principes actifs selon les méthodes décrites précédemment. Cette capacité est notamment déterminée par la force des interactions (affinités) mises en jeu, lorsque des couples solvant/polymère entrent en contact. De ce fait, la caractérisation des interactions solvant/polymère détermine, dans quelle mesure ou dans quelles situations, ces couples peuvent être utilisés pour un objectif galénique spécifique. Par exemple, ces interactions sont responsables de certaines propriétés physico-chimiques des solutions

polymériques telles que la viscosité et la rhéologie. Ces propriétés ont un rôle très important sur les caractéristiques des systèmes de libération réalisés, telles que la forme et la taille mais aussi sur des autres reliées au principe actif comme le taux d'incorporation et la vitesse de libération. Ainsi, des paramètres de solubilité ont été utilisés pour caractériser ces interactions.

2.4.1 Paramètres de solubilité

Les paramètres de solubilité ont été largement utilisés pour mieux comprendre le comportement des polymères en solutions organiques (Barton, 1991). En effet, ces outils physico-chimiques ont eu une importance majeure dans la détermination de la qualité des solvants vis-à-vis des polymères biodégradables utilisés pour la préparation de systèmes de libération de principes actifs tels que les microparticules (Bodmeier and McGinity, 1988), les nanoparticules (Legrand et al., 2007) ou les systèmes in situ (Kranz and Bodmeier, 2008; Shively et al., 1995).

Dans un premier temps, le paramètre de solubilité d'Hildebrand (δ) a été utilisé pour prédire la solubilité des polymères dans différents solvants. Ce paramètre relie l'énergie de vaporisation (densité d'énergie cohésive) d'un liquide avec sa capacité pour dissoudre un soluté, par exemple un polymère :

$$\delta = (E/V)^{1/2} = [(\Delta H - RT)/V]^{1/2}$$

où E représente l'énergie de vaporisation du solvant, V le volume molaire du solvant pure, ΔH la chaleur de vaporisation, R la constante des gaz parfaits et T la température absolue. Ce paramètre (δ) est très utile dans la prédiction de relations de solubilité. L'énergie de vaporisation d'un liquide est un indicatif du degré de forces de Van der Waals qui maintient les molécules du solvant ensemble. Ce sont ces forces que doit également vaincre un soluté pour se dissoudre dans le solvant.

D'un point de vue thermodynamique, l'énergie de mélange de la solubilisation du polymère doit être égale à zéro ou négative pour que le processus se déroule spontanément. Le changement d'énergie du processus est décrit par :

$$\Delta G^M = \Delta H^M - T\Delta S^M$$

où ΔG^M représente l'énergie libre de Gibbs de mélange, ΔH^M la chaleur de mélange, T la température absolue et ΔS^M le changement d'entropie du processus de mélange. La chaleur de mélange peut être exprimée en termes de fractions volumiques du solvant et du polymère (Hildebrand and Scott, 1962) ainsi:

$$\Delta H^M = \phi_1 \phi_2 V (\delta_1 - \delta_2)^2$$

où ϕ_1 et ϕ_2 correspondent aux fractions volumiques du solvant et du polymère et V au volume molaire du mélange. De ce fait, le processus de solubilisation du polymère est favorisé pour des faibles volumes et pour des faibles différences dans les paramètres de solubilité du couple solvant/polymère. De ce fait, il est également attendu que des solvants possédant des paramètres de solubilité similaires peuvent dissoudre de la même façon un même polymère. Cependant, puisque la théorie d'Hildebrand ne prend pas en compte les différents types d'associations entre les molécules qui déterminent les forces de Van der Waals, telles que les liaisons d'hydrogène et les interactions polaires, cette hypothèse n'est pas toujours valable et ce paramètre est seulement applicable aux solutions régulières, c'est-à-dire les solutions dans lesquelles les interactions polymère/solvant sont négligeables (comme les solutions diluées) (Hansen, 2007).

Un autre concept plus précis de paramètre de solubilité, conçoit l'énergie totale de vaporisation (δ) (Hildebrand) d'un solvant, comme la somme de plusieurs parties individuelles, à savoir; i) les interactions atomiques non polaires (δ_d), ii) les interactions moléculaires permanentes dipole-permanent dipôle (δ_p) et les liaisons moléculaires d'hydrogène (δ_H). Ces éléments sont appelés les paramètres de solubilité de Hansen (HSP) (Hansen, 1967) ;

$$\delta = (\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2)^{1/2}$$

Puisque, des matériaux présentant des valeurs de HSP semblables ont une affinité importante entre eux, la valeur du paramètre $\Delta\delta$ (calculé selon la formule suivante) est souvent utilisée pour déterminer leur niveau d'affinité :

$$\Delta\delta = [(\delta_s - \delta_p)_d^2 + (\delta_s - \delta_p)_p^2 + (\delta_s - \delta_p)_h^2]^{1/2}$$

où δ_s et δ_p sont les paramètres partiels de solubilité du solvant et du polymère respectivement. De ce fait, plus le $\Delta\delta$ est faible, plus l'affinité et la solubilité sont importantes.

Ces paramètres ont été utilisés pour caractériser d'un point de vue qualitatif, différents matériaux tels que des polymères (Schenderlein et al., 2004), des plastifiants, des tensioactifs et des principes actifs (Hansen, 2004). Par exemple, le paramètre de solubilité d'Hildebrand a été utilisé pour prédire la solubilité du PLA et du PLGA dans différents solvants organiques (Lambert and Peck, 1995; Shively et al., 1995). Ainsi, une solubilité maximale de ces polymères a été trouvée pour des valeurs du paramètre de solubilité d'Hildebrand (δ) comprises entre 9-11 (Lambert and Peck, 1995) ou 9-12,3 (cal/cm³)^{1/2} (Shively et al., 1995). De plus, le taux d'incorporation de différents principes actifs fortement hydrophobes, dans des micelles à base d'un copolyester d' ϵ -caprolactone et de

carbonate de trymethylène, a été déterminé par simulation et comparaison mathématiques des paramètres de solubilité, donc de l'interaction entre les principes actifs et le polymère (Dwan'Isa et al., 2005).

2.4.2 Viscosité des polymères en solution

La viscosité (dynamique et cinématique) des solutions polymériques est une propriété physico-chimique fortement dépendante des interactions polymère-solvant. Ces interactions dépendent à la fois de propriétés du polymère tels que sa nature, sa masse moléculaire, sa concentration et sa conformation mais aussi du type de solvant (Teraoka, 2002) .

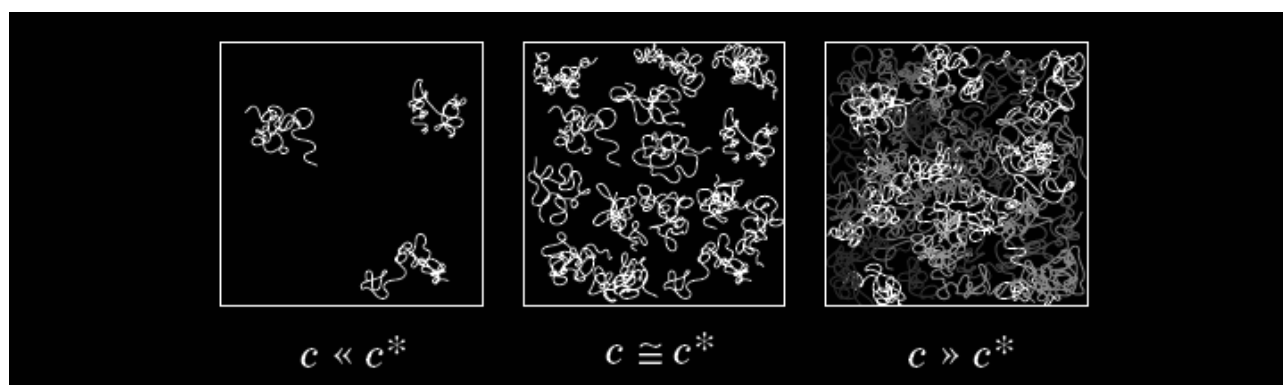


Figure 23. Régimes de concentration des solutions polymériques (Teraoka, 2002).

Comme le montre la figure 23, les interactions polymère-solvant changent en fonction de la concentration du polymère dans le solvant. Dans des solutions diluées, les chaînes du polymère sont séparées entre elles restant plus ou moins indépendantes. Ainsi, les chaînes polymériques interagissent principalement avec les molécules du solvant. Cependant, pour une certaine valeur de concentration (C^*) les chaînes du polymère commencent à s'enchevêtrer entre elles ce qui augmente les interactions polymère/polymère. Pour des concentrations $C \gg C^*$, les chaînes du

polymère sont superposées et enchevêtrées, et le système passe d'un régime dilué à un régime semi-dilué pour lequel une augmentation importante de la viscosité a lieu (Teraoka, 2002).

Dans un régime dilué, la viscosité η de la solution polymérique est presque celle du solvant pur η_0 . Ainsi, si l'on considère que le solvant et la solution possèdent la même densité (ρ) et que l'écoulement libre de la solution pendant un temps (t) subit un régime linéaire, la viscosité relative η_r de la solution peut être déterminée par :

$$\eta_r = \eta / \eta_0 = \rho t / \rho_0 t_0 = t / t_0$$

à partir du rapport des temps d'écoulement obtenus par viscosimétrie capillaire pour la solution diluée (t) et pour le solvant (t_0).

La viscosité spécifique η_s des solutions est reliée à la viscosité relative par l'expression $\eta_s = \eta_r - 1$.

La valeur de l'intercepte des courbes η_{sp} / C en fonction de la concentration du polymère permet l'obtention de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ de la solution selon la relation de Huggins (Huggins, 1942) :

$$\eta_{sp} / C = [\eta] + k' [\eta]^2 C$$

La viscosité intrinsèque est un indicatif de la taille et de la forme des polymères en solution et de ce fait, elle reflète la capacité d'un polymère en solution à augmenter la viscosité de la solution (Pan and Cheng, 2000).

Pour un polymère donné, il existe des solvants qui le dissolvent bien (appelés « bons solvants ») et ceux qui le dissolvent plus difficilement (appelés « mauvais solvants ») (Teraoka, 2002). Ainsi,

lorsqu'un polymère est dissous dans un « bon solvant », les chaînes du polymère sont hautement entourées par le solvant (étendues), empêchant ainsi les contacts polymère / polymère, ce qui entraîne l'obtention d'une plus grande viscosité intrinsèque et d'une faible valeur de C^* ($[\eta] = 1 / C^*$). En revanche, dans un « mauvais solvant » les interactions polymère / polymère sont plus importantes que les interactions polymère / solvant. De ce fait, la configuration du polymère est plutôt enroulée et contractée conduisant ainsi à une faible viscosité intrinsèque (Alfrey, 1947). Cependant, pour un régime concentré C^{**} , la viscosité des solutions polymériques est plus élevée dans un « mauvais solvant » que dans un « bon solvant ». Ceci s'explique par une augmentation des interactions polymère / polymère dans les « mauvais solvants » qui entraînent la formation d'agrégats et ainsi une viscosité plus élevée. Au contraire, dans les « bons solvants », même si la concentration est élevée, les interactions polymère / solvant prédominent sur les interactions polymère / polymère conduisant à une viscosité plus faible.

Ainsi, différentes études de viscosimétrie ont été réalisées afin d'expliquer le comportement des PLA et PLGA dans la fabrication de microparticules (Bodmeier and McGinity, 1988), nanoparticules (Legrand et al., 2007) et des systèmes in situ (Kranz and Bodmeier, 2008).

3. TRAVAIL EXPERIMENTAL

3 TRAVAIL EXPERIMENTAL

3.1 Objectifs

L'objectif de ce travail a été de développer et de comparer des systèmes parentéraux, biodégradables, conçus pour la libération prolongée d'une molécule lipophile antiparasitaire : l'ivermectine. Les systèmes choisis à savoir; des microparticules préformées obtenues par la méthode classique de simple émulsion - évaporation de solvant, des implants *in situ* (ISI) et des microparticules *in situ* (ISM), ont été préparés en utilisant les polyesters de l'acide lactique et/ou glycolique. De façon plus précise, les objectifs majeurs de ce travail ont consisté en:

- a) La caractérisation physico-chimique de chacun des systèmes réalisés.
- b) L'étude des facteurs permettant la modulation de la libération du principe actif *in vitro*
- c) L'évaluation de la performance biopharmaceutique des formulations par des essais *in vivo*

3.2 Microparticules biodégradables pour la libération prolongée d'ivermectine et destinées à la voie parentérale: caractérisation *in vitro* et effet de quelques variables de formulation

RESUME

Cette première étude expérimentale, publiée dans *Journal of Microencapsulation*, rapporte nos premiers essais d'encapsulation de la molécule par la technique classiquement utilisée d'émulsion simple – évaporation de solvant. Si d'autres auteurs avaient évoqué la possibilité d'encapsuler l'IVM dans des microparticules de polymère (Miller et al., 1998, 1999), c'est plutôt dans un souci d'optimisation des formulations et de détermination des paramètres physicochimiques critiques que s'inscrit ce travail de caractérisation *in vitro*. Trois polyester biocompatibles ont été utilisés : des polymères et copolymères d'acide lactique (PLA) et glycolique (PLGA) présentant des groupements terminaux différents (ester pour le PLGA S et le PLA S et acide libre pour le PLGA H). Le but était ici d'observer l'influence de ces polymères d'hydrophobie variable et de vitesse de dégradation variable, sur l'encapsulation et la libération de l'IVM. L'impact d'un polymère ajouté au procédé et connu pour former des pores, la polyvinylpyrrolidone (PVP), a été également étudié. Ainsi les paramètres physico-chimiques des différentes microparticules préformées ont été comparés: i) les particules présentaient une taille avoisinant 40 μm et permettaient d'encapsuler environ 90%, quelque soit la nature du polymère utilisé, ii) les études réalisées en diffraction aux rayons X et les analyses par calorimétrie différentielle ont montré que l'IVM se présentait à l'état amorphe ou en dispersion moléculaire dans la matrice polymérique, iii) des profils de libération *in vitro* bi- ou triphasique ont été obtenus en fonction du polymère utilisé. Par exemple, un profil triphasique a été observé pour les formulations à base de polymères estérifiés (PLA S et PLGA S), avec une libération plus importante pour le PLGA S (47% à 15 jours) que pour le PLA S (28% à 15 jours) lié à son caractère plus hydrophile. En revanche, le PLGA H a conduit à l'obtention d'un profil biphasique avec une libération initiale très importante (38% dès les 24 premières heures) pour

atteindre 98 % au dixième jour. Ce polymère plus « hydrophile » que les deux précédents par la présence de groupement carboxyle libre, permet une pénétration de l'eau plus importante dans la matrice de polymère et ainsi une diffusion d'IVM vers le milieu extérieur plus aisée. Les observations en microscopie électronique ont montré que l'ajout de PVP entraînait l'apparition de pores à la surface des microparticules, permettant ainsi d'expliquer la libération de l'IVM plus importante constatée pour ces formulations. Ainsi, la libération de l'IVM *in vitro* à partir de microparticules de polymère peut être modulée par les caractéristiques des polymères et en modifiant l'influx d'eau au sein des particules. Ce travail représente donc un point de départ intéressant à la mise au point de formulation délivrant de l'IVM de façon prolongée, pour une application vétérinaire.

**Ivermectin-loaded microparticles for parenteral sustained release:
“*in-vitro*” characterization and effect of some formulation variables**

J.A. Camargo^a, A. Sapin^a, D. Daloz^b, P. Maincent^a

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

^b Nancy Université, Ecole des Mines de Nancy, Laboratoire de Science et Génie des Matériaux et Métallurgie (LSG2M), Parc de Saurupt CS 14 234, 54042 Nancy Cedex, France

* Correspondence:

Professor Philippe Maincent

Faculty of Pharmacy

Nancy University

5 rue Albert Lebrun

54000 Nancy, France

Phone: + 33 (3) 83 68 22 97

Fax: + 33 (3) 83 69 23 01

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

Abstract

Ivermectin (IVM) is a BCS II drug with potent antiparasitic activity in veterinary applications. In this study, poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(DL-lactide) (PLA) Ivermectin-loaded microparticles were prepared by the simple emulsion (O/W) solvent evaporation method in order to obtain sustained release formulations for parenteral applications. The effects of polymer end-groups (ester or free acid) and the addition of the hydrophilic polyvinylpyrrolidone polymer (PVP) in *in-vitro* drug release profiles were also studied. X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC) analysis showed that IVM was present in an amorphous state or as a molecular dispersion within the polymers or their mixtures with PVP and that a PVP-drug complex was formed. Drug entrapment efficiency in the microparticles (>90%) was independent of the polymer composition, the end groups and the presence of PVP. However, microscopic (SEM) observations showed that addition of PVP led to more porous microparticles accompanied by increased rates of drug release.

Keywords: Ivermectin, sustained release, microparticles, PLGA, PLA

1. Introduction

Ivermectin (IVM) is a macrocyclic lactone with a potent antiparasitic activity which has been used successfully since the 80s (Omura, 2008) in livestock, pets and even in humans (Bassissi et al., 2006) at a therapeutic dose of 200 µg / kg. In veterinary medicine, it has proved to be very useful for the control of endo-and ectoparasites such as nematodes, fleas, flies, ticks and mites, which has a great impact in the animal health market. For example, the infestation of dairy cows with ectoparasites leads to loss of weight and reduced milk production and thus affects productivity. Ectoparasites also cause skin diseases in pet animals (Winzenburg et al., 2004). The oral bioavailability of IVM is very low, mainly due to its poor water solubility (Class II - BCS) (Takano et al., 2006), its binding to organic material in the intestine (Gokbulut et al., 2006) and its secretion by the P-glycoprotein present in the intestinal epithelium (Gonzalez Canga et al., 2009). As a result, IVM is administered subcutaneously to maximize its bioavailability by avoiding gastrointestinal barriers and the hepatic first pass effect. Nevertheless, its repeated and often indiscriminate use has lead to treatment failures and the appearance of resistance in some animal species. In the light of this and the fact that the efficacy of IVM, like all antiparasitic drugs, is mainly dependent on the duration in which the concentration above the toxic threshold for the target parasite (Hennessy, 1997), this drug is a potential candidate for formulation in parenteral controlled delivery systems.

Microparticulate parenteral delivery systems for controlled drug release have gained importance in recent years (Freiberg and Zhu, 2004). They can act as “intelligent” devices to maximise the drug availability and provide appropriate therapeutic levels throughout treatment. Furthermore, patient compliance and comfort are improved and side effects reduced because of a smaller number of injections. Several types of synthetic and natural materials have been used to prepare microparticles for controlled drug release. Until now, materials such as silicone, polyurethane, ethylene vinylacetate copolymers which are inexpensive, biocompatible and biologically inert and that have

received regulatory approval have been used to manufacture the majority of veterinary drug delivery systems. Nevertheless, in recent years the interest in biodegradable polymers as systems of controlled and prolonged drug delivery for veterinary applications has grown in importance. The reason is that delivery systems based on biodegradable polymers do not require removal from the animals at the end of the treatment period (Brannon-Peppas, 1995; Sun et al., 2004) since they are degraded into metabolites that can be readily excreted from the body (Winzenburg et al., 2004). Among these polymers, the synthetic polyesters poly(lactic acid) (PLA) and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) have been the materials of choice because of their recognized biodegradability and biocompatibility (Brannon-Peppas, 1995; Shive and Anderson, 1997; Uhrich et al., 1999). With these materials, polymer degradation and the resulting profiles of controlled drug release up to days, weeks or months (Mundargi et al., 2008) can be modified as a function of the polymer composition (Frank et al., 2005), crystallinity (Brannon-Peppas, 1995; Uhrich et al., 1999), molecular weight (Jaraswekin et al., 2007) and the terminal functional groups (i.e. ester or free-acid) (Chhabra et al., 2007; Tracy et al., 1999). However, drug properties (Frank et al., 2005; Klose et al., 2008) and physical device characteristics such as shape (Klose et al., 2008), porosity and size (Dunne et al., 2000; Herrmann and Bodmeier, 1995; Klose et al., 2006) have also an important role in determining the way in which drug is released. Appropriate controlled release profiles can also be obtained by modifying the topological (porosity) and physicochemical (hydrophilicity) properties of the microparticles with excipients such as polyvinylpyrrolidone (PVP), medium chain triglyceride (MCT) (Luan and Bodmeier, 2006), D-mannitol, bovine serum albumin (BSA) and polyethylene glycol (PEG) (Kim et al., 2000). PLGA microparticles loaded with IVM have already been prepared but the authors principally focused on *in vivo* studies (Clark et al., 2004; Miller et al., 1999; Miller et al., 1998) without giving special attention to formulation factors that could affect drug release in order to create more rational parenteral dosage forms.

Thus, the objective of this study was to produce and characterize sustained release formulations of IVM based on PLA and PLGA microparticles obtained by the simple emulsion (O / W) solvent evaporation method. The effect of some variables such as polymer composition, polymer end groups (ester or free-acid) and the addition of a pore former (PVP) on the release of IVM “*in vitro*” and on the properties of the microparticles was studied

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The following chemicals were used as received: Poly (DL-lactide) (PLA; Resomer[®] R 203 S, end-capped, iv 0.31 dL/g), poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA 50:50; Resomer[®] RG 502 H, uncapped, iv 0.18 dL/g and Resomer[®] RG 502 S, end-capped, iv 0.20 dL/g) (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany), methylene chloride, sodium hydroxide, orthophosphoric acid, potassium dihydrogen phosphate (VWR Prolabo, Fontenay Sous Bois, France), polyvinylpyrrolidone (PVP) (Kollidon[®] 17 PF endotoxin-free, BASF AG, Ludwigshafen, Germany). Ivermectine (IVM), polyethylene glycol sorbitan monooleate (Tween[®] 80, HLB: 14.9), polyvinyl alcohol (PVA, Mw 30.000 Da, 88 % hydrolyzed) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Acetonitrile (Carlo Erba-SDS, Val de Reuil, France). Deionized water was obtained using an ELGA system (PURELAB[™] Option, Le Plessis Robinson, France).

2.2 Methods

2.2.1 Microparticle preparation

Drug-loaded, PLGA and PLA-based microparticles were prepared by the simple emulsion (O/W) solvent evaporation method. Briefly, 250 mg of PLGA or PLA, 80 mg of IVM and 50 mg of Kollidon K-17PF (when used) were dissolved in methylene chloride (10 mL). This organic solution (internal phase) was emulsified into 1 L of 0.1% w/v PVA aqueous solution (external phase) under stirring using an agitator (Polystat[®], FISHER Scientific Bioblock, Illkirch, France) at 1600 rpm. Solvent evaporation was achieved by stirring for a further 2 h at the same rate. The solid microparticles were separated by filtration under vacuum and dried for 2 days at room temperature until the water content was less than 1 % (Karl-Fisher).

2.2.2 Particle size analysis

The samples were suspended in an aqueous solution of 1% (w/v) Tween[®] 80 under vortex agitation and microparticle size was determined by laser diffraction using a granulometer (Mastersizer X[®], Malvern, Instruments, Worcestershire, UK) equipped with Mastersizer X[®] V2.18 software ($n=3$).

2.2.3 Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was carried out using a Quanta (Quanta 600 Feg, FEI Company, Lyon, France) operating between 1.5 – 4.5 kV under nitrogen atmosphere to observe the morphology and the surface structure of the dry microparticles.

2.2.4 Differential scanning calorimetry

The glass transition temperature (T_g) of the polymers was analysed by differential scanning calorimetry (DSC) using a calorimeter (DSC Q₁₀[®], TA Instruments, Guyancourt, France). Accurately weighed samples of approximately 5-7 mg were put in aluminium pans (Al-crucibles, 40 μ L), first cooled to -10 °C and then heated up to +190°C at a constant rate of 10 °C / min under a nitrogen atmosphere. The T_g was determined during the second heating run.

2.2.5 X-ray diffraction

X-ray powder diffraction (XRD) measurements were carried out with a Philips PW 1830 X-ray generator with a copper anode (Cu K α radiation, $\lambda = 0.154418$ nm, 40 kV, 20 mA) fixed with a Philips PW 1710 diffractometer (Philips Industrial & Electron-acoustic Systems Division, Almelo, The Netherlands). The scattered radiation was measured with a vertical goniometer (Philips PW 1820) (Philips Industrial & Electron-acoustic Systems Division, Almelo, The Netherlands). The scanning rate used was 0.02° 2 θ s⁻¹ over the range of 4-40° 2 θ .

2.2.6 Determination of Ivermectin loading

The IVM loading within PLGA or PLA microparticles was determined by dissolving accurately weighed amounts (approximately 30 mg) of microparticles in an appropriate volume of acetonitrile to fall within the linearity concentration range of the HPLC method. The concentration of the IVM in this solution was determined using the modified HPLC method developed by Liu (Liu et al., 2006). Thus, 80 μ L of the filtered solution were injected in a Shimadzu liquid chromatograph (SCL-10A VP, Croissy Beabourg, France). The analysis was performed by RP-HPLC at 243 nm using a C₁₈ Uptisphere[®] column (120 Å, ODB-C₁₈, 5 μ m; 3 x 150 mm, Interchim, Montluçon, France), mobile phase acetonitrile:water (75:25, v/v), flow rate 1.0 mL/min, temperature 35 °C ($n = 3$). The method was linear between 0.3 to 100 μ g/mL ($R^2 > 0.99$). The results were analysed with Class-VP[®] software (Shimadzu, Croissy Beabourg, France). The percentage encapsulation was calculated as (100 % x actual drug loading / theoretical drug loading).

2.2.7 Ivermectin solubility

Ivermectin is a very lipophilic drug ($\text{Log } P = 3.217$) with water solubility of only about 4 μ g/mL. In order to verify that sink conditions were achieved for the *in-vitro* release studies, an excess amount of ivermectin was placed in 10 mL phosphate buffer pH 7.4 containing 2% Tween 80 ($n=2$). The samples were shaken for 48 hours at 25 °C in a horizontal magnetic agitator Variomag[®] (Poly 15, VWR Prolabo, Fontenay Sous Bois, France). The saturated drug solution was centrifuged at 15000 g for 20 minutes at room temperature (Biofuge Statos, Prolabo, Nogent sur Marne, France), filtered through 0.2 μ m nitrocellulose filters and then assayed after appropriate dilution as described above (section 2.2.6). The method was linear between 4 to 100 μ g/mL ($R^2 > 0.99$) and specific for this dissolution medium.

2.2.8 *In- vitro* drug release studies

The *in-vitro* release studies were carried out by suspending a weighed amount of microparticles (approximately 50 mg) in 20 mL of phosphate buffer pH 7.4 with 2% of Tween 80, using 50 mL flasks ($n=3$). Sodium azide 0.05 % (w/v) was added as a preservative. The flasks were incubated for 15 days at 37 °C under magnetic stirring at 200 rpm in an incubation shaker (Polystat®, FISHER Scientific Bioblock, Illkirch, France). At predetermined time intervals 1.5 mL samples were withdrawn, replaced with fresh medium and filtered through 0.45 µm nitrocellulose membranes. The IVM concentration in the filtrate was determined by RP-HPLC analysis at 243 nm (as described in section 2.2.6). However, since IVM is only stable for 33 hours in the release medium (data not shown), the release medium was replaced after 24 hours in order to prevent any degradation. The microparticles remaining after 24 hours were recovered by filtration through a 0.45 µm filter and dried for 48 hours at room temperature. The amount of IVM remaining in the microparticles (non released IVM) was determined by RP-HPLC as described previously (section 2.2.6). Furthermore, the amount of IVM in the suspended microparticles at the beginning of the experiment allowed an accurate mass balance to be calculated.

2.2.9 *Statistical analysis*

The results were expressed as mean values $\pm$ S.D. A pairwise comparison by the Mann–Whitney test was used to determine the statistical significance of the differences. In all cases, $P < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results and discussion

3.1 Ivermectin entrapment, shape and size of the microparticles

The microparticles obtained for all formulations had a spherical shape as shown in SEM microphotograph (Figure 1).

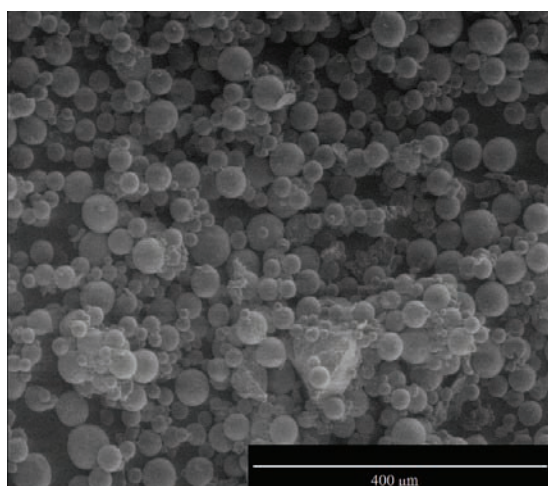


Fig. 1: Scanning electron micrograph of PLGA S-based microparticles containing ivermectin.

The drug entrapment efficiency in microparticles was high (>90% w/w) (Table 1) and varied linearly with IVM content between 20 – 80 mg as demonstrated in Figure 2 for PLGA S microparticles. Similar results were obtained for PLGA H and PLA S (data not shown).

Table 1: The influence of PVP on ivermectin encapsulation and microparticle size. Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n=3$)

Polymer	End group	Without PVP		With PVP	
		Entrapment (%w/w)	Size (μm)	Entrapment (%w/w)	Size (μm)
PLGA (50:50) H	Acid free	91.9 ± 1.4	36.8 ± 2.6	94.9 ± 2.6	45.1 ± 4.5
PLGA (50:50) S	Ester	90.0 ± 4.4	36.3 ± 0.8	95.4 ± 4.4	36.4 ± 4.5
PLA S	Ester	94.6 ± 5.8	37.6 ± 2.7	97.9 ± 1.5	37.6 ± 3.2

Thus, it was possible to obtain PLGA or PLA IVM-loaded microparticles with drug loadings between 7% (20 mg IVM/ 270 mg microparticles) and 24% (80 mg IVM/ 330 mg microparticles). From a therapeutic point of view, taking into account the wide range of animal species needing to be treated with antiparasitics, this result seems very interesting for the flexibility in formulation that it predicts. In addition, the possibility of high drug entrapment would allow a small amount of particles to be administered in order to reach the therapeutic dose. For our experiments, the microparticles with the highest drug loading (24 %) were selected. The high IVM entrapment efficiency into the microparticles (90.0 – 94.6% w/w) was independent of the polymer composition (PLGA or PLA) and the PLGA end-groups (ester or free-acid) (Table 1). Therefore, the “apolar” backbone of the polymer rather than its end-groups seems to determine the amount of IVM entrapment within the microparticles.

On the other hand, several other factors probably also contributed to this high drug entrapment such as the high lipophilicity of IVM ($\log P = 3.22$) (Loffler and Ternes, 2003) leading to a high affinity to the “apolar” polymer, the very low water solubility of IVM (about 4 µg/mL) and the high solubility of IVM in methylene chloride (about 300 mg/mL) that leads to low diffusivity in water. Thus, during the emulsification process, most of the IVM remains in the organic phase with the polymer until the microparticles have solidified. A small loss of IVM may occur when methylene chloride diffuses towards the external phase. Indeed, other authors have already shown that the solvent evaporation method is the most successful and simplest one for drugs that are insoluble in the aqueous medium where they cannot easily diffuse (McGinity and O'Donnell, 1997; Wischke and Schwendeman, 2008). Furthermore, the use of methylene chloride as a solvent increases drug entrapment because of its low water solubility (1.96%, w/w) (Bodmeier and McGinity, 1988).

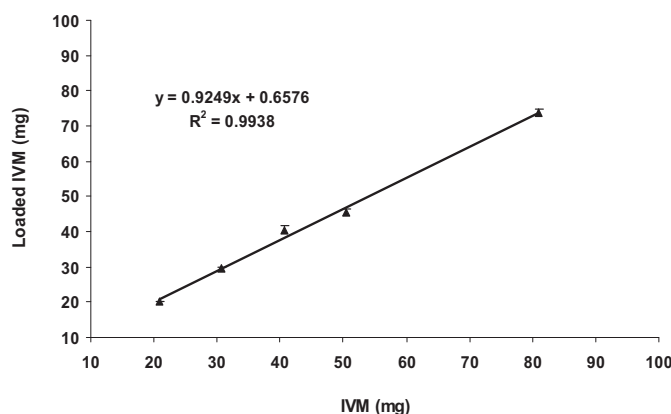


Fig. 2: Amount of IVM loaded into PLGA S microparticles as a function of added drug. Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n=3$)

The addition of PVP (Kollidon 17 PF) to the formulations did not significantly modify the drug entrapment or the size of microparticles. Indeed, the microparticle size ranged between 36.3 – 45.1 μ m (with PVP) and 36.3 – 37.6 μ m (without PVP); with the largest microparticles being obtained with PLGA H/ PVP (Table 1). Although PVP is a highly water- soluble polymer, it is also soluble in several organic solvents such as methylene chloride, ethanol and chloroform. This property might have led to the formation of a three component system (IVM, polymer and PVP) with high affinity of each component for the others, which co-precipitated upon contact with the aqueous external phase and led to microparticle formation after methylene chloride evaporation. It can be assumed that IVM, polymer and PVP interactions would increase as their concentrations in the organic phase increased during the evaporation process. This could explain why there were no significant microparticles size changes, because such a highly cohesive system was formed by the components. This phenomenon may also contribute to the high drug entrapment into the microparticles.

3.2 In-vitro drug release from microparticles

The solubility of IVM in the release medium was found to be 4.94 ± 0.01 mg/mL. Thus, “sink” conditions were respected in the *in-vitro* release tests. As it can be seen in Figure 3, which shows

microparticles without PVP, the release profiles from capped PLGA S and PLA S polymers were almost superposed and characterized by a triphasic pattern. This comprised a very low initial release until 24 hours (4.2 and 4.4%, respectively), followed by a slow drug release until 5 days (18.2 and 15.7%, respectively) and a plateau between 5-10 days where practically no release was observed. Then, over the next 10-15 days, an increase in the drug release was observed, which was greater for PLGA S (47.0%) than for PLA S (28.5%) microparticles. This difference in the release final patterns can be attributed to the different polymer composition. Since PLGA is relatively more “hydrophilic” due to the glycolic residues, a faster degradation rate would be expected. In contrast, PLA degradation is slower because its methyl moiety hinders hydrolytic attack. However, this kind of tri-phasic patterns especially characteristic of PLGA, is often not desirable for therapeutic purposes. For example, as it was explained above, in antiparasitic therapy a sufficiently high drug concentration to kill the target parasite has to be reached and maintained throughout the treatment in order to insure its efficacy. Therefore, a plateau without drug release can lead to the reappearance of the infection in the animals. For these two polymers (PLGA S and PLA S), the *in-vitro* patterns were not statistically different ($P < 0.05$) until day 10. This can probably be explained by the strong polymer-drug interactions and also be due to the fact that IVM is a very lipophilic drug, acting as an impermeabilization agent and hindering water diffusion into the particles. The high drug loading in the microparticles (24%) means this effect would be important. Indeed, it has been observed that high initial drug loading can affect release patterns in a way that depends on the physico-chemical properties of the drugs. In this way, water-soluble drugs can facilitate water diffusion by producing porous systems during the drug leaching. On the other hand, lipophilic drugs can prevent water penetration, thus slowing down polymer degradation (Klose et al., 2008). Furthermore, if there is a strong drug-polymer interaction, this might also have led to slower drug release (Wischke and Schwendeman, 2008). Thus, after day 10, IVM release could be a result of water diffusion and microparticle erosion (depletion).

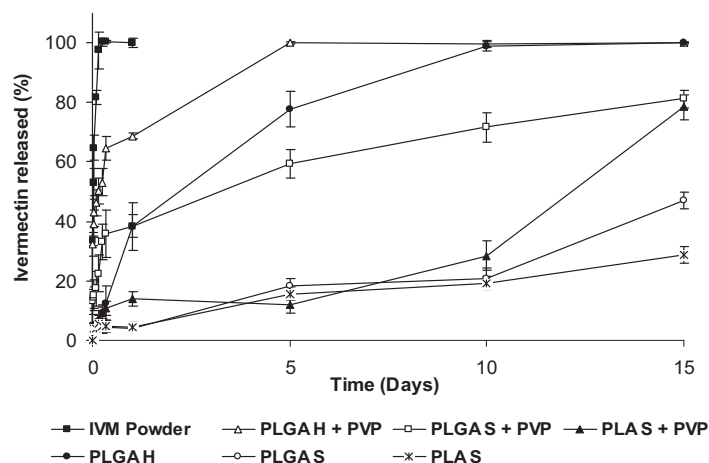


Fig. 3: IVM release profile from PVP-free and PVP-containing microparticles as a function of the polymer composition and end groups. Experiments were performed in phosphate buffer pH 7.4 containing 2% Tween 80. Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n=3$)

In contrast with microparticles made of PLGA S and PLA S, those made with the more hydrophilic uncapped PLGA H showed a biphasic pattern characterized by a higher initial release (first day, 38.0%), followed by a continuous IVM release reaching 77.6% and 98.7% after 5 and 10 days, respectively. This important difference can be explained by the relative hydrophilicity of this polymer as a result of different end-groups. Indeed, water uptake by PLGA H, bearing a terminal carboxyl group, is much greater than that of polymers such as PLGA S and PLA S with a terminal ester group that renders them more hydrophobic. Thus, the higher is the water penetration into the microparticles, the higher the IVM diffusion towards the release medium and the higher the polymer degradation rate. Furthermore, it has been shown that terminal carboxyl groups have a catalytic effect on PLGA hydrolysis, leading to a faster degradation rate (Siepmann et al., 2005; Uhrich et al., 1999).

When 13 % PVP was added to the formulations, a large increase in drug release was observed for all the polymers tested (Figure 3). Moreover, three well-differentiated and statistically different ($P < 0.05$) drug release patterns were obtained for the three different polyesters. At 24 hours, PLGA H

microparticles displayed an almost two-fold higher initial IVM release (68.70 % vs 38.0%) than PVP-free microparticles and 100% release was achieved in only 5 days, which was a significant reduction in the drug release time. This high burst drug release is often undesirable because of possible toxic effects in the patient. Furthermore, if the drug is completely released in only a few hours, no sustained release will take place and the therapy will not be successful (Hasan et al., 2007). In the same manner, PLGA S PVP-containing microparticles showed a different drug release pattern. In this case, a biphasic pattern characterized by a higher burst: 38.4% compared with 4.2% without PVP, followed by a higher and linear continuous IVM release reaching (59.4% compared with 18.2%), (71.5% compared with 20.7%) and (81.1% compared with 47.0%) after 5, 10 and 15, days respectively. Thus, instead of the triphasic pattern observed for microparticles without PVP, the presence of PVP led to a sustained release of IVM. Obviously, this kind of *in-vitro* profile is more likely to be effective in chronic diseases such as parasite infestations because -continuous delivery of drug is provided. A similar increase in the release rate was observed with PLA S PVP-containing microparticles; but in this case a triphasic pattern was still observed but with the plateau in drug release occurring earlier, at 1-5 days instead of at 5-10 days. Furthermore, the third phase of increased drug release was also earlier, between 5-10 days as opposed to 10-15 days when PVP was not added to the formulation. All these changes are in accordance with our initial hypothesis about the role of PVP. Since it is well known that water diffusion into PLGA or PLA-based microparticles is much faster than the subsequent polymer hydrolysis (bulk degradation) (Klose et al., 2008), it is believed that water penetration may increase the rate of polymer degradation. Therefore, PVP, a hydrophilic polymer recognized as a pore-former, is frequently used to improve bioavailability of poorly water-soluble drugs and to counteract the possible negative effect of a high drug loading in the water uptake. Figure 4 A and B shows SEM images of the surface of PVP-free and PVP-containing microparticles. Interesting, the microparticle surface had a characteristic hexagonal pattern (Fig. 4A), which was particularly evident when PVP was not added (Fig. 4B-left). However,

there no reports in the literature of this type surface conformation in PLA or PLGA microparticles. Therefore, this patterning could be the result of a particular organization of the IVM at the microparticle surface. However, this pattern disappeared (Fig. 4B-right) and a porous surface was obtained when more hydrophilic microparticles was made by addition of PVP. Additional observations of broken microparticles showed a porous internal structure (image not shown) indicating that the “nanoscopic holes” present in the microparticle surface (Fig 4B-right) could have extended toward the interior of the particles, thus facilitating drug release. This porous structure could be attributed to faster polymer precipitation during the preparation process due to the higher water solubility in the organic phase. The solubility of water in methylene chloride has been found to be only 0.2%, w/w (Wischke and Schwendeman, 2008). However, the presence of the hydrophilic PVP within the polymeric phase might lead to faster water influx into the polymer solution leading to faster polymer precipitation and more a porous microstructure. Clearly, the increased porosity would lead to increased water penetration into the microparticles during *in-vitro* drug release experiments, facilitating polymer degradation and subsequent diffusion of IVM into the release medium. Thus, release rate of IVM from microparticles depended on the porosity, polymer degradation rate, polymer composition and the nature of the end-groups. Thus, the release rate for IVM increased with the relative hydrophilicity of the polymer (i.e. PLGA H > PLGA S > PLA S) and with the microparticle porosity (with PVP > without PVP). Therefore, water diffusion into the microparticles was shown to be an accelerating factor for drug release. Other substances such as medium chain triglycerides (MCT) (Luan and Bodmeier, 2006), D-mannitol, bovine serum albumin (BSA) and polyethylene glycol (PEG) (Kim et al., 2000) are all recognized as having pore-forming properties and are therefore able to increase drug release.

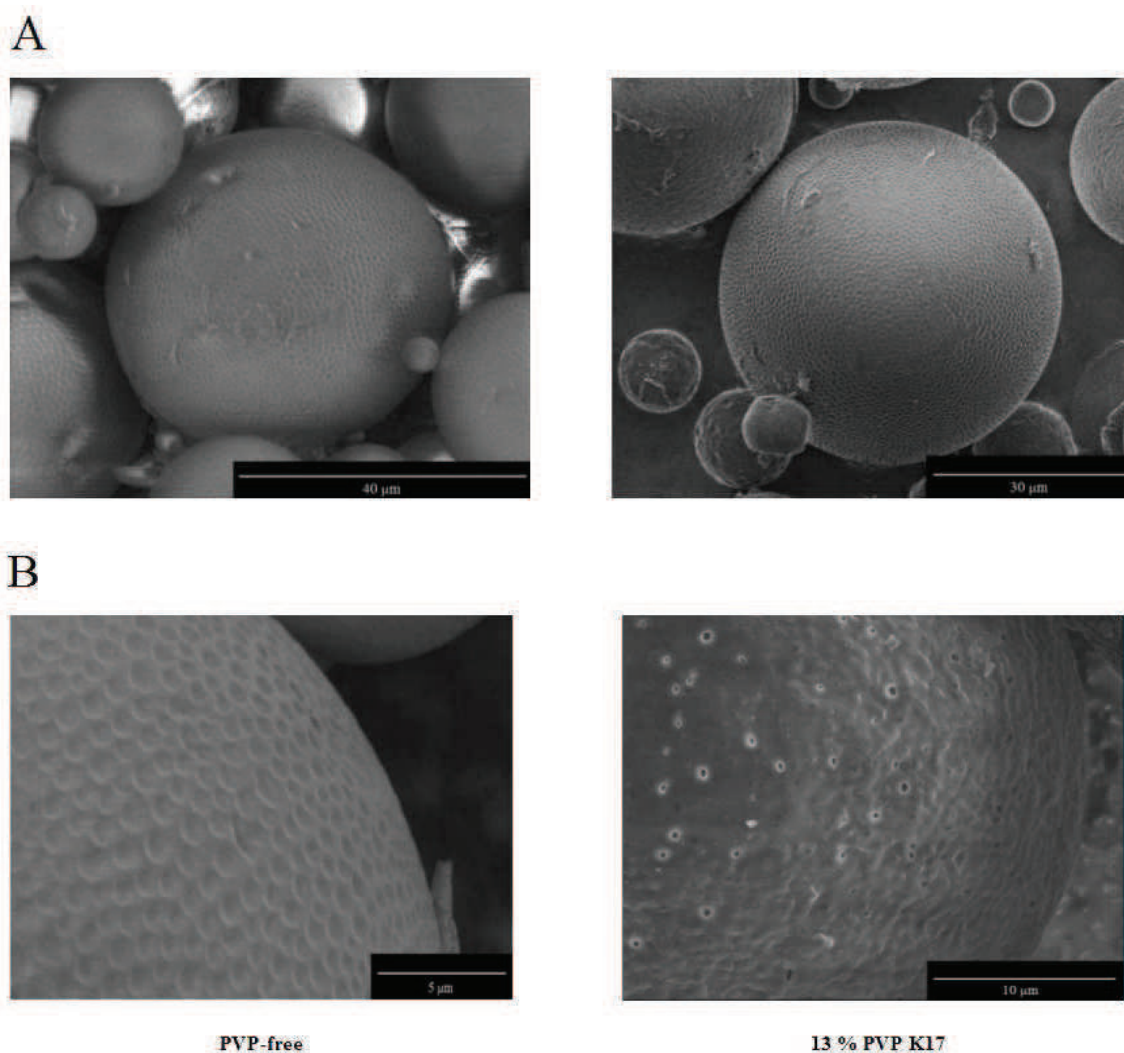


Fig. 4: Scanning electron micrographs of microparticles without and with 13% PVP K17 (A) and porous surface of PVP-containing microparticles (B).

As well as forming pores, PVP increases the hydrophilicity of the microparticles, leading to their better wettability when in contact with aqueous medium. In fact, PVP has often been used to increase the bioavailability of poorly water-soluble drugs due to its ability to form water-soluble drug-PVP complexes (solid solutions or dispersions) (Kubin et al., 2008; Palmieri et al., 2002). Thus, if such an IVM-PVP complex had been formed during polymer precipitation, it could have had higher water solubility leading to higher rate of IVM dissolution and release from microparticles. The analysis of the physical state of the drug within the microparticles by XRD and

DSC (Figure 5; A-E and section 3.3, below) confirms the hypothesis of a complex between IVM and PVP.

3.3 Physical state of the drug in the microparticles

In order to evaluate the physical state of the IVM in microparticles and its potential interactions with the additives, XRD and DSC studies were carried out on both PVP-containing and PVP-free microparticles. These two techniques are frequently used in to determine the physical properties of solids since they provide useful information about the degree of crystallinity (XRD, DSC) and structural relaxation properties such as T_g (DSC) (Yu, 2001).

Figure 5 shows thermograms of co-precipitates of IVM with different proportions of PVP, without any polymer. When IVM and PVP were dissolved in methylene chloride at ratios between 3:0 - 3:1 (A-C) followed by solvent elimination, an endothermic peak for IVM was always observed from the resulting powder. The intensity of the peak decreased as the PVP content increased. However, at an IVM: PVP ratio of 3:1.5, which is the same ratio as that in the formulations, the IVM peak disappeared and only the PVP T_g transition event was observed (D). In contrast, when IVM and PVP were simply physically mixed at the same ratio (3:1.5), the IVM fusion peak was still observed in the thermogram (E). This result clearly demonstrates a solvent-mediated effect on IVM-PVP interaction during microparticle manufacture. This allows us to conclude that in the PVP-containing formulations, a PVP-drug complex was formed and that this could also be responsible for higher solubility of IVM in aqueous medium and thereby accelerate release from PLGA and PLA microparticles.

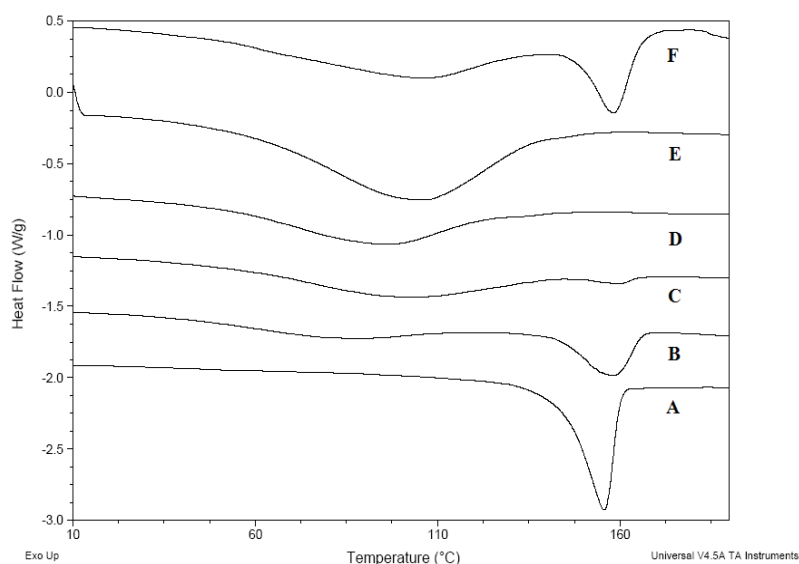


Fig. 5. DSC thermograms of different IVM:PVP (Kollidon® 17PF) co-precipitates obtained from methylene chloride (A) Pure IVM, (B) 3: 0.5, (C) 3: 1, (D) 3: 1.5, (E) Kollidon® 17PF and (F) 3:1.5 physical mixture

Figure 6 shows the diffraction pattern for pure IVM (A). The 2-Theta diffraction peaks indicate the crystalline state of the drug. On the other hand, the absence of diffraction peaks in the spectrum of PVP K-17 indicates its amorphous state (B). PLGA S PVP-free microparticles without IVM showed a characteristic pattern with no diffraction peaks indicating the amorphous state of PLGA S (C). This result demonstrates that no modification in the crystallinity of the polymer was induced by its precipitation during the manufacturing process. Indeed, similar diffractograms were observed when PLGA H and PLA S were used alone (data not shown). Finally, the diffractograms of IVM-loaded PVP-free (D) and PVP-containing (E) PLGA S microparticles also showed patterns characterized by the absence of diffraction peaks. This indicates that the encapsulated IVM was always present in an amorphous state or in the form of a solid solution with the polymer alone or mixed with PVP. Since very small crystals may not be detected by XRD (Yu, 2001), these observations were confirmed by DSC. Table 2 summarizes the thermal properties of the samples.

Table 2: Thermal properties of drug, polymers and microparticles obtained by DSC. The T_g values were recorded during the second heating cycle.

Sample	Pure materials	IVM Microparticles	
		PVP-free	PVP-containing
IVM	T_m : 159.1 °C	N.D	N.D
PVP 17PF	T_g : 139.6 °C	N.D	N.D
PLGA H	T_g : 43.3 °C	T_g : 42.6 °C	T_g : 48.9 °C T_g : 128.6 °C
PLGA S	T_g : 35.5 °C	T_g : 44.2 °C	T_g : 45.1 °C T_g : 139.3 °C
PLA S	T_g : 47.9 °C	T_g : 52.8 °C	T_g : 52.1 °C T_g : 130.0 °C

The thermogram of IVM powder showed a sharp endothermal peak at 159.1 °C, corresponding to its melting point (T_m) and confirming that the drug was in a crystalline state. In contrast, the thermograms of PLGA H, PLGA S, PLA S and PVP K17 showed a transition event (T_g) at 43.3°C, 35.5°C, 47.9°C and 139.6°C respectively, indicating their amorphous states (Hausberger and DeLuca, 1995). When IVM was incorporated into PVP-free or PVP-containing microparticles, the endothermal peak corresponding to IVM disappeared completely and only T_g values from polymer and PVP (when added) were observed. In general, polymer and PVP T_g values did not change significantly after microparticle manufacture. The absence of the melting peak of the drug in the microparticle thermograms has been frequently interpreted as the drug being either dissolved or molecularly dispersed within the polymer matrix (Benoit et al., 1986; Panyam et al., 2004). Despite the observation that polymer in a rubbery state might dissolve dispersed crystals of drug and mask possible fusion peaks (Bodmeier and Chen, 1989), our SEM and XRD analysis did not show any evidence of a crystalline state in the formulations. Finally, although PVP did not change the amorphous state of IVM in the microparticles, it led to more porous and possibly more hydrophilic structures, increasing the rate of drug release.

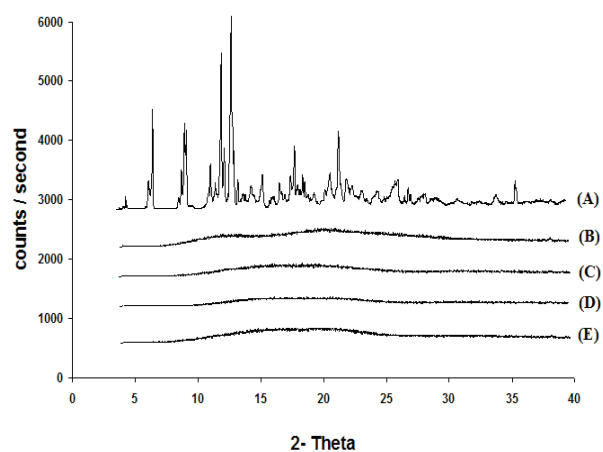


Fig. 6: X-ray diffractograms of ivermectin powder (A), PVP K17 (B), unloaded PVP-free PLGA S microparticles (C), IVM loaded PVP-free PLGA S microparticles (D) and IVM loaded PVP-containing PLGA S microparticles (E).

4. Conclusions

Several different sustained release patterns for IVM were obtained from microparticles prepared from polymers with different compositions. However, the release of IVM was also dependent on the water penetration process. Thus, increasing microparticle permeability by addition of PVP, led to drug release that was controlled by the nature of the polymer and its end groups. Therefore, IVM release from PLGA and PLA microparticles can be modulated both by modifying the water influx into microparticles and by the polymer properties. This work is an important starting point for obtaining appropriate sustained release formulations of IVM for veterinary applications.

5. References

- Bassissi, F., Lespine, A., Alvinerie, M., 2006. Assessment of a liposomal formulation of ivermectin in rabbit after a single subcutaneous administration. *Parasitol Res* 98, 244-249.
- Benoit, J. P., Courteille, F., Thies, C., 1986. A physicochemical study of the morphology of progesterone-loaded poly (D,L-lactide) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 29, 95-102.
- Bodmeier, R., Chen, H., 1989. Preparation and characterization of microspheres containing the anti-inflammatory agents, indomethacin, ibuprofen, and ketoprofen. *Journal of Controlled Release* 10, 167-175.
- Bodmeier, R., McGinity, J. W., 1988. Solvent selection in the preparation of poly(DL-Lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *International Journal of Pharmaceutics* 43, 179-186.
- Brannon-Peppas, L., 1995. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 116, 1-9.
- Chhabra, S., Sachdeva, V., Singh, S., 2007. Influence of end groups on in vitro release and biological activity of lysozyme from a phase-sensitive smart polymer-based in situ gel forming controlled release drug delivery system. *Int J Pharm* 342, 72-77.
- Clark, S. L., Crowley, A. J., Schmidt, P. G., Donoghue, A. R., Piche, C. A., 2004. Long-term delivery of ivermectin by use of poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid microparticles in dogs. *Am J Vet Res* 65, 752-757.
- Dunne, M., Corrigan, I., Ramtoola, Z., 2000. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials* 21, 1659-1668.
- Frank, A., Rath, S. K., Venkatraman, S. S., 2005. Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition. *J Control Release* 102, 333-344.

- Freiberg, S., Zhu, X. X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* 282, 1-18.
- Gokbulut, C., Karademir, U., Boyacioglu, M., McKellar, Q. A., 2006. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. *Veterinary Parasitology* 135, 347-354.
- Gonzalez Canga, A., Sahagun Prieto, A. M., Jose Diez Liebana, M., Martinez, N. F., Vega, M. S., Vieitez, J. J., 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *Vet J* 179, 25-37.
- Hasan, A. S., Socha, M., Lamprecht, A., Ghazouani, F. E., Sapin, A., Hoffman, M., Maincent, P., Ubrich, N., 2007. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *International Journal of Pharmaceutics* 344, 53-61.
- Hausberger, A. G., DeLuca, P. P., 1995. Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. *J Pharm Biomed Anal* 13, 747-760.
- Hennessy, D. R., 1997. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Vet Parasitol* 72, 367-382; discussion 382-390.
- Herrmann, J., Bodmeier, R., 1995. The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly(lactide) microspheres prepared by a W/O/W solvent evaporation method. *Journal of Controlled Release* 36, 63-71.
- Jaraswekin, S., Prakongpan, S., Bodmeier, R., 2007. Effect of poly(lactide-co-glycolide) molecular weight on the release of dexamethasone sodium phosphate from microparticles. *J Microencapsul* 24, 117-128.
- Kim, J. E., Kim, S. R., Lee, S. H., Lee, C. H., Kim, D. D., 2000. The effect of pore formers on the controlled release of cefadroxil from a polyurethane matrix. *Int J Pharm* 201, 29-36.
- Klose, D., Siepmann, F., Elkharraz, K., Krenzlin, S., Siepmann, J., 2006. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *Int J Pharm* 314, 198-206.

- Klose, D., Siepmann, F., Elkharraz, K., Siepmann, J., 2008. PLGA-based drug delivery systems: importance of the type of drug and device geometry. *Int J Pharm* 354, 95-103.
- Kubin, A., Loew, H. G., Burner, U., Jessner, G., Kolbabeck, H., Wierrani, F., 2008. How to make hypericin water-soluble. *Pharmazie* 63, 263-269.
- Liu, J., Chang, Z., Sun, X., Shen, S., Lei, C., Liu, H., 2006. Impurity effects on the crystallization of avermectin B1a. *Journal of Crystal Growth* 291, 448-454.
- Loffler, D., Ternes, T. A., 2003. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1021, 133-144.
- Luan, X., Bodmeier, R., 2006. Modification of the tri-phasic drug release pattern of leuprolide acetate-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 63, 205-214.
- McGinity, J. W., O'Donnell, P. B., 1997. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev* 28, 25-42.
- Miller, J. A., Davey, R. B., Oehler, D. D., Pound, J. M., George, J. E., Ahrens, E. H., 1999. Control of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae) on cattle using injectable microspheres containing ivermectin. *J Econ Entomol* 92, 1142-1146.
- Miller, J. A., Oehler, D. D., Pound, J. M., 1998. Delivery of ivermectin by injectable microspheres. *J Econ Entomol* 91, 655-659.
- Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P., Aminabhavi, T. M., 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release* 125, 193-209.
- Omura, S., 2008. Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int J Antimicrob Agents* 31, 91-98.
- Palmieri, G. F., Cantalamessa, F., Di Martino, P., Nasuti, C., Martelli, S., 2002. Lonidamine solid dispersions: In vitro and in vivo evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28, 1241-1250.

- Panyam, J., Williams, D., Dash, A., Leslie-Pelecky, D., Labhasetwar, V., 2004. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *J Pharm Sci* 93, 1804-1814.
- Shive, M. S., Anderson, J. M., 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 28, 5-24.
- Siepmann, J., Elkharraz, K., Siepmann, F., Klose, D., 2005. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: A quantitative treatment. *Biomacromolecules* 6, 2312-2319.
- Sun, Y., Scruggs, D. W., Peng, Y., Johnson, J. R., Shukla, A. J., 2004. Issues and challenges in developing long-acting veterinary antibiotic formulations. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1481-1496.
- Takano, R., Sugano, K., Higashida, A., Hayashi, Y., Machida, M., Aso, Y., Yamashita, S., 2006. Oral absorption of poorly water-soluble drugs: computer simulation of fraction absorbed in humans from a miniscale dissolution test. *Pharm Res* 23, 1144-1156.
- Tracy, M. A., Ward, K. L., Firouzabadian, L., Wang, Y., Dong, N., Qian, R., Zhang, Y., 1999. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. *Biomaterials* 20, 1057-1062.
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., Shakesheff, K. M., 1999. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev* 99, 3181-3198.
- Winzenburg, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Kissel, T., 2004. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1453-1466.
- Wischke, C., Schwendeman, S. P., 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm* 364, 298-327.
- Yu, L., 2001. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Adv Drug Deliv Rev* 48, 27-42.

3.3 Implants injectables de formation *in situ* à base de PLA pour la libération contrôlée d'un principe actif BCS classe II: sélection du solvant à partir d'une caractérisation physico-chimique.

RESUME

Des implants de formation *in situ* (ISI) réalisés à partir de polymères biodégradables tels que le poly(D,L-lactique) (PLA) et de solvants biocompatibles, sont utilisés pour l'obtention de formulations pour la libération prolongée de principes actifs. L'objectif de ce travail a été d'étudier l'effet de solvants biocompatibles, différents de part leurs propriétés physico-chimiques, sur la libération d'ivermectine (IVM), un principe actif antiparasitaire (classé BCS II), à partir d'implants *in situ* de PLA. Les solvants évalués ont été la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP), la 2-pyrrolidone (2P), la triacétine (TA) et le benzoate de benzyle (BB). Les paramètres de solubilité d'Hansen des solvants ont été utilisés pour expliquer les interactions polymère/solvant conduisant à des comportements rhéologiques différents. La stabilité du polymère et du principe actif dans les solvants ont été respectivement évaluées par chromatographie d'exclusion par taille et chromatographie liquide d'haute performance. Les deux facteurs principaux qui ont influencé la vitesse de libération de l'IVM ont été la solubilité du solvant dans l'eau et la viscosité des solutions polymériques. De façon générale, la vitesse de libération de l'IVM diminuait lorsque la solubilité du solvant dans l'eau augmentait et la viscosité diminuait selon l'ordre suivant NMP>2P>TA>BB. La microscopie électronique a permis d'observer une relation entre la vitesse de libération de l'IVM et la porosité des implants. La libération était plus élevée lorsque la porosité des implants augmentait. Enfin, la stabilité du principe actif et du polymère dans les solvants a subi le même comportement général, augmentant lorsque les affinités entre le polymère et le solvant diminuaient et lorsque la teneur en eau des solvants était plus faible.

Mots-clés: Ivermectine, libération prolongée, implants de formation *in situ*, biocompatible, PLA

À soumettre

Injectable PLA-based in situ forming implants for control release of a BCS class

II drug: solvent selection from a physico-chemical characterization

J.A. Camargo¹, A. Sapin¹, C. Nouvel², D. Daloz³, M. Leonard², J.-L. Six², P. Maincent¹

¹ *Nancy University, EA 3452, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Pharmaceutical Technology, 5, rue A. Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France*

² *Nancy University, ENSIC Group, Laboratory of Physical Chemistry of Macromolecules (LCPM), UMR CNRS-INPL 7568, 1 rue Grandville, 54000 Nancy, France*

³ *Nancy University, School of Mines, Institut Jean-Lamour (SI2M), UMR 7198 CNRS-Nancy, Parc de Saurupt CS 14 234, 54042 Nancy Cedex, France*

* Correspondence:

Professor Philippe Maincent

Faculty of Pharmacy

Nancy University

5 rue Albert Lebrun

54000 Nancy, France

Phone: + 33 (3) 83 68 22 97

Fax: + 33 (3) 83 69 23 01

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

Abstract

In situ forming implants (ISI) prepared from biodegradable polymers like poly(DL-lactide) (PLA) and biocompatible solvents, are used to obtain sustained drug release formulations for parenteral administration. The aim of this work was to study the effect of several biocompatible solvents with different physico-chemical properties, on the release of ivermectin (IVM), an antiparasitic BCS II drug, from in situ forming PLA-based implants. Evaluated solvents were N-methyl-2-pyrrolidone (NMP), 2-pyrrolidone (2P), triacetine (TA) and benzyl benzoate (BB). The Hansen's solubility parameters of solvents were used to explain polymer/solvent interactions leading to different rheological behaviours. The stability of the polymer and drug in the solvents were also evaluated by size exclusion and high liquid performance chromatography, respectively. The two major factors determining the rate of IVM release from ISI were water solvent solubility and viscosity of the polymeric solutions. In general, it increased with increasing water solvent solubility and decreasing viscosity according to the following order NMP>2P>TA>BB. The scanning electron microscopy led to observe a relationship between the rate of IVM release and the surface porosity of implants, being higher as implants porosity increased. Finally, drug and polymer stability in solvents followed the same general behaviour, increasing as much as polymer-solvent affinities and water content in solvents decreased. IVM degradation was accelerated by the polymer but the drug did not affect PLA stability.

Keywords: Ivermectin, sustained release, *in situ* forming implants, biocompatible, PLA

1. Introduction

The in situ forming implants (ISI) based on polymer precipitation, conceived originally by (Dunn et al., 1990), appeared as an interesting alternative to overcome the disadvantages of the conventional methods to prepare pre-formed implantable microparticles used to obtain drug sustained release. Among these disadvantages are complicated manufacturing processes, toxicity of the solvents, difficult scale-up and irreproducible product (Hatefi and Amsden, 2002; Jain, 2000; Shah et al., 1993). On the contrary, ISI consist simply of a water insoluble biodegradable polymer dissolved in a biocompatible organic solvent where the drug is dissolved or dispersed, thus making its fabrication easier. Upon injection of the polymeric solutions into the body, the organic solvent diffuses toward the surrounding aqueous environment as a function of its water solubility and water penetrates into the polymer solution. This water induced phase separation process lead to polymer precipitation and therefore an implant is formed in situ entrapping the drug. Thus, during implant formation, the drug release is controlled by the properties and interactions between polymer, solvent, and drug used (Deadman et al., 2007; Ravivarapu et al., 2000). Nevertheless, solvent selection is one of the most important factors to take into account since drug release, injectability and stability of drug and polymer are basically determined for it (Wang et al., 2003). Therefore, several organic solvents such as N-methyl-2-pyrrolidone (NMP), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2-pyrrolidone (2P), triacetine (TA) and benzyl benzoate (BB) have been used in an attempt to minimize the burst (fast initial release) of drugs. Two of the principal developed platforms that use solvents with different physico-chemical properties are i) Atrigel™ (Atrix Laboratories) that consists in poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) dissolved in N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) which is a very water soluble solvent (Packhaeuser et al., 2004; Ravivarapu et al., 2000) and ii) the Alzamer® depot (Alza corporation) consisting in PLGA in the low water soluble solvent benzyl benzoate (BB) (Rathbone et al., 2008). Hence, since solvents in these systems have different water solubilities, it leads to different dynamics of phase inversion and of course to different drug release

patterns. Thus, solvent selection appears as a different way to modulate drug release rather than increasing or decreasing the polymer concentration. On the other hand, solvent selection could be also a strategy to overcome degradation issues of polymer or drug in solvents, avoiding other more expensive or complex solutions such as the preparation of the product in two-parts (syringes) to protect drug or polymer from the contact with the solvent (Ravivarapu et al., 2000) or the addition of additives to the formulations.

An interesting drug to be formulated in ISI to sustain release is the antiparasitic Class II in the biopharmaceutic classification system (BCS) (Takano et al., 2006), ivermectin (IVM). First, because of the human or animal parasitic infestations that must be treated for a long time (several months) which needs drug delivery systems avoiding repeated and indiscriminate administration that might lead to efficacy loss in the therapy. In addition, because of low drug oral bioavailability (Takano et al., 2006), binding to organic material in the intestine (Gokbulut et al., 2006) and secretion by the P-glycoprotein present in the intestinal epithelium (Gonzalez Canga et al., 2009), the oral administration of ivermectine is a challenge.

The objective of this study was to investigate the effect of using biocompatible solvents with different physico-chemical properties on the release of IVM, from PLA-based ISI. In addition, the stability of the drug and PLA in the selected solvents was also investigated. PLA was selected as a polymer, because of its excellent biocompatibility, biodegradability and due to the fact that it is approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) for parenteral drug delivery (Anderson and Shive, 1997; Jain, 2000; Legrand et al., 2007; Matschke et al., 2002)

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The following chemicals were used as received: Poly (DL-lactide) (PLA; Resomer[®] R 203 S, end-capped, iv 0.31 dL/g) (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany), N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) (VWR Prolabo, Fontenay Sous Bois, France), glycerol triacetate 99% (Triacetine) (TA), 2-pyrrolidone 99% (2P), benzyl benzoate (BB) (Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, Germany), ivermectin, sodium dodecyl sulphate (SDS), tetrahydrofurane (THF) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), acetonitrile (Carlo Erba-SDS, Val de Reuil, France). Deionized water was obtained using an ELGA system (PURELAB[™] Option, Le Plessis Robinson, France).

2.2 Methods

2.2.1 Ivermectin's solubility in solvents

In order to know the IVM solubility in the biocompatible solvents 2P, NMP, TA and BB, an excess amount of ivermectin was placed in 2 mL of each solvent and then the samples were shaken for 48 hours at 25 °C in a horizontal magnetic stirrer Variomag[®] (Poly 15, VWR Prolabo, Fontenay Sous Bois, France) ($n=3$). The resulting suspension was centrifuged at 15000 g for 20 minutes at 25°C (Biofuge Statos, Prolabo, Nogent sur Marne, France) and the supernatant filtered through 0.2 μ m nitrocellulose filters. The concentration of the IVM in the filtrated solutions was determined by using the modified method of phase reverse high performance liquid chromatography (RP-HPLC) developed by (Liu et al., 2006). Thus, 80 μ L of the filtered solution were injected in a liquid chromatograph SCL-10A VP (Shimadzu Croissy Beabourg, France). The analysis was performed at 243 nm using a C₁₈ Uptisphere[®] column (120 Å, ODB-C₁₈, 5 μ m; 3 x 150 mm, Interchim, Montluçon, France), mobile phase was acetonitrile : water (75 : 25, v/v), flow rate 1.0 mL/min, temperature 35 °C ($n=3$). The method was linear between 0.3 to 100 μ g/mL ($R^2 > 0.99$) and this is a stability indicating HPLC assay.

2.2.2 Preparation of drug-containing polymeric solutions

Thirty percent PLA solution (w/w, based on the amount of solvent and polymer) were prepared by dissolving 1.80 g of PLA in 4.20 g of solvent (2P, NMP, NMP:TA (50:50, v/v), TA or BB) at 50 ± 5 °C under continuous stirring until complete polymer solubilization. Then, solutions were cooled to room temperature and the drug (3.9 mg) was added and solubilized by gentle agitation. The IVM concentration in polymeric solutions was determined by RP-HPLC as described previously ($n=3$) (section 2.2.1).

2.2.3 Drug stability in the solutions

Approximately 2 g of polymer-free or polymer-containing IVM solutions in the different biocompatible solvents (2P, NMP, NMP:TA (50:50), TA or BB), were placed in glass vials, sealed and kept at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ during three months in order to evaluate the IVM stability. Every month, samples from each vial were taken and assayed by RP-HPLC to determine IVM content ($n=3$).

2.2.4 Viscosity measurements

The viscosities of diluted PLA solutions (0.1-6.0 g/dL) in NMP, 2P, TA and BB were obtained at 37°C by using a capillary viscometer Viscologic[®] TI-1 (SemaTech, Chemin de Terron, France) equipped with an Ostwald biology cell (0,46 mm) ($n=5$). The relative viscosity was calculated as $\eta_{\text{rel}} = \eta/\eta_0 = t_{\text{corrected}}/t_{0\text{corrected}}$ where η and η_0 the viscosities of the polymer solutions and the solvents and t and t_0 the corrected flow times of the polymer solutions and the solvents. The intrinsic viscosities $[\eta]$ of the previous solutions were obtained from the intercept of the curves η_{sp} / C versus polymer concentration according to the linear Huggins relation (Huggins, 1942) (Eq. 1).

$$\eta_{\text{sp}} / C = [\eta] + k' [\eta]^2 C \quad (1)$$

where $[\eta]$ and k' are the intrinsic viscosity and the interaction constant, respectively. $[\eta]$ was obtained by extrapolating the η_{sp} / C value to zero concentration. The viscosities of the concentrated solutions of PLA (30% w/w) were obtained by using an Advanced Rheometer[®] AR 2000 (TA Instruments, Guyancourt, France) was used. The measures were performed in triplicate at $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ using a plate/cone (40 mm diameter, 2° θ) system.

2.2.5 Polymer stability in the solutions by size exclusion chromatography (SEC)

Approximately 2 g of IVM-free or IVM-containing polymer in solvent solutions (section 2.2.2 and 2.2.3) were stocked at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ over 3 months in order to verify the polymer stability. At the beginning and at the end of the experiments, samples of each solution were taken and the average molecular weight (M_w) of the polymer was evaluated by size exclusion chromatography (SEC) to verify any possible degradation. For the SEC analysis, solutions at 10 g / L in polymer from each sample were prepared in THF. Then, 100 μL of the filtered solution were injected in a SEC apparatus Merck-Hitachi equipped with a pump L-6200A (Merck-Hitachi, Nogent sur Marne, France). The analysis was realized by using a 2x PLgel[™] 5 μm Mixed-D column (100 Å, polystyrene/divinylbenzene, 5 μm ; 300 x 7.5 mm, Polymer Laboratories, Les Ulis, France), mobile phase THF (100%), flow rate 0.7 mL/min and column temperature 25°C . Detection was performed with a multi-angle laser light scattering (MALLS) detector miniDAWN[™] (Wyatt Technology Corporation, Toulouse, France) at a laser wavelength of 690 nm and with a differential refractive index detector (RID) Watters 410 (Millipore, Milford, USA).

2.2.6 Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was carried out using a scanning electron microscope Philips XL 30S FEG (FEI Company, Lyon, France) operating between 1.5 – 4.5 kV under nitrogen atmosphere to observe the surface structure of the dry implants.

2.2.7 *In vitro* drug release studies

In vitro release studies were carried out by injecting approximately 250 mg of the polymer-free or polymer-containing IVM solutions, into sealed test tubes filled with 5 mL water containing 0.25 % SDS, by using a 1 mL syringe with a 21G needle. The systems were incubated during 96 h (polymer-free) or 30 days (polymer-containing), at 37 °C in an incubation shaker Memmert® (Fischer Scientific, Illkirch, France) operated at 75 rpm. During the first 96 hours (polymer-free), 1.5 mL samples were withdrawn at pre-determined time intervals, filtered through 0.45 µm nitrocellulose membranes and assayed by RP-HPLC at 243 nm (section 2.2.1). As after this time IVM was not stable, the complete medium was withdrawn and replaced by a fresh one at each sampling points. Then, the amount of IVM remaining in the implants (IVM not released) was determined by dissolving the recovered implants in acetonitrile and measuring the IVM concentration in the solutions by RP-HPLC analysis (section 2.2.1).

2.2.8 *Statistical analysis*

The results were expressed as mean values $\pm$ S.D. A pairwise comparison by the Mann–Whitney test was used to determine the statistical significance of the differences. In all cases, $P < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results and discussion

3.1 Drug/polymer behaviour in studied solvents

Several types of biocompatible solvents have been used to prepare in situ implants (ISI) from PLGA and PLA polymers (Brodbeck et al., 1999; Graham et al., 1999; Kranz and Bodmeier, 2008; Shively et al., 1995). In this study, the selected solvents were N-methyl-2-pyrrolidone (NMP), 2-pyrrolidone (2P), triacetine (TA) and benzyl benzoate (BB) which have different physico-chemical properties such as viscosity, water solubility and partition coefficient (Table 1). In addition, they are considered as relatively safe to be used as excipients in human or veterinary parenteral products (Dong et al., 2006; Kranz et al., 2001; Royals et al., 1999).

Table 1: Some physico-chemical properties of biocompatible solvents

Solvent	Viscosity 20 °C (mPa.s)*	Water solubility (mg/mL)	Log <i>P</i>	IVM solubility (mg/mL)	PLA solubility
N-methyl-2-pyrrolidone	1.89 ± 0.15	1000	- 0.46	> 500	+++
2-pyrrolidone	14.66 ± 0.13	1000	- 0.71	> 500	++
Triacetine	19.70 ± 0.54	64	+ 0.25	75	+
Benzyl benzoate	8.67 ± 0.30	Insoluble	+ 3.97	83	+

* From (Rungseevijitprapa and Bodmeier, 2009)

As it can be observed in table 1, IVM solubility was higher in the more water soluble solvents like NMP and 2P than in less water soluble solvents, TA and BB. It was an interesting result, because the usual rule “like dissolves like” could not be applied to IVM, a lipophilic drug (Log *P* = +3.22) (Loffler and Ternes, 2003). In practice, IVM and polymer solutions in solvents were prepared faster with NMP and 2P than TA and BB (Fig.1). The larger time (45 min) taken by TA to completely dissolve the drug might be due to its very high viscosity.

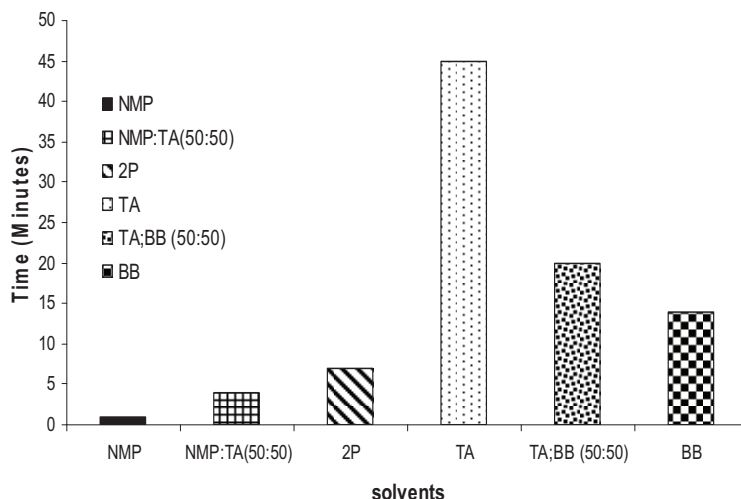


Fig. 1: Time required for complete IVM solubilization in several solvents.

Polymer solubility in solvents followed the same solubility pattern than the drug. Nevertheless, some specific interactions may play an important role in this behaviour. Thus, Hildebrand's one-component solubility parameter (δ) (Eq. 2) has been used to predict polymer solubility in different solvents. This parameter relates the energy of vaporization (cohesive energy density) of a liquid with its capacity to dissolve a solute.

$$\delta = (E/V)^{1/2} \quad (2)$$

where, E is the energy of solvent evaporation and V the molar volume of the pure solvent. Table 2 shows the Hildebrand's parameter for some solvents. Thus, (Lambert and Peck, 1995; Shively et al., 1995) determined that solvents with δ between 9-10 or 9-12.3 cal/cm³, led to maximal solubility of PLA. However, this result does not explain why a solvent like 2-pyrrolidone ($\delta=14.7$) was able to dissolve the polymer better than TA ($\delta=11.6$).

Table 2: Hildebrand's and Hansen's parameters of the tested solvents

Solvent	V (cm ³ / mol) ^b	Hildebrand (cal / cm ³) ^{1/2}	Hansen's solubility parameters (MPa ^{1/2}) ^b			$\Delta\delta$ Solvent / PLA (MPa ^{1/2})
		δ	δ_d	δ_p	δ_h	
N-methyl-2-pyrrolidone	96.5	11.3	18.0	12.3	7.2	5.2
2-pyrrolidone	76.4	14.7	19.4	17.4	11.3	7.9
Triacetin	188.2	11.6	16.5	4.5	9.1	5.9
Benzyl benzoate	191.2	8.2 ^a	20.0	5.1	5.2	8.3
PLA ^c	N.D	11.4	17.6	9.7	11.7	0
Water	18.0	23.4	15.5	16.0	42.3	31.3

^a Obtained mathematically from $\delta = (E/V)^{1/2}$ using $\Delta H_{vap} = 12.8$ Kcal/mol (Hon et al., 1976)

^b From (Hansen, 2007)

^c From (Legrand et al., 2007)

In order to understand better the polymer or drug / solvent interactions, the Hansen's multicomponent solubility parameters (HSP) (Hansen, 1967) were used. These most detailed parameters predict the solubility of substances by dividing the total solubility parameter (energy of vaporization-Hildebrand), δ , into contributions from non-polar (atomic) dispersions interactions, δ_d , permanent dipole-permanent dipole (molecular) interactions, δ_p , and hydrogen (molecular) bonding δ_H (Eq.3);

$$\delta = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (3)$$

Since materials with similar HSP have high affinity for each other, a stronger interaction of drug and polymer toward solvents with a greater solubility could be assumed. Thus, the comparison $\Delta\delta$ (Eq.4) between solvent and solute (polymer or drug) is often used to evaluate their affinity level.

$$\Delta\delta = [(\delta_s - \delta_p)_d^2 + (\delta_s - \delta_p)_p^2 + (\delta_s - \delta_p)_h^2]^{1/2} \quad (4)$$

where δ_s and δ_p are the partial solubility parameters of solvent and polymer respectively. Normally, the lower $\Delta\delta$, the higher is the affinity and the solubilization. Table 2 showed that polymer/solvent affinity increased in the following order NMP>TA>2P>BB. This result could not explain the greater solubility of polymer or IVM in 2P than TA. Therefore, the mentioned ranking must be taken with care from a practical point of view. For example, TA polymeric solutions were more difficult to prepare than 2P ones, despite these results showing that the first has a higher affinity for PLA than the second one. Indeed, there is also other solvent parameters playing an important role in the solvent/solute interactions, as for instance the molar volume of the solvent (V_m). In fact, it has already been observed that smaller molar volumes solvents are better and more aggressive from a thermodynamic point of view, i.e. penetrating more rapidly in the polymers chains than those with larger molar volumes even though they have identical HSP. So, molar volume can be an important fourth parameter in affinity correlations (Hansen, 2007). It could explain better why smaller molecular volume solvents like NMP (96.5) and 2P (76.4) dissolved better drug and polymer whereas the larger ones, TA (188.2) and BB (191.2), dissolved them slower and in less quantity. In addition, since PLA contains a methyl group, this might have hindered the polymer's solvation by solvents having larger and bulky molar volumes like TA and BB. Taking into account this analysis the most appropriated affinity ranking is NMP>2P>TA>BB.

3.2 Drug and polymer stability studies

In order to know more about polymer and drug/solvent interactions, stability studies were carried out. Thus, as it can be seen in Figure 2, drug stability showed a similar behaviour in polymer-free or polymer-containing solvent solutions. As expected, the IVM stability in solvents and polymeric solutions decreased with increasing storage temperature because the catalytic effect. It decreased in the following order: TA>BB>NMP>2P. Indeed, 2P and NMP have been described as solvents degrading faster leuprolide acetate, a hydrophilic drug, than triacetine (Dong et al., 2006). In

addition, it did appear that IVM degradation increased directly with increasing water content in solvents. Table 3 shows the water content value for the studied solvents at the beginning of the study. Therefore, water content in solvents could be an important factor catalyzing drug degradation. Furthermore, the higher drug degradation in 2P and NMP could be facilitated for a stronger solvent/drug interaction due to their smaller molecular sizes as described above. Finally, 2P could also have degraded more the drug than NMP because the first is a polar protic (H) whereas the second is a polar aprotic solvent. Polar protic solvents acts like H^+ donors, increasing the acidic environment and the hydrolysis of the ester groups of the IVM.

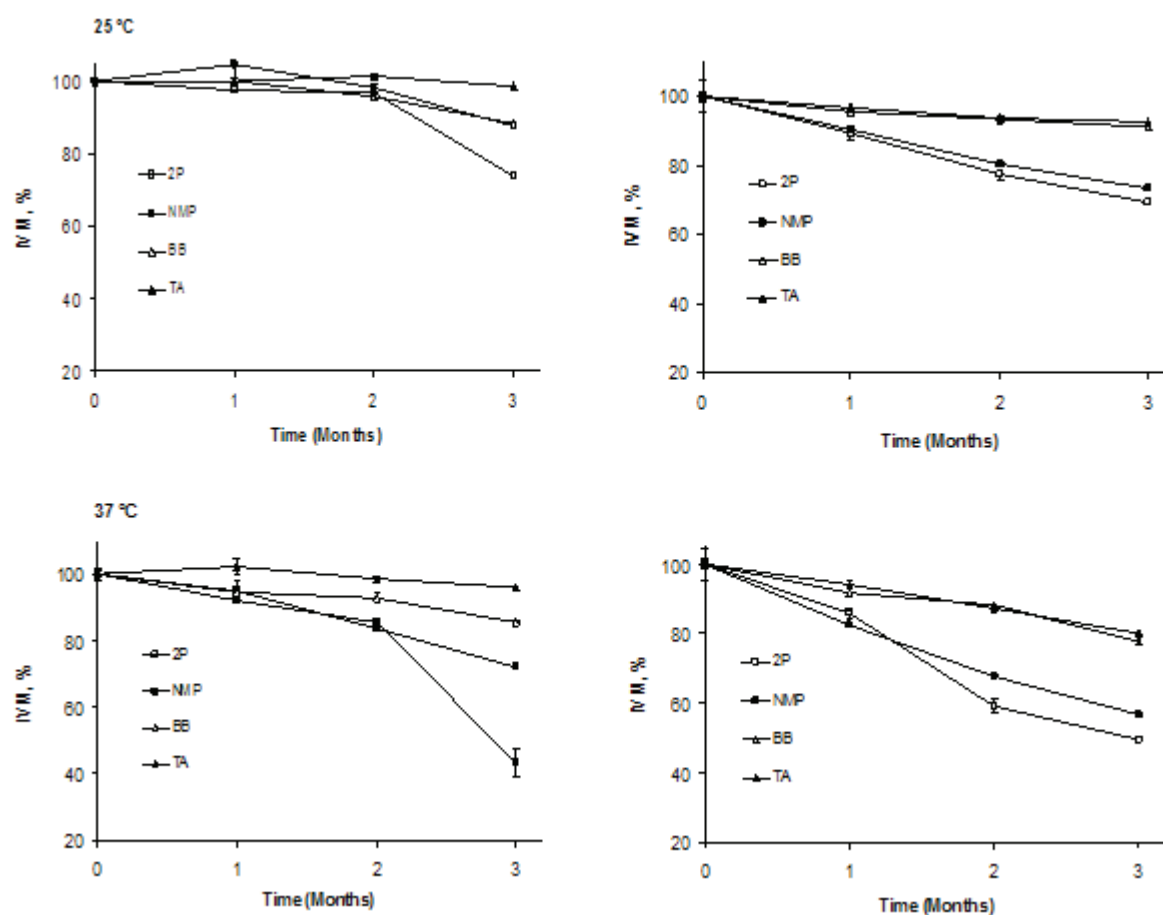
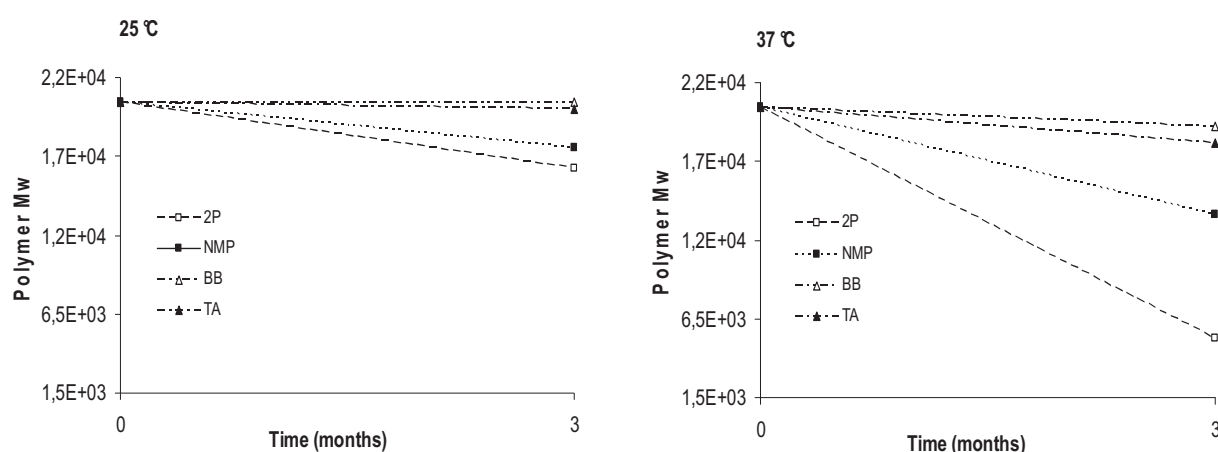


Fig. 2: Stability of IVM in PLA-free (left) and PLA-containing (right) solutions in different biocompatible solvents at 25°C and 37°C. Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n=3$)

Table 3: Water content of biocompatible organic solvents. Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n=3$)

Solvent	Water content (%)
2-pyrrolidone	0.38 ± 0.03
N-methyl-2-pyrrolidone	0.32 ± 0.02
Triacetine	0.27 ± 0.03
Benzyl benzoate	0.19 ± 0.03

On the other hand, the IVM degradation increased when it was in presence of the polymer. Its faster degradation could be due to a more acidic environment because of PLA degradation as shown in Figure 3. PLA degradation increased with the same factors than drug one. Thus, similarly to the drug, polymer stability decreased with increasing storage temperature, water content of the solvent and it was the lowest in solvents having higher molecular sizes (volume), TA and BB (Fig. 3) which have a lower interaction for the polymer. However, opposite to polymer-containing IVM solutions where polymer increased the rate of drug degradation, IVM did not affect polymer degradation. In fact, IVM is a non ionisable drug and when compared with polymer, its concentration in the formulation was very low.

**Fig. 3:** Evolution of the PLA Mw in IVM-containing solutions as a function of the organic solvent and the temperature

3.3 Viscosity studies

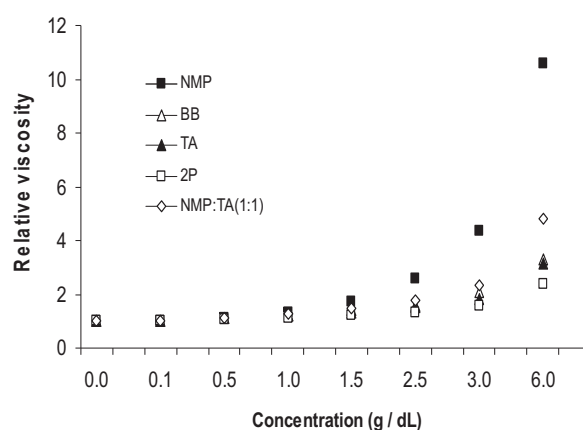
Viscosity studies were carried out to correlate them with solubility and drug release results. As shown in Figure 4A, the relative viscosity of diluted polymer solutions increased with increasing polymer concentration. In addition, it increased differently as a function of the solvent: $\text{NMP} > \text{NMP:TA(50:50)} > \text{TA} \approx \text{BB} > \text{2P}$. It was probably due to the fact that in diluted solutions, viscosity increases as a function of the hydrodynamic volume of polymer chains being higher as solvent quality increases. In fact, when a polymer is dissolved in an energetically unfavorable solvent e.g. “poor solvent”, polymer-polymer interactions become more important than solvent-polymer ones, leading to a more curled and contracted shape and consequently to a lower viscosity of the solution. On the contrary, if the polymer is dissolved in an energetically more favorable solvent e.g. “good solvent”, the chains of the polymer will be highly surrounded by the solvent hindering polymer-polymer contacts. Hence, uncurled configurations will be favoured leading to higher viscosity (Alfrey, 1947). In this regard, solvent quality increased in the same manner that relative viscosity. This observation was confirmed by the obtained intrinsic viscosity $[\eta]$ data from the Huggins correlation as showed in table 4 since in general, intrinsic viscosity is higher in “good solvents” than “poor solvents”.

Table 4: Intrinsic viscosities $[\eta]$ as a function of the solvent used at 37 °C

Solvent	$[\eta]$ mL/g
2P	13.2
BB	16.6
TA	17.2
NMP: TA (50:50)	18.0
NMP	18.6

On the contrary, in concentrated polymer solutions, viscosity increased almost inversely than in diluted polymer solutions. The increasing order was, $TA > BB \approx 2P > NMP$; $TA(50:50) > NMP$ as showed in Figure 4B.

A



B

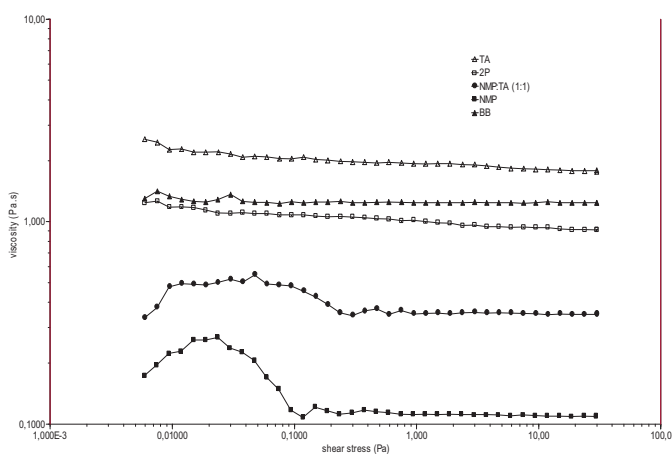


Fig. 4: Effect of the solvent type on the cinematic viscosity of diluted PLA solutions (A) and on the dynamic viscosity of 30% PLA solutions (B) as a function of the solvent

This can be explained as follows: when in a “poor solvent” the polymer concentration is high, as in ISI formulations, aggregates are formed as a result of increased polymer-polymer interactions leading to increase in the viscosity of the solutions. Inversely, since in “good solvents” polymer-solvent interactions predominate over polymer-polymer ones, the viscosity of the solutions is lower. These results are in agreement with those showing that NMP was a better solvent of PLA than 2P in the formulation of leuprolide PLA-based in situ forming implants (Kranz and Bodmeier, 2008).

Thus, viscosities of concentrated solutions must be taken with care with regard to the injectability of the formulations. Indeed, solutions with higher viscosities require higher injection forces (Rungseevijitprapa and Bodmeier, 2009). Thus, it was observed in the drug release tests (section 3.3) that NMP polymeric solutions were more easily injected than those of TA, BB or 2P. However, when NMP and TA were mixed in a 50:50 ratio, the injectability of the blend was improved when compared with pure TA solutions.

3.3 *In-vitro drug release from solvents and in situ implants*

In order to correlate the physico-chemical results with the process of drug release “*in vitro*”, IVM release studies from polymer-free and polymer-containing IVM solutions were performed. In the first case, the experiments were carried out with the aim to know the net effect of the solvents in drug release. IVM release increased with increasing solvent water solubility NMP(A)>2P(B)>NMP:TA(50:50)(C)>NMP:TA(30:70)(D)>TA(E)>BB(F) showing that drug release was controlled by solvent diffusion (Fig. 5-left).

Very water soluble solvents (NMP and 2P) led to a stronger “burst” (initial release) of IVM whereas less water soluble solvents (TA and BB) lead to slower rate of the drug release. In addition, drug release was inversely related with the size of a white depot present in the bottom of the test tubes

(Fig. 5-right). Thus, the higher the solvent water solubility, the greater the drug release and the smaller the size of the depot. The depot presence indicated that solvent diffusion in the medium was limited for its water solubility, which led also to lower drug release. However, depot size decreased gradually during the in vitro test because of solvent diffusion toward the release medium which led to increased drug release.

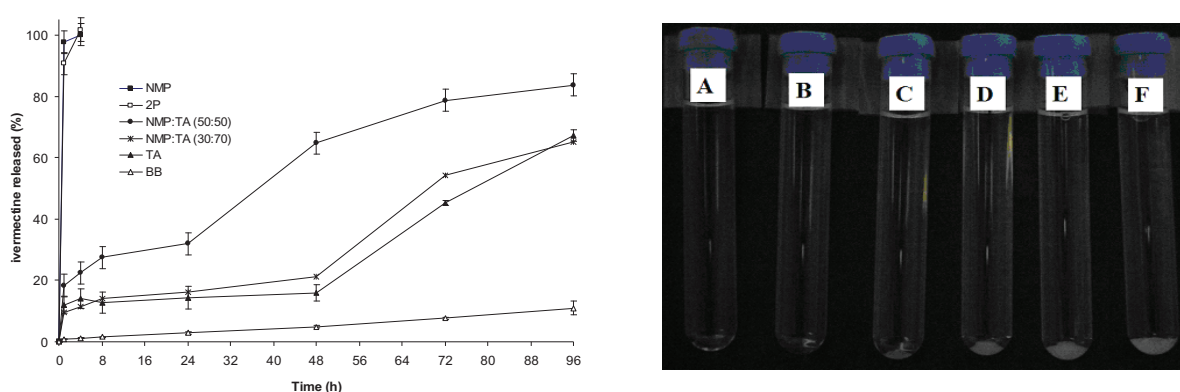


Fig. 5: IVM release from PLA-free IVM solutions as a function of the solvent used. Left: obtained profiles. Experiments were performed in SDS 0.25% water solution. Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Right: appearance of the release media 1 h after injection of the IVM solutions. Drug solutions were injected in the following order: (A) NMP, (B) 2P, (C) NMP:TA (50:50), (D) NMP:TA (30:70), (E) TA and (F) BB.

As seen before, IVM release from solvent solutions could be modulated by mixing a high water soluble solvent (NMP) with a less soluble one (TA). For example, when NMP and TA were mixed in equal parts, an important “burst” reduction in the IVM release was obtained when compared with the pure NMP. Thus, whereas at 48h NMP and TA released $100 \pm 3.58\%$ and $16 \pm 2.7\%$ of drug respectively, the mixture of NMP:TA (50:50) released $64 \pm 6.93\%$ of drug. Hence, three statistically different ($P < 0.05$) drug release profiles were obtained. However, when NMP and TA were mixed in a (30:70) ratio, the obtained drug release profile was similar (not statistically different) to the TA one, indicating this last controlled IVM release and that NMP effect was practically eliminated. Finally, if the analysis of this behaviour is done in an inverse way, it is possible to say that adding a very water soluble solvent like NMP into a solution of the drug in a less soluble solvent like TA, an

increased drug release could be obtained. Other used alternatives to obtain the same effects from PLGA-based implants have been to add hydrophilic e.g. mannitol or hydrophobic e.g. miglyol[®] 812 (a medium chain triglyceride) excipients to increase or decrease drug release, respectively (Shah et al., 1993).

The previous results allowed to selecting various solvents leading to different IVM release profiles from PLA-containing in situ implants. Some authors have observed that implant kinetic formation and drug release from these systems were controlled by solvent properties like water solubility (Brodbeck et al., 1999; Graham et al., 1999).

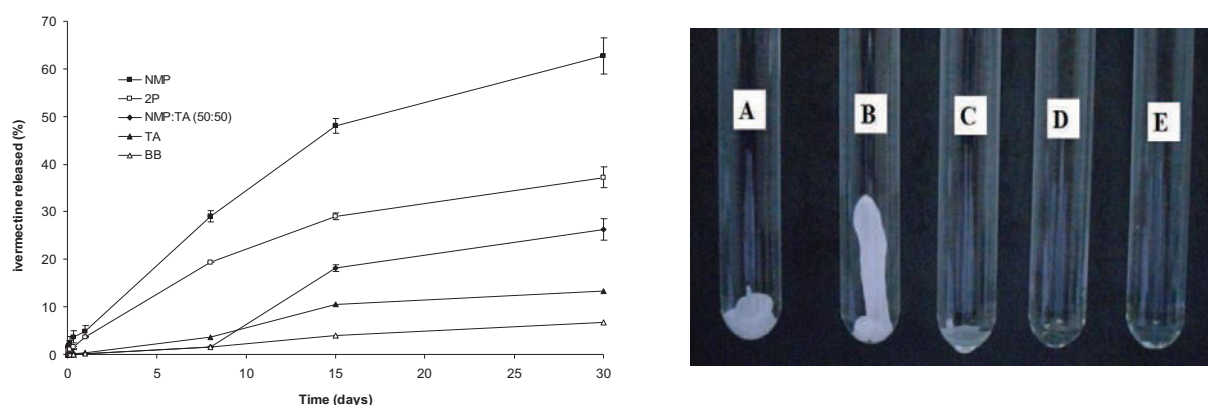


Fig. 6: IVM release from PLA (30%) in situ forming implants (ISI) as a function of the solvent used. Left: release profiles. ISI were formed by injecting the polymeric solutions in SDS 0.25% water solution. Data are shown as mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Right: appearance of the ISI after injection of the polymeric solutions. Drug-containing polymeric solutions were injected in the following order: (A) NMP, (B) 2P, (C) NMP:TA (50:50), (D) TA and (E) BB

Thus, it was logical that solvents releasing differently the drug would have an impact on drug release profiles from ISI. Hence, PLA (30%)-containing ISI made of NMP, NMP:TA (50:50), TA or BB, were tested over 1 month in terms of IVM release (Fig. 6-left).

Drug release from ISI followed the same general pattern than those obtained from polymer-free solutions. However an important burst reduction was observed principally due to the higher

viscosity of the polymer solutions. Indeed, increasing the viscosity of the solutions led to slower rate of solvent and drug diffusion (see viscosity studies). Upon injection of the polymeric solutions in the aqueous medium, the solvent diffuses toward the external medium (efflux process) whereas water penetrates into the polymeric solution (influx process). Thus, during the dynamic process efflux/influx, polymer concentration increases gradually until polymer solubility is overcome and its precipitation takes place (phase inversion). This process has been named nonsolvent induced phase separation (NIPS) since that water is a nonsolvent for the polymer thus inducing its precipitation (Wang et al., 2004).

The principal factors governing this complex phase inversion dynamic has been well described (Brodbeck et al., 1999; Graham et al., 1999): among them, the most important are polymer concentration (Shively et al., 1995) and solvent water solubility (Wang et al., 2004). In our experiments, PLA concentration remained constant (30%) and only the type of solvent was modified. However, since different viscosities in polymeric solutions were obtained as a result of different solvent-polymer interactions (see solubility studies), it became another variable allowing a reduction in burst IVM release from ISI. Therefore, in addition to water solvent solubility, viscosity of the polymeric solutions is another factor affecting the phase inversion dynamic. Nevertheless, water solvent solubility was the most important parameter determining the rate of the implant formation and drug release. Thus, Figure 6-right shows that solvents with higher water solubility were those having higher rate of implant formation (white precipitate on the bottom of the test tubes). The precipitated mass decreased as follows: NMP>2P>NMP:TA(50:50)>TA>BB. As discussed in the solubility studies, NMP ($\Delta\delta=5.2$) was a better solvent for the polymer than 2P ($\Delta\delta=7.9$) regardless of their similar water solubilities. In this regard, 2P implant had to be formed faster than NMP one, because less water was needed to desolvate the polymer from the solvent (Shively et al., 1995). However, NMP precipitated was first formed possibly because of the lower

viscosity of the solution leading to faster solvent diffusion and consequently faster polymer precipitation. This hypothesis is supported by the longer shape obtained in the NMP implant which was possibly originated from a faster solvent diffusion allowing to earlier implant formation. On the contrary, 2P implant formation took place principally when the bulk of the polymeric solution reached the bottom of the test tube. On the other hand, PLA solutions made from “poor” solvents of the polymer (TA and BB), which have lower water solubilities and higher viscosities, behaved as a slow inversion phase systems and therefore they remained as solutions for a longer time before polymers started to precipitate. Hence, since solvent diffusion was very slow in these systems, drug release was also limited. Finally, the fact that drug and polymer had similar solubility behaviour in solvents seems to be an interesting way to controlling burst and duration of IVM release. So, it could be possible that drug and polymers have precipitated together into implants once the solvent has diffused. In fact, a similar phenomenon was already observed “*in-vitro*” and “*in-vivo*” by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) during the formation of PLGA-based implants formulated in NMP containing the lipophilic molecule Tempolbenzoate ($\text{Log } P = +2.46$) (Kempe et al., 2008). Thus, as in implants made from more water soluble solvents a higher quantity of water is absorbed during the formation process, IVM ($\text{Log } P = +3.22$) in implants, could have been dispersed rather than dissolved, whereas in poor water soluble solvents it could have been rather dissolved. A similar phenomenon could be also responsible of a higher drug release observed from implant made of more hydrophilic solvents (NMP and 2P). For example, it was found that lysozyme and theophylline release from ISI was the greater when they were dispersed in the polymeric solution in comparison when they were dissolved (Körber and Bodmeier, 2008; Shah et al., 1993).

Finally, the observations about IVM release from PLA-based ISI were in good agreement with the porosity surface of the implants observed by scanning electron microscopy (Fig. 7).

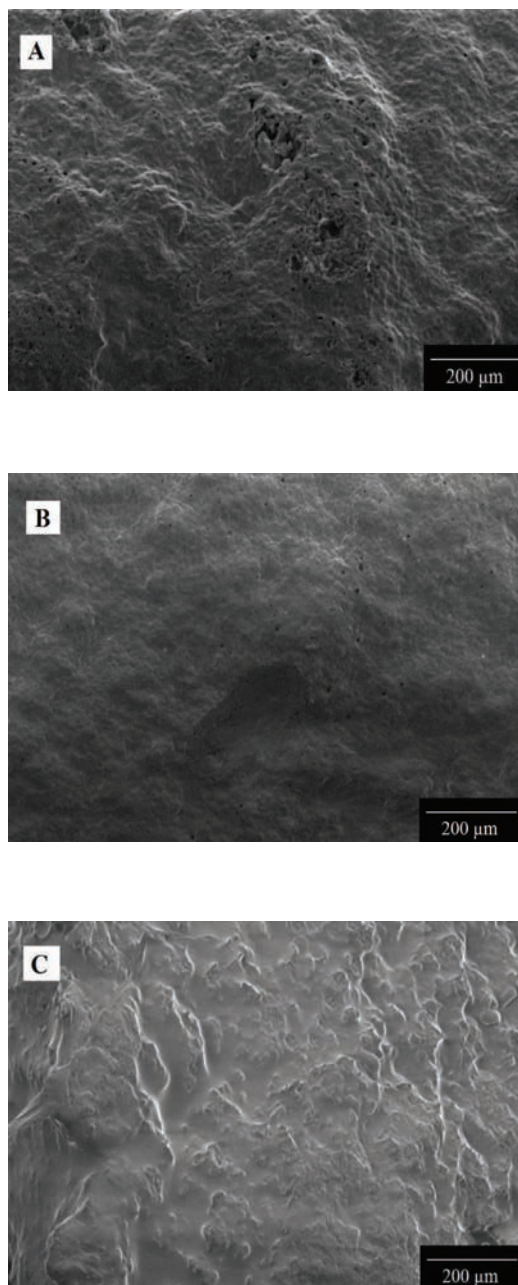


Fig. 7: Scanning electron micrographs of PLA (30%) in situ implants surface. Implants were prepared from (A) NMP (B) 2P and (C) TA

ISI made from high water soluble solvents, which diffuse faster than less water soluble ones, led to more porous and hand fragile microstructures. It is an important observation since once the membrane of the implants at its surface is formed, drug release is principally controlled by polymer degradation which is directly depending on the water penetrating into implants (Siepmann and

Gopferich, 2001). Thus, more porous implants were possibly those degrading faster the polymer, leading to faster drug release. On the contrary, less porous implants which degraded more slowly the polymer led to more prolonged IVM release patterns. Interestingly, since BB implants absorb little quantity of water, they became highly viscous polymeric solutions (gels) after drying, indicating that the process of implant formation was reversible. Thus, it was not possible to observe BB implants by SEM.

4. Conclusions

The “*in vitro*” IVM release from ISI prepared from solvents with different physico-chemical characteristics was evaluated. Hence, solvent selection was an important way to modify drug release. In other words, the strategy of increasing or decreasing the concentration of a polymer to modify the drug release (e.g. burst) from ISI is not mandatory. Another solvent or co-solvent system could be enough or even less expensive from an industrial point of view. This is especially important when drug and polymer stability problems have been detected as it was the case for IVM and PLA in 2P or NMP. In addition, this type of strategy could be an alternative to avoid additives (e.g. antioxidants) in formulations making them less complex. Nevertheless, as discussed before, injectability features must also be taken into account due to the viscosity changes induced by the different polymer/solvent interactions.

5. References

- Alfrey, T., 1947. The influence of solvent composition on the specific viscosities of polymer solutions. *Journal of Colloid Science* 2, 99-114.
- Anderson, J. M., Shive, M. S., 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 5-24.
- Brodbeck, K. J., DesNoyer, J. R., McHugh, A. J., 1999. Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery: Part II. The role of solution thermodynamics and bath-side mass transfer. *Journal of Controlled Release* 62, 333-344.
- Deadman, C. M., Kellaway, I. W., Yasin, M., Dickinson, P. A., Murdan, S., 2007. An investigation into the influence of drug lipophilicity on the in vivo absorption profiles from subcutaneous microspheres and in situ forming depots. *Journal of Controlled Release* 122, 79-85.
- Dong, W. Y., Körber, M., Lopez Esguerra, V., Bodmeier, R., 2006. Stability of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and leuprolide acetate in in-situ forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 115, 158-167.
- Dunn, R. L., English, J. P., Cowsar, D. R., Vanderbilt, D. P., 1990. Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same, US Patent 4, 938,763, .
- Gokbulut, C., Karademir, U., Boyacioglu, M., McKellar, Q. A., 2006. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. *Veterinary Parasitology* 135, 347-354.
- Gonzalez Canga, A., Sahagun Prieto, A. M., Jose Diez Liebana, M., Martinez, N. F., Vega, M. S., Vieitez, J. J., 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *Vet J* 179, 25-37.
- Graham, P. D., Brodbeck, K. J., McHugh, A. J., 1999. Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery. *J Control Release* 58, 233-245.

- Hansen, C. M., 1967. The three dimensional solubility parameter-key to paint component affinities: II and III. *J. Paint Technol.* 39, 505-514.
- Hansen, C. M., 2007. Hansen solubility parameters. CRC Press, New York.
- Hatefi, A., Amsden, B., 2002. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 80, 9-28.
- Huggins, M. L., 1942. The viscosity of diluted solutions of long-chain molecules IV. Dependence of concentration. *J. Am. Chem. Soc.* 64, 2716-2718.
- Jain, R. A., 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21, 2475-2490.
- Kempe, S., Metz, H., Mäder, K., 2008. Do in situ forming PLG/NMP implants behave similar in vitro and in vivo? A non-invasive and quantitative EPR investigation on the mechanisms of the implant formation process. *Journal of Controlled Release* 130, 220-225.
- Körber, M., Bodmeier, R., 2008. Development of an in situ forming PLGA drug delivery system. I. Characterization of a non-aqueous protein precipitation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 35, 283-292.
- Kranz, H., Bodmeier, R., 2008. Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: In situ implants versus in situ microparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 34, 164-172.
- Kranz, H., Brazeau, G. A., Napaporn, J., Martin, R. L., Millard, W., Bodmeier, R., 2001. Myotoxicity studies of injectable biodegradable in-situ forming drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 212, 11-18.
- Lambert, W. J., Peck, K. D., 1995. Development of an in situ forming biodegradable poly-lactide-co-glycolide system for the controlled release of proteins. *Journal of Controlled Release* 33, 189-195.

- Legrand, P., Lesieur, S., Bochot, A., Gref, R., Raatjes, W., Barratt, G., Vauthier, C., 2007. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics* 344, 33-43.
- Liu, J., Chang, Z., Sun, X., Shen, S., Lei, C., Liu, H., 2006. Impurity effects on the crystallization of avermectin B1a. *Journal of Crystal Growth* 291, 448-454.
- Loffler, D., Ternes, T. A., 2003. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1021, 133-144.
- Matschke, C., Isele, U., van Hoogevest, P., Fahr, A., 2002. Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. *J Control Release* 85, 1-15.
- Packhaeuser, C. B., Schnieders, J., Oster, C. G., Kissel, T., 2004. In situ forming parenteral drug delivery systems: An overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58, 445-455.
- Rathbone, M. J., Hadgraft, J., Roberts, M. S., Lane, E. M., 2008. Modified-release drug delivery technology. Informa Health care, USA, Vol.2.
- Ravivarapu, H. B., Moyer, K. L., Dunn, R. L., 2000. Parameters affecting the efficacy of a sustained release polymeric implant of leuprolide. *International Journal of Pharmaceutics* 194, 181-191.
- Royals, M. A., Fujita, S. M., Yewey, G. L., Rodriguez, J., Schultheiss, P. C., Dunn, R. L., 1999. Biocompatibility of a biodegradable in situ forming implant system in rhesus monkeys. *J Biomed Mater Res* 45, 231-239.
- Rungseevijitprapa, W., Bodmeier, R., 2009. Injectability of biodegradable in situ forming microparticle systems (ISM). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 36, 524-531.
- Shah, N. H., Railkar, A. S., Chen, F. C., Tarantino, R., Kumar, S., Murjani, M., Palmer, D., Infeld, M. H., Malick, A. W., 1993. A biodegradable injectable implant for delivering micro and

macromolecules using poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) copolymers. *Journal of Controlled Release* 27, 139-147.

Shively, M. L., Coonts, B. A., Renner, W. D., Southard, J. L., Bennett, A. T., 1995. Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system. *Journal of Controlled Release* 33, 237-243.

Siepmann, J., Gopferich, A., 2001. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 48, 229-247.

Takano, R., Sugano, K., Higashida, A., Hayashi, Y., Machida, M., Aso, Y., Yamashita, S., 2006. Oral absorption of poorly water-soluble drugs: computer simulation of fraction absorbed in humans from a miniscale dissolution test. *Pharm Res* 23, 1144-1156.

Wang, L., Kleiner, L., Venkatraman, S., 2003. Structure formation in injectable poly(lactide-co-glycolide) depots. *Journal of Controlled Release* 90, 345-354.

Wang, L., Venkatraman, S., Kleiner, L., 2004. Drug release from injectable depots: Two different in vitro mechanisms. *Journal of Controlled Release* 99, 207-216.

3.4 Systèmes biodégradables d'administration parentérale pour la libération prolongée d'ivermectine: comparaison *in vitro* et *in vivo*

1. Introduction

Depuis sa découverte, l'Ivermectine (IVM) a été formulée de différentes manières et sous différentes formes pharmaceutiques classiques (comprimés, solutions, pâtes) et innovantes afin de combattre les parasitoses vétérinaires. Les formulations classiques présentent l'inconvénient majeur de devoir être administrées régulièrement afin d'assurer leur efficacité thérapeutique. Ainsi, de nouveaux systèmes de libération « intelligents » tels que des liposomes (Bassissi et al., 2006), des implants de silicone (Maeda et al., 2003) et des microparticules biodégradables à base de protéines de maïs (Liu et al., 2005) ou de polyesters synthétiques (Clark et al., 2004; Miller et al., 1999; Miller et al., 1998) ont été développés afin d'augmenter le temps de libération de la molécule.

Dans les chapitres précédents, le développement et la caractérisation physico-chimique de deux types de formulation, à base de polyesters de l'acide lactique (D,L-PLA), délivrant de l'IVM ont été exposés. Il s'agissait de systèmes préformés (microparticules formulées par la méthode d'émulsion simple - évaporation de solvant (SE)) et d'implants monolithiques formés *in situ* lors de leur administration (implants *in situ* (ISI)). L'étude de la libération de l'IVM à partir de ces formes dans un milieu aqueux a permis de mettre en exergue quelques mécanismes de libération.

Dans cette partie, le développement de microparticules *in situ* par extraction de solvant est décrit. Une phase polymérique semblable à celle utilisée pour la fabrication des ISI et contenant le principe actif (suspendu ou dissous), est émulsifiée, juste avant injection, avec une autre phase soit organique (par exemple une huile végétale) (ISM-O/O), soit aqueuse (par exemple de l'eau) (ISM-O/W). Lors de l'injection de cette émulsion, le système entre en contact avec l'environnement aqueux des fluides physiologiques, ce qui entraîne la diffusion du solvant organique de la phase

polymérique (phase interne) vers le milieu aqueux environnant, conduisant ainsi à la précipitation du polymère sous la forme de microparticules où le principe actif est retenu (Bodmeier, 1998; Kranz and Bodmeier, 2007). Ainsi, la nature du solvant organique intervient dans la libération du principe actif délivré. Toute une variété de solvants biocompatibles dont la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) et la triacétine (TA), (solvants utilisés dans cette étude), a permis l'obtention de systèmes *in situ* libérant différents principes actifs tels que l'albumine sérique bovine - FITC, l'acétate de leuprolide, la lidocaïne (Hatefi and Amsden, 2002), la théophylline et l'hydrochlorothiazide (Shah et al., 1993).

La comparaison *in vitro* et *in vivo* des trois systèmes parentéraux biodégradables proposés pour libérer de façon prolongée l'IVM, est décrite dans cette partie. Cette comparaison des dispositifs repose sur la cinétique de libération *in vitro* du principe actif (suivie pendant 30 jours) et la libération *in vivo*, suite à l'administration sous-cutanée des formulations chez le rat à une dose d'IVM de 500 µg / kg. L'objectif est ici :

- d'étudier plus avant les propriétés physicochimiques des ISM en fonction du solvant utilisé et de les comparer aux deux autres systèmes proposés.
- d'observer la morphologie des systèmes *in situ* après un mois dans les tissus.
- de corréler les résultats *in vitro* avec ceux obtenus *in vivo*.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Préparation des microparticules d'IVM par émulsion simple / évaporation du solvant

La procédure de formulation des microparticules par émulsion simple / évaporation de solvant utilisée dans cette étude *in vivo* est identique à celle décrite dans le chapitre 1 (Camargo et al., 2010). Le protocole de formulation est le suivant : une solution de 80 mg d'ivermectine (IVM ;

Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et 250 mg de polymère poly (D,L-lactide) (PLA; Resomer[®] R 203 S, end-capped, iv 0.31 dL/g ; Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Allemagne) dans 10 mL de dichlorométhane (VWR Prolabo, Fontenay Sous Bois, France) a été ajoutée sous agitation (1600 r.p.m, mélangeur Polystat[®], FISHER Scientific Bioblock, Illkirch, France) dans 1000 mL d'une solution aqueuse d'alcool polyvinylique (PVA , Mw 30.000 Da, 88 % hydrolysé ; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) à 0,1 %. L'émulsion « huile dans eau » (O/W) obtenue a été agitée pendant 2 heures à la même vitesse afin d'éliminer le solvant volatil. Les microparticules obtenues ont été ensuite récupérées par filtration sous vide (Pompe VacuuBrand[®], GmbH, Wertheim, Allemagne) sur une membrane de nitrocellulose (porosité 0,45 µm, 47 mm de diamètre, Porafil[®] Macherey-Nagel, Neuman-Neander, Düren, Allemagne) et séchées à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une humidité résiduelle de 1 % environ (déterminée par la méthode de Karl-Fisher). Des particules avoisinant 40 µm ont été ainsi obtenues (Mastersizer X[®], Malvern - Instruments, Worcestershire, UK)

2.2 Préparation des implants *in situ* (ISI)

La même procédure de formulation que celle décrite précédemment (chapitre 3.3) a été réalisée pour cette étude. Des solutions de PLA 30% (m/m, par rapport à la quantité de solvant) ont été préparées dans différents solvants (1,80 g de PLA R 203 S dans 4,20 g de solvant) : le triacétate de glycérol 99% (Triacétine ;TA), la 2-pyrrolidone 99% (2P), le benzoate de benzyle (BB) (Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, Germany) et la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP ; VWR Prolabo, Fontenay Sous Bois, France). Ces solutions ont été obtenues sous agitation magnétique en continu à 50 ± 5 °C jusqu'à complète solubilisation du polymère. Ensuite, elles ont été refroidies à température ambiante et 3,9 mg d'IVM ont été ajoutés et solubilisés par agitation douce. Ces solutions de viscosités variables (TA>BB>2P>NMP) permettront la formation d'implants monolithiques une

fois l'injection dans les tissus suite à la diffusion du solvant et à la précipitation consécutive du polymère.

2.3 Préparation des microparticules *in situ* (ISM)

Les ISM ont été préparées par émulsification initiale de deux solutions. La première est constituée de 400 mg d'une phase polymérique obtenue par solubilisation de 1,80 g de PLA R 203 S (30 % w/w, par rapport à la quantité de solvant) et de 3,9 mg d'IVM dans 4,20 g de 2P (pour les systèmes ISM-O/O) ou de TA (pour les systèmes ISM-O/W). La deuxième solution correspond **i)** pour les systèmes ISM-O/O, à 400 mg d'une phase huileuse obtenue par suspension de 20 mg de monostéarate d'aluminium (2 % m / m) et solubilisation de 20 mg de Span[®] 80 (2 % m / m) dans 1,96 g d'huile d'arachide **ii)** pour les systèmes ISM-O/W, à 400 mg d'une solution aqueuse 1% de Pluronic[®] F68 saturée en TA.

Les deux phases ainsi préparées ont été placées séparément dans des seringues de 1 mL (BD Plastipack[™], S. Augustin del Guadalix, Madrid, Espagne). Elles ont ensuite été émulsionnées (Emulsion « huile dans huile » O/O ou « huile dans eau » O/W) en faisant passer 50 fois le contenu d'une des seringues vers l'autre (système de va-et-vient) à une vitesse de 2 cycles / seconde à travers un connecteur en polypropylène (PP) de 1,5 mm de diamètre interne. L'émulsion ainsi obtenue sera ensuite injectée et le solvant diffusera dans le milieu aqueux environnant entraînant la précipitation du polymère.

2.4 Etude de la libération d'IVM *in vitro*

Pour les microparticules obtenues par émulsion simple, environ 20 mg, ont été suspendus dans un tube à essai, dans 5 mL d'une solution aqueuse de SDS 0,25 % à 37°C. Pour les systèmes *in situ* (ISI ou ISM), environ 400 mg, de solution polymérique pour le ISI ou d'émulsion (O/O ou O/W)

pour les ISM, ont été injectés en utilisant une seringue de 1 mL couplée à une aiguille 21G dans des tubes contenant le même milieu de libération que celui décrit précédemment (SDS 0,25% à 37°C). Les systèmes (hermétiquement clos) ont été agités à une vitesse de 75 r.p.m pendant 1 mois dans un bain-marie agité Memmert[®] (Fischer Scientific, Illkirch, France). Pendant les premières 96 heures, des échantillons de 1,5 mL ont été prélevés à des intervalles de temps prédéfinis (et remplacés par du milieu frais) filtrés à travers des membranes de nitrocellulose de 0,45 µm et dosés pour déterminer la quantité d'IVM libérée. Puisque l'IVM n'est stable que 96 h dans le milieu de libération, le milieu complet a été prélevé après cette période puis remplacé par du milieu frais. La quantité d'IVM libérée a été mesurée par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) en phase inverse comme décrit dans le chapitre 3.2 (Camargo et al., 2010). Pour toutes les formulations évaluées, trois tests ont été réalisés.

2.5 Etudes *in vivo*

Les expériences *in vivo* ont été réalisées sur de rats adultes Wistar mâles RjHan:WI[®] (âgés de 4 mois environ et pesant 400 ± 50 g ; Janvier, Route des Chênes Secs, France) selon les recommandations de la norme française pour les expérimentations chez l'animal. Pendant leur séjour à l'animalerie et les expérimentations, les individus ont été identifiés, divisés par groupes et séparés dans des cages où de l'eau et de la nourriture leur ont été fournies à volonté. Une dose de 500 µg / kg d'IVM, présentée sous la forme des différents systèmes (solution commerciale, microparticules par émulsion simple, implant et microparticules *in situ*) a été administrée en sous-cutanée à l'aide d'une seringue comme décrit précédemment dans le chapitre 2.2.4, en région dorsale basse.

- une solution diluée dans le même solvant que la solution commerciale (mélange 60/40 propylène glycol /glycérol formal), de concentration correspondante à une dose de 500 µg /kg d'Ivomec[®] 1% a été administrée à un groupe de rats.

- Pour les formulations à base de microparticules préparées par la méthode d'émulsion simple, une quantité de microparticules suffisante pour l'obtention d'une dose d'IVM de 500 µg / kg, a été mise en suspension dans 400 µL d'une solution aqueuse isotonique stérile constituée de carboxyméthylcellulose sodique (0,5% (m/v)), Tween[®] 80 (0,5% (m/v)) et mannitol USP 96% (5,0% (m/v)).
- Pour les systèmes *in situ*, environ 400 µL de solution polymérique ou d'émulsion (O/O ou O/W) préparée extemporanément et contenant IVM (500 µg / kg) ont été injectés.

Suite à l'injection des formulations d'IVM, des échantillons de sang de 400 µL ont été prélevés au niveau de la veine caudale des individus non anesthésiés à différents temps (30 minutes, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72, 96 h et 7, 9, 11, 15 et 30 jours). Les échantillons ont été récupérés dans des tubes citratés afin d'éviter la coagulation. Ils ont été ensuite centrifugés à 10 000 *g* pendant 10 minutes et le plasma a été récupéré et stockés à -30°C pour son analyse ultérieure et la détermination de la concentration d'IVM par CLHP.

Dans un souci éthique, des sous-groupes d'animaux (n=3 par temps de prélèvement, pour un même type de formulation) ont été constitués afin d'assurer un volume de sang prélevé inférieur à 3 mL en 15 jours, volume maximal autorisé par les autorités compétentes (OVF, 2004).

2.6 Détermination par CLHP de la concentration d'IVM dans le plasma :

La concentration d'IVM dans les échantillons de plasma des rats a été déterminée après extraction du principe actif. Pour cela, 100 µL de plasma et 500 µL de méthanol HPLC (à - 30°C) ont été mélangés au vortex pendant 1 minute afin de précipiter tout d'abord les protéines du plasma. L'extraction a été ensuite réalisée par incubation du système à - 30°C pendant 15 minutes. La phase organique a été alors séparée par centrifugation (16 000 *g* ; 4°C ; pendant 15 minutes) puis

récupérée et évaporée par chauffage à $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ sous flux d'azote gazeux (Prieto et al., 2003). Pour l'analyse chromatographique, les résidus d'évaporation ont été préalablement redissous au vortex pendant 2 minutes dans 150 μL d'un mélange (1 :1, v/v) constitué de N-méthylimidazole (NMI ; 99% ; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et d'acétonitrile (ACN ; Carlo Erba-SDS, Val de Reuil, France). L'analyse des extraits par CLHP a été réalisée en phase inverse avec détection spectrofluorométrique du dérivé fluorescent du principe actif. Une aliquote de 50 μL de cette solution a été ensuite dérivée directement dans le système CLHP selon la méthode précédemment décrite (De Montigny et al., 1990), par l'addition automatique de 80 μL d'un mélange (1 : 2, v/v) constitué d'ACN et d'anhydride trifluoroacétique (ATA). Après 2 minutes (temps nécessaire à la dérivatisation (<30 s d'après la littérature), 80 μL de la solution dérivée ont été automatiquement injectés dans le système chromatographique. L'élution et la détection du dérivé fluorescent ont été réalisés dans un chromatographe liquide Shimadzu (SCL-10A VP, Croissy Beabourg, France) en utilisant une colonne Uptisphere[®] (120 Å, ODB-C₁₈, 5 μm ; 3 x 150 mm, Interchim, Montluçon, France), avec une phase mobile composée d'ACN, de méthanol et d'acide acétique (solution aqueuse 0,2%, v/v) en proportion 52 :45 :3, circulant à un débit de 1,5 mL/min et à 35°C. La détection a été réalisée à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives de 365 et 475 nm. La méthode a été validée en terme de spécificité vis-à-vis de l'IVM, de linéarité (entre 2 et 100 ng / mL ($R^2 > 0.99$)) et présente un taux de récupération de $85,5 \pm 10 \%$.

La concentration d'IVM dans le plasma a ainsi été déterminée et la biodisponibilité relative (F) des formulations administrées (par rapport à la solution diluée d'Ivomec[®] 1% administrée à une dose de 500 μg /kg) a été calculée par rapport aux aires sous la courbe (AUC) des graphiques concentration / temps obtenus par la méthode linéaire des trapèzes pour les différentes formulations testées.

2.7 Microscopie électronique à balayage

Afin de vérifier la formation et l'aspect des microparticules *in situ* lors de l'injection chez le rat, des animaux recevant ces formulations ont été sacrifiés 1 mois après l'administration de 3 mL de pentobarbital sodique 60 mg / mL (CEVA Santé Animal, Libourne, France) injectée en intracardiaque à l'animal préalablement anesthésié (anesthésie gazeuse à l'isoflurane). Une autopsie au site d'injection a été réalisée. Des photographies (Samsung L201) avant résection ont été effectuées, et des échantillons de tissu au niveau de l'injection ont été prélevés, puis incubés à 37°C dans une solution de trypsine-EDTA (0,5 g/L de trypsine et 0,2 g/L d'EDTA, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) pendant 30 minutes afin d'éliminer un maximum de matériel biologique environnant les particules. Les échantillons ainsi traités ont été ensuite séchés jusqu'à l'obtention d'une humidité résiduelle d'environ 1% (Karl-Fisher). Enfin, les observations par microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées en utilisant un microscope Philips XL 30S FEG (FEI Company, Lyon, France) utilisé entre 1,5 et 4,5 kV sous atmosphère d'azote.

2.8 Analyse statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés comme les moyennes $\pm$ écart type. Une comparaison par paires par la méthode de Mann-Whitney a été utilisée afin de déterminer le niveau statistique des différences. Dans tous les cas, $P < 0,05$ a été considéré comme étant différent.

3. Résultats et discussion

Trois types de systèmes particuliers à base de PLA et délivrant de l'IVM ont été formulés dans cette étude :

- les microparticules par émulsion simple (ES-MP), systèmes préformés caractérisés du point de vue physico-chimique dans une précédente étude (Camargo et al., 2010)

- les implants monolithiques de formation *in situ* (ISI) dont le développement a été décrit dans le chapitre 2 (Dunn et al., 1990)
- les microparticules *in situ* (ISM), systèmes émulsionnés de la forme précédemment citée (Bodmeier, 1998).

Les implants et les microparticules *in situ* sont des systèmes injectés sous forme de solution polymérique ou d'émulsion contenant une phase polymérique qui va précipiter au moment de l'injection, lors de la fuite du solvant organique vers le milieu aqueux (solution aqueuse ou tissu).

La nature du solvant utilisé va donc conditionner la libération du principe actif contenu dans ces systèmes. Deux solvants ont été choisis dans cette étude pour la préparation des formes *in situ*, pour leur solubilité variable dans l'eau : la NMP, dont la solubilité dans l'eau est élevée (1000 mg/mL) et la TA, de faible solubilité (64 mg/mL). Ces deux solvants ont permis l'obtention d'implants (ISI-NMP et ISI-TA) et de microparticules (ISM-NMP-O/O et ISM-TA-O/W), les dernières correspondant à un système émulsionné issu des premiers. La première partie du processus de formation des ISM consiste à émulsionner les phases externe (huile ou eau) et interne (solution polymérique contenant le principe actif), ce qui entraîne la formation de gouttelettes soit O/O ou O/W. C'est pourquoi, les paramètres dépendant du solvant biocompatible utilisé tels que sa solubilité dans l'eau et sa viscosité ainsi que l'affinité du principe actif pour chacune des deux phases, jouent un rôle très important dans la vitesse de libération du principe actif lorsque ces émulsions sont injectées dans un milieu aqueux.

3.1 Etude de la libération *in vitro* de l'IVM à partir des différents systèmes particuliers

La solution aqueuse de SDS 0,25% utilisée comme milieu de dissolution dans les études de libération *in vitro*, permettait une solubilisation suffisante de l'IVM assurant ainsi l'obtention des conditions « sink » pendant le test de dissolution. De plus, ce milieu s'est révélé assez discriminant entre les formulations testées.

La libération *in vitro* d'IVM à partir des différentes formulations évaluées est présentée dans la figure 1. Ainsi, la vitesse de libération de la solution commerciale Ivomec® 1% a été la plus rapide avec un effet « burst » (libération initiale rapide) important atteignant le 100 % d'IVM libérée dès la première heure. Ce produit correspond à une solution d'IVM formulée dans un mélange en proportion 60/40 de propylène glycol et de glycérol formol, solvants solubles dans l'eau (Lifschitz et al., 2007). De ce fait, le mécanisme de libération du principe actif suite à l'injection de cette solution, correspond à la précipitation du principe actif due à l'extraction des solvants vers le milieu aqueux environnant puis la solubilisation progressive des cristaux d'IVM à partir du dépôt formé dans la solution de SDS 0,25%. Cependant, la présence de ces solvants, très solubles dans l'eau, favorise également la rapide solubilisation du principe actif dans le milieu aqueux.

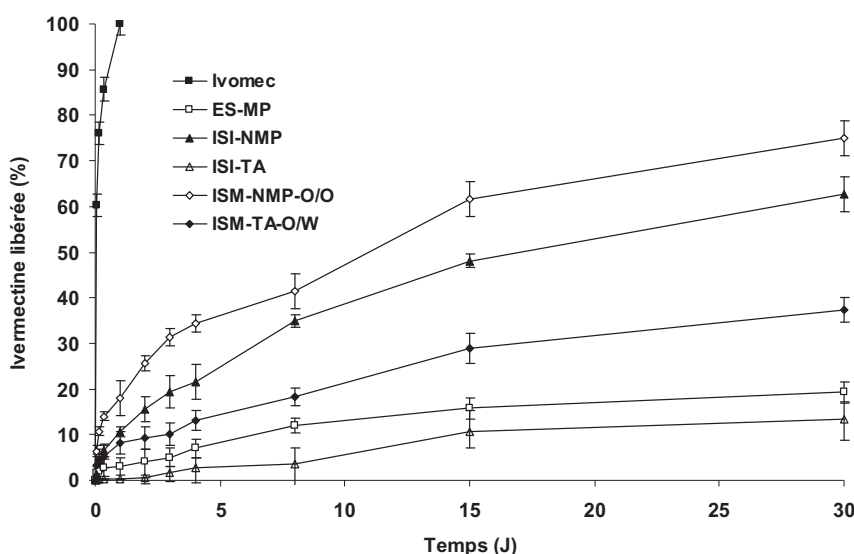


Figure 1 : Cinétiques de libération d'IVM *in vitro* pour différents systèmes de libération (jusqu'à 30 jours). Les données représentent la moyenne $\pm$ l'écart type ($n=3$).

Contrairement au comportement de l'Ivomec®, les systèmes préparés à base de PLA ont présenté une libération d'IVM beaucoup plus lente. En effet, la haute concentration de PLA dissoute dans le solvant (30%) contribue à une réduction du « burst » de la formulation par rapport à l'Ivomec®, due à une réduction de la vitesse de diffusion du solvant vers le milieu extérieur.

Les profils de libération obtenus pour chacune des formulations testées sont tous caractérisés par une libération initiale rapide du principe actif, suivie d'une libération plus lente et soutenue. Cependant, la vitesse de libération (quantité d'IVM libérée à chaque temps) d'IVM à partir de ces systèmes diminue dans l'ordre suivant : ISM-NMP-O/O > ISI-NMP > ISM-TA-O/W > ES-MP > ISI-TA. L'IVM est donc libérée plus aisément des formulations à base de NMP. Différents phénomènes peuvent expliquer cela :

- La haute solubilité dans l'eau de la NMP (1000 mg/mL) conduisant à sa diffusion rapide vers le milieu aqueux de dissolution et par la même, la diffusion rapide vers le milieu aqueux de l'IVM peut principalement expliquer ce résultat.
- Ce phénomène est aussi favorisé par la faible viscosité relative du solvant (1.89 mPa.s) (Rungseevijitprapa and Bodmeier, 2009).
- Enfin, puisque les systèmes obtenus, ISI ou ISM, en utilisant des solvants très hydrophiles comme la NMP sont très poreux, leur dégradation peut avoir lieu plus rapidement (Brodbeck et al., 1999; Kranz and Bodmeier, 2008). En effet, plus la porosité d'un système est élevée, plus la pénétration d'eau à l'intérieur du système est importante et plus il est vite dégradé. Ceci pourrait expliquer la libération rapide de l'IVM à partir de ces systèmes après leur formation (complète précipitation du polymère).

De plus, les ISM à base de NMP libère de façon plus rapide l'IVM que les ISI-NMP. Puisque l'émulsion injectée est un système finement divisé (microglobules), elle possède d'une part, une surface de contact plus grande par rapport à chacune des phases (donc à la structure monolithique des implants), ce qui augmente son exposition au milieu de libération. D'autre part, le fait que l'IVM soit une molécule fortement lipophile (Log P : +3,22) (Loffler and Ternes, 2003) et que la NMP soit complètement miscible à l'huile d'arachide, induiraient également un partage du principe

actif entre la phase externe et interne, augmentant ainsi l'exposition du principe actif au milieu de libération. Ce phénomène a été déjà observé pour des ISM-O/O fabriquées en utilisant le couple NMP/huile d'arachide pour la libération d'acétate de leuprolide (Im-Emsap, 2002).

Les profils de libération des systèmes in situ à base de TA présentent un effet « burst » et un plateau plus faibles que ceux des formulations à base de NMP. Quatre facteurs principaux expliqueraient ce phénomène : i) la faible solubilité dans l'eau de la TA (64 mg/mL) empêche la fuite du principe actif avec le solvant une fois que ce dernier diffuse dans le milieu de dissolution, ii) la faible solubilité de la TA dans la phase externe aqueuse entraîne un faible partage phase externe/phase interne, iii) la viscosité élevée de la TA (19.70 mPa.s) (Rungseevijitprapa and Bodmeier, 2009) et de la solution polymérique ralentissent la vitesse de diffusion du solvant biocompatible vers le milieu extérieur et iv) la faible solubilité de l'IVM dans la phase externe en raison de sa lipophilicité élevée.

Les ISM-TA-O/W présentent également une surface spécifique plus importante que les ISI-TA libérant ainsi l'IVM de façon plus rapide, comme évoqué précédemment pour les formes à base de NMP. De même, bien qu'étant des systèmes solides préformés, les microparticules préparées par la méthode d'émulsion simple/évaporation de solvant présentent une surface spécifique plus grande entraînant ainsi leur plus grande exposition au milieu de libération. Dans ce type de particules préformées, l'effet « burst » observé a été attribué au principe actif présent en surface et qui est libéré immédiatement au moment de la mise en suspension des microparticules dans le milieu de libération (Hasan et al., 2007). Il est également à noter que la faible porosité de ces microparticules et la forte interaction entre le polymère et le principe actif due à leurs fortes lipophilicités (Camargo et al., 2010) peuvent expliquer la faible libération d'IVM à partir des systèmes préformés.

Les résultats précédents présentent un intérêt particulier car la plupart d'études publiées, étudiant la cinétique de libération *in vitro* de principes actifs à partir des ISM, ont été réalisées sur des formulations ISM-O/O et des principes actifs hydrophiles tels que l'acétate de leuprolide, le chlorhydrate de bupivacaine, le chlorhydrate de diltiazem ou l'acétate de busereline (Kranz and Bodmeier, 2007, 2008; Luan and Bodmeier, 2006a, b). Puisque les principes actifs hydrophobes nécessitant une amélioration de leur biodisponibilité et une libération prolongée sont de plus en plus nombreux (Wischke and Schwendeman, 2008), la compréhension du comportement de ces principes actifs dans les systèmes injectables de formation *in situ* est important. Ainsi, une comparaison de la vitesse de libération d'IVM, *in vitro* et *in vivo*, à partir d'ISI issus de l'utilisation des solvants de différentes hydrophilicités et des ISM-(O/O ou O/W) était fortement envisagée afin de mieux caractériser les formulations. De ce fait, des essais pharmacocinétiques chez le rat ont été réalisés avec les formulations précédemment testées *in vitro*.

3.2 Etude de la libération *in vivo* de l'IVM à partir des différents systèmes

Les résultats des différents groupes d'animaux sont reportés dans la Figure 2, où les écart-types ne sont pas mentionnés pour plus de lisibilité. De façon intéressante, la libération (notamment le burst) des formulations *in vivo* a été similaire à celui observé *in vitro*. Ainsi, la libération initiale d'IVM à partir de chacun des systèmes, représenté par son $T_{\max}$ plasmatique (tableau 1), a montré une diminution de ce paramètre dans l'ordre suivant: Ivomec[®]>ISM-NMP-O/O>ISI-NMP>ISM-TA-O/W>ISI-TA>MP-ES. Ces résultats confirment les observations d'autres chercheurs montrant une influence du véhicule utilisé dans la formulation de l'IVM sur la biodisponibilité du principe actif (Lifschitz et al., 2007; Lifschitz et al., 1999).

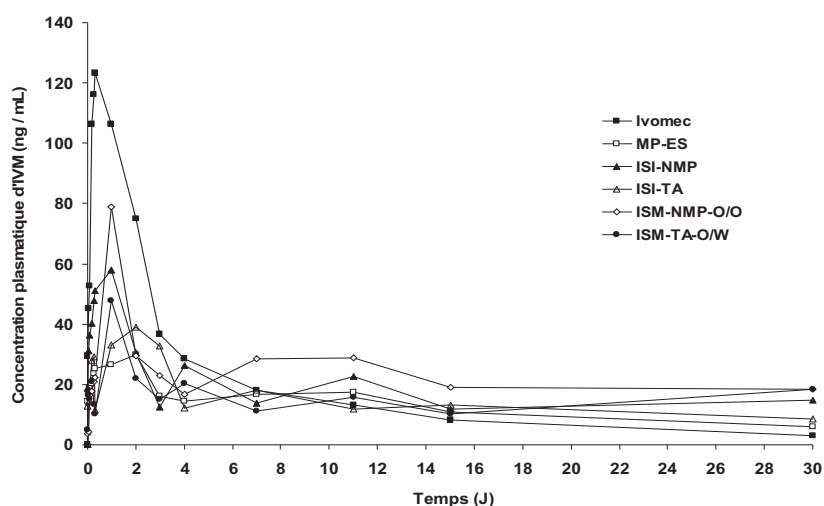


Figure 2 : Profils plasmatiques d'IVM obtenus suite à l'administration sous-cutanée de différentes formulations. La dose administrée a été de 500 µg IVM / kg

La biodisponibilité relative (F) des formulations administrées, a été calculée par rapport à l'aire sous la courbe d'une solution diluée d'Ivomec[®] 1% à une dose de 500 µg /kg. La concentration d'IVM dans le plasma de rats ayant reçu les différentes formulations a été déterminée par CLHP. Après détermination de l'aire sous la courbe (AUC) des graphes concentration / temps, par la méthode linéaire des trapèzes, les biodisponibilités relatives ont été calculées par rapport aux AUC de chacune des formulations testées.

Le profil de libération *in vivo* de l'Ivomec[®] est caractérisé par un fort pic plasmatique ($C_{\max}$: 123,22 ± 2,31 ng/mL) à 8h ($T_{\max}$) (tableau 1). Cependant, suite à l'apparition du pic de concentration maximale, la concentration d'IVM diminue rapidement jusqu'à devenir très faible au bout de 30 jours (< 5ng/mL). En effet, il a été déjà observé une plus grande biodisponibilité pour l'IVM administrée par la voie parentérale lorsqu'elle est dissoute dans des solvants hydrophiles que dans des solvants non hydrophiles (Gonzalez Canga et al., 2009) comme ce le cas de l'Ivomec[®].

Tableau 2. Paramètres pharmacocinétiques d'IVM pour des différents types de formulations injectées chez le rat.

Formulation	Paramètre pharmacocinétique			
	$T_{\max}$ (h)	$C_{\max}$ (ng/mL)	AUC_{0-7j} (ng j/mL)	F_{7j} (%)
Ivomec [®]	8	$123,22 \pm 2,31^{(a)}$	354,51	100
MP-ES	48	$29,92 \pm 3,27^{(c)}$	137,42	38,76
ISI-NMP	24	$57,82 \pm 5,76$	194,38	54,83
ISI-TA	48	$38,94 \pm 7,32$	161,49	45,55
ISM-NMP-O/O	24	$78,85 \pm 4,57^{(b)}$	207,29	58,47
ISM-NMP-O/W	24	$47,77 \pm 7,21^{(b)}$	142,82	40,29

^(a) Statistiquement différente des autres formulations ($P < 0.05\%$).

^(b) Statistiquement différente d'ISI-NMP ($P < 0.05\%$)

^(c) Non Statistiquement différente d'ISI-TA ($P < 0.05\%$)

Puisque l'efficacité d'une molécule antiparasitaire telle que l'IVM, dépend principalement du temps d'exposition du parasite à sa concentration toxique, des niveaux plasmatiques appropriés du principe actif sont souhaitables afin de fournir au patient un traitement adéquat. Si la concentration plasmatique du principe actif est trop importante, des effets indésirables graves, liés à la toxicité de la molécule peuvent survenir suite à l'administration du médicament. En revanche, si la concentration est trop faible pour être toxique pour le parasite, le traitement ne sera pas efficace, le parasite pourra facilement s'installer chez son hôte et des problèmes de résistance à la molécule antiparasitaire peuvent aussi apparaître. C'est pourquoi, pour être efficace dans un traitement à long terme, la solution d'Ivomec[®] 1% doit être administrée régulièrement (tous les 7-14 jours) chez les bovins et les ovins (Merial, 2010).

En regard des paramètres pharmacocinétiques, les formulations réalisées à partir du polymère biodégradable PLA ont eu pour conséquence une prolongation et une meilleure maîtrise de la libération d'IVM. Ces formulations présentent en effet, un plus faible effet « burst » (plus faible $C_{\max}$ par rapport à l'Ivomec[®]) avec une réduction de 36% (pour les ISM-O/O), 53,07% (pour les ISI-NMP), 61,23% (pour les ISM-O/W), 68,39% (pour les ISI-TA) et 75,71 (pour les MP-ES) ce

qui pourrait aller dans le sens d'une libération plus prolongée du principe actif. De plus, le fait d'avoir des $T_{\max}$ décalés (par rapport à l'Ivomec[®]) (8 h), notamment dans le cas des formulations plus visqueuses (ISI-TA) (48h) ou solides (MP-ES) (48h) montrerait également une prolongation de la libération de l'IVM à partir de ces systèmes. Les études statistiques ont permis une différenciation entre certaines formulations particulièrement au niveau de la $C_{\max}$ (tableau 1). Toutes les formulations ont eu un comportement statistiquement différent de celui d'Ivomec[®] ($C_{\max}$: $123,22 \pm 2,31$ ng / mL). Les microparticules préparées par la méthode d'émulsion simple / évaporation de solvant et les ISI-TA ont présenté particulièrement les plus faibles $C_{\max}$, $29,92 \pm 3,27$ et $38,94 \pm 7,32$ ng / mL, respectivement. Ce comportement peut être important lors du contrôle des effets indésirables issus d'un burst important. Par contre, les formulations ISM-NMP-O/O ($C_{\max}$: $78,85 \pm 4,57$ ng / mL), ISI-NMP ($C_{\max}$: $57,82 \pm 5,76$ ng / mL), ISM-NMP-O/W ($C_{\max}$: $47,77 \pm 7,21$ ng / mL) pourraient induire des effets indésirables plus importants même si plus faibles que l'Ivomec[®]. Cependant, puisque que la LD_{50} d'IVM chez le rat suite à une administration sous-cutanée a été déterminée comme étant d'environ 51,5 mg/kg, ce qui représente un marge de sécurité d'environ 200 fois la dose thérapeutique (Dadarkar et al., 2007), aucun des effets toxiques décrit chez le rat tels que ataxie, ptoses et diminution de l'activité (Edwards, 2003) n'a été observé lors des test *in vivo* des formulations. L'importance du contrôle du burst des formulations pourrait être plus remarquable chez le chien ou des effets toxiques issus du traitement avec des lactones macrocycliques sont souvent reportés (FDA, 2003). En particulier, le contrôle de la libération initiale d'IVM peut être un facteur très important lorsque des chiens de race colley doivent être traités avec l'IVM (Collie-Online, 2010). En effet, certains colleys exprimant une mutation de 4-pb (paire de base) dans le gène *mdr1* codant pour la glycoprotéine-P, présentent des effets neurotoxiques graves tels que hyper-salivation, ataxie, cécité, coma et mort à cause d'une accumulation d'IVM au niveau du cerveau. Ces effets sont mis en évidence à des doses 200 fois

plus faibles que celles nécessaires pour induire la même toxicité chez les chiens normaux (Edwards, 2003).

Les formulations de faible libération initiale pourraient également garantir une libération plus prolongée du principe actif. Cependant, si la dégradation du système de libération devient très faible (par exemple à cause de sa faible porosité), pour permettre la libération du principe actif, le système pourrait ne pas suffisamment protéger contre le parasite cible. En effet, en fonction du parasite et de l'hôte à traiter, les concentrations plasmatiques toxiques nécessaires pour le combattre sont différentes et mal établies jusqu'à présent pour la plupart des espèces traitées. Cependant, il semblerait que des concentrations plasmatiques d'IVM entre 0,5 et 1 ng/mL seraient suffisantes pour combattre de façon optimale la plupart des nématodes gastro-intestinaux et pulmonaires (Lifschitz et al., 1999). Ainsi, les ISM-O/W présentant un burst moyenne pourraient être une alternative intéressante afin de trouver un compromis entre la protection contre le parasite et la toxicité chez l'animal hôte.

D'autre part, les AUC plus faibles des formulations testées par rapport à l'Ivomec® (354,51 ng j/mL) montrent également une prolongation de la libération d'IVM. Ceci est aussi mis en évidence par les biodisponibilités relatives (F) correspondantes. Ainsi, la formulation présentant l'AUC la plus faible a été celle des MP-ES (AUC: 137,42 ng j/mL ; F: 38,76%). Comme discuté précédemment, le fait d'être des systèmes solides lors de leur administration, affaiblirait l'effet burst de ces systèmes en comparaison avec les systèmes *in situ*. En revanche, les ISM-NMP-O/O (207,29 ng j/mL; F: 58,47%) et les ISI-NMP (194,38 ng j/mL; F: 54,83), présentant les AUC plus élevées, libérant ainsi une quantité plus importante de leur charge en IVM dans la partie initiale, pourraient avoir une libération moins prolongée du principe actif, ce qui représenterait un problème par rapport au cahier de charge fixé initialement de diminuer le nombre d'administrations.

3.3 Observation des particules en microscopie électronique à balayage:

Un mois après l'administration des différents systèmes *in situ*, certains animaux ont été sacrifiés et une autopsie a été pratiquée. L'observation des tissus environnants le site d'injection des ISM (Fig. 3) et des ISI n'a pas montré de signes de lésions ou d'inflammation. Ces observations uniquement macroscopiques, sont en concordance avec des études ayant montré la faible toxicité des ISM dans les muscle isolé de rat (Kranz et al., 2001; Rungseevijitprapa et al., 2008).

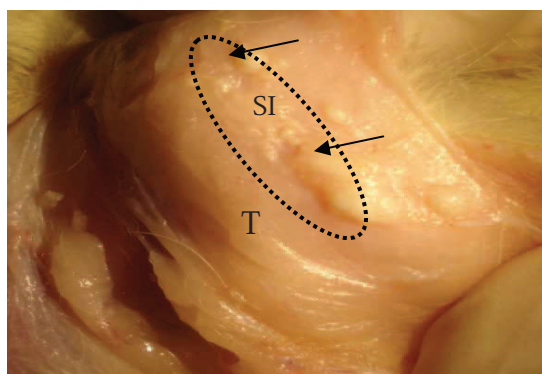
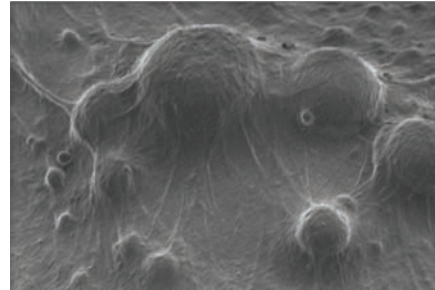
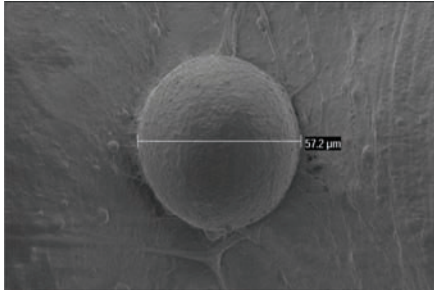


Figure 3 : Photographie du site d'injection d'ISM un mois après administration sous-cutanée. La zone en pointillée notée « SI » délimite le site d'injection dans lequel sont retrouvées la majorité des particules formées dans les tissus. Les flèches indiquent des agglomérats de microparticules autour desquels le tissu s'est organisé. « T » indique le tissu environnant. Aucunes différences de teinte, aucun signe d'irritation n'ont été observés.

Des observations en microscopie électronique à balayage ont permis de mettre en évidence, pour la première fois à notre connaissance, la formation des microparticules *in situ* dans les tissus, suite à l'injection *in vivo* des émulsions O/O ou O/W. Les photographies reportées dans la littérature jusqu'à présent sont issues des essais de formation *in vitro* (Kranz and Bodmeier, 2007). Des microparticules parfaitement sphériques ont ainsi été obtenues (Fig. 4, A-B). Malgré le traitement des tissus prélevés par une solution de trypsine-EDTA, les photographies ont montré des ISM enrobées par les tissus environnants (Fig. 4A). Cette organisation des tissus autour des particules pourrait éventuellement interférer avec la libération de l'IVM en ralentissant sa diffusion vers le

milieu extérieur. Néanmoins, des microparticules libres (non enrobées) (Fig. 4B) ont été observées et leur surface lisse a été ainsi mise en évidence ainsi qu'une certaine hétérogénéité de taille.

A)



B)

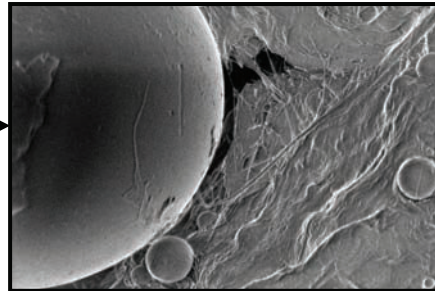
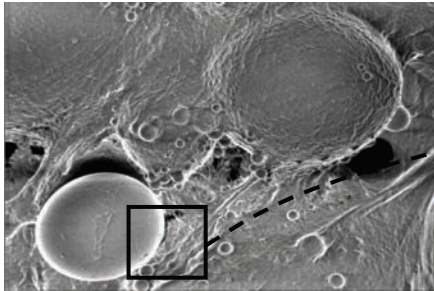


Figure 4. Observation en microscopie électronique d'ISM extraites des tissus traités à la trypsine-EDTA, un mois après administration sous-cutanée. ISM enrobées par les tissus de l'endroit d'injection (A) et « libres » montrant leur surface lisse (b).

4. Conclusions

Plusieurs systèmes biodégradables pour la libération prolongée d'IVM ont été proposés et leur capacité à libérer le principe actif *in vitro* et *in vivo* a été testée. Cette étude a montré une concordance des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* et l'importance du choix du solvant utilisé dans les systèmes *in situ*. Une maîtrise de la libération et une libération prolongée ont été mises en évidence. Les systèmes *in situ* représentent donc une alternative pour les traitements à long terme des parasitoses chez l'animal. La facilité de la préparation et d'administration des ISM ainsi que leur bonne performance et la relative uniformité des microparticules obtenues suite à leur administration, font de ces microparticules des systèmes très intéressants pour l'obtention de systèmes à libération prolongée. Néanmoins, les profils pharmacocinétiques obtenus avec ces systèmes doivent encore être validés par des essais d'efficacité *in vivo* sur le parasite cible, confirmant l'activité thérapeutique de l'IVM ainsi formulée et l'efficacité des doses délivrées par de tels systèmes.

5. References

- Bassissi, F., Lespine, A., Alvinerie, M., 2006. Assessment of a liposomal formulation of ivermectin in rabbit after a single subcutaneous administration. *Parasitol Research* 98, 244-249.
- Bodmeier, R., 1998. Mutiphase system. Int. Patent Application WO 98/55100.
- Brodbeck, K. J., DesNoyer, J. R., McHugh, A. J., 1999. Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery: Part II. The role of solution thermodynamics and bath-side mass transfer. *Journal of Controlled Release* 62, 333-344.
- Camargo, J. A., Sapin, A., Daloz, D., Maincent, P., 2010. Ivermectin-loaded microparticles for parenteral sustained release: in vitro characterization and effect of some formulation variables *Journal of microencapsulation*. Article in Press.
- Clark, S. L., Crowley, A. J., Schmidt, P. G., Donoghue, A. R., Piche, C. A., 2004. Long-term delivery of ivermectin by use of poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid microparticles in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 65, 752-757.
- Collie-Online, 2010. Mdr1: Quand la génétique s'en mêle. (01 septembre 2010) Doc. [En ligne] - Adresse URL :<http://www.collie-online.com/colley/mdr1/index.htm>.
- Dadarkar, S. S., Deore, M. D., Gatne, M. M., 2007. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 47, 257-260.
- De Montigny, P., Shim, J. S. K., Pivnichny, J. V., 1990. Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 8, 507-511.
- Dunn, R. L., English, J. P., Cowsar, D. R., Vanderbilt, D. P., 1990. Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same, US Patent 4,938,763. July 3.
- Edwards, G., 2003. Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria Journal*, 1-6.

- FDA, 2003. U.S. Food and Drug Administration. Advisory Committees. Veterinary Medicine Advisory Committee. (07 august 2010) Doc. [En ligne] - Adresse URL: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/VeterinaryMedicineAdvisoryCommittee/UCM127121.pdf>.
- Gonzalez Canga, A., Sahagun Prieto, A. M., Jose Diez Liebana, M., Martinez, N. F., Vega, M. S., Vieitez, J. J., 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *Vet J* 179, 25-37.
- Hasan, A. S., Socha, M., Lamprecht, A., Ghazouani, F. E., Sapin, A., Hoffman, M., Maincent, P., Ubrich, N., 2007. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *International Journal of Pharmaceutics* 344, 53-61.
- Hatefi, A., Amsden, B., 2002. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 80, 9-28.
- Im-Emsap, W., 2002. Dissertation: In vitro and in vivo properties of injectable biodegradable in situ forming microparticle systmes. Faculty of Biology, Chemistry and Pharmacy. Freie Universität Berlin. Germany, Berlin.
- Kranz, H., Bodmeier, R., 2007. A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 332, 107-114.
- Kranz, H., Bodmeier, R., 2008. Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: In situ implants versus in situ microparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 34, 164-172.
- Kranz, H., Brazeau, G. A., Napaporn, J., Martin, R. L., Millard, W., Bodmeier, R., 2001. Myotoxicity studies of injectable biodegradable in-situ forming drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 212, 11-18.

- Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A., Lanusse, C., 2007. Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: Absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Veterinary Parasitology* 147, 303-310.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Pis, A., Imperiale, F., Sanchez, S., Alvarez, L., Kujanek, R., Lanusse, C., 1999. Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Veterinary Parasitology* 86, 203-215.
- Liu, X., Sun, Q., Wang, H., Zhang, L., Wang, J. Y., 2005. Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. *Biomaterials* 26, 109-115.
- Loffler, D., Ternes, T. A., 2003. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1021, 133-144.
- Luan, X., Bodmeier, R., 2006a. In situ forming microparticle system for controlled delivery of leuprolide acetate: influence of the formulation and processing parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27, 143-149.
- Luan, X., Bodmeier, R., 2006b. Influence of the poly(lactide-co-glycolide) type on the leuprolide release from in situ forming microparticle systems. *Journal of Controlled Release* 110, 266-272.
- Maeda, H., Brandon, M., Sano, A., 2003. Design of controlled-release formulation for ivermectin using silicone. *International Journal of Pharmaceutics* 261, 9-19.
- Merial, 2010. Ivomec 1% Injectable. Technical information.
- Miller, J. A., Davey, R. B., Oehler, D. D., Pound, J. M., George, J. E., Ahrens, E. H., 1999. Control of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae) on cattle using injectable microspheres containing ivermectin. *Journal of Economic Entomology* 92, 1142-1146.
- Miller, J. A., Oehler, D. D., Pound, J. M., 1998. Delivery of ivermectin by injectable microspheres. *Journal of Economic Entomology* 91, 655-659.

OVF, 2004. Office Vétérinaire Fédéral. Prélèvements de sang chez les rongeurs de laboratoire et les lapins à des fins expérimentales.

Prieto, J. G., Merino, G., Pulido, M. M., Estevez, E., Molina, A. J., Vila, L., Alvarez, A. I., 2003. Improved LC method to determine ivermectin in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31, 639-645.

Rungseevijitprapa, W., Bodmeier, R., 2009. Injectability of biodegradable in situ forming microparticle systems (ISM). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 36, 524-531.

Rungseevijitprapa, W., Brazeau, G. A., Simkins, J. W., Bodmeier, R., 2008. Myotoxicity studies of O/W-in situ forming microparticle systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69, 126-133.

Shah, N. H., Railkar, A. S., Chen, F. C., Tarantino, R., Kumar, S., Murjani, M., Palmer, D., Infeld, M. H., Malick, A. W., 1993. A biodegradable injectable implant for delivering micro and macromolecules using poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) copolymers. *Journal of Controlled Release* 27, 139-147.

Wischke, C., Schwendeman, S. P., 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 364, 298-327.

4. DISCUSSION GENERALE

4 DISCUSSION GENERALE

4.1 Contexte

L'ivermectine (IVM) est une des molécules antiparasitaires les plus efficaces utilisées dans le domaine vétérinaire. Elle appartient à la classe II du système de classification biopharmaceutique (Amidon et al., 1995). Cependant, les problèmes de biodisponibilité orale que présente cette molécule ont conduit à son administration par voie parentérale. Les quelques formes injectables permettant la libération prolongée d'IVM disponibles sur le marché, correspondent à des solutions concentrées conduisant à une précipitation du principe actif au site d'application suite à la diffusion du solvant. Cependant, ces formulations présentent des problèmes tels que l'irritation au site d'administration ainsi qu'une forte libération initiale. De plus, ce type de formulation ne permet la libération du principe actif que pendant quelques jours d'où la nécessité d'une administration répétée. Cette problématique ainsi que la nécessité de compter de plus en plus sur des produits plus sûrs, performants et élaborés par des méthodes de fabrication facilement industrialisables, sont à la base des objectifs proposés dans ce travail de recherche.

4.2 Conception des systèmes de libération

Afin d'obtenir des systèmes parentéraux permettant la libération prolongée de l'IVM tout en étant en même temps biodégradables et biocompatibles, les polymères de l'acide lactique et/ou glycolique (PLA et PLGA) ont été choisis comme matériaux permettant le contrôle de la libération du principe actif. Ces polymères ont été déjà utilisés pour l'obtention de produits parentéraux à libération prolongée pour de nombreux principes actifs lipophiles et font l'objet de formes commercialisées ce qui représente un avantage notamment concernant leur sécurité d'emploi ainsi que la littérature scientifique disponible. La sécurité largement étudiée et démontrée de ces polymères représente une garantie face aux problèmes indésirables pouvant être liées aux adjuvants

de formulation. De plus, la faible dose à laquelle le principe actif agit (200-500 $\mu\text{g/kg}$) constitue également un avantage, vu la large plage d'espèces animales qui peuvent être ciblées par les formulations développées. Enfin, le choix de méthodes de fabrication simples et facilement industrialisables tels que les ISI et les ISM est privilégié pour des raisons économiques. Ainsi, une méthodologie comparative de la méthode classique de préparation de microparticules dite par émulsion et évaporation de solvant par rapport aux méthodes plus simples (ISI et ISM) a été choisie afin de mettre en évidence les avantages de ces deux dernières méthodes.

4.3 Etudes de préformulation et formulation

Pour le développement des systèmes parentéraux à libération prolongée, une analyse du rapport entre les propriétés physico-chimiques du principe actif et les méthodes de préparation a été réalisée (Fig. 18) ;

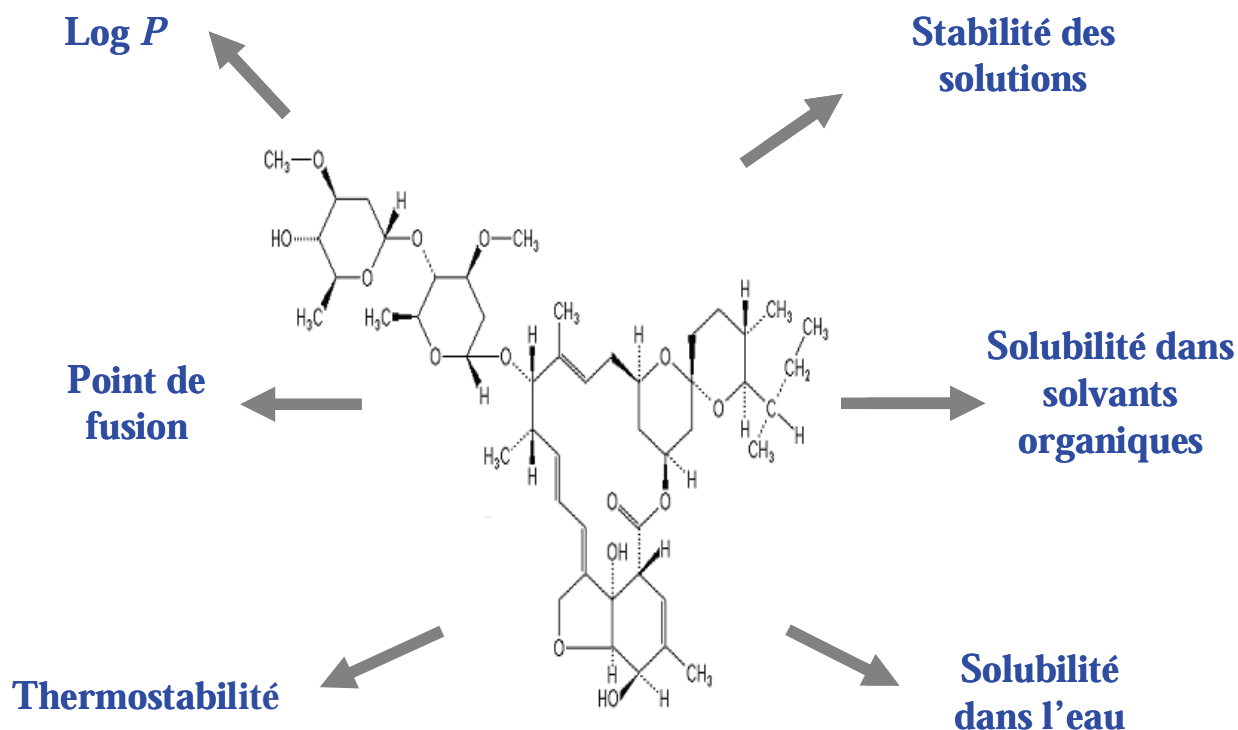


Figure 24. Principales propriétés physico-chimiques d'IVM à prendre en compte pour la formulation

La connaissance des propriétés physico-chimiques précédentes a conduit au choix des méthodes de fabrication mais a également permis la meilleure compréhension des interactions du principe actif avec les adjuvants utilisés dans chacune des méthodes. Ainsi, la méthode d'émulsion simple - évaporation du solvant a été choisie comme méthode de fabrication classique pour les microparticules chargées en IVM (chapitre 3.2) car elle est connue pour permettre généralement une encapsulation optimale des principes actifs hydrophobes (Wischke and Schwendeman, 2008). De même, la forte interaction entre l'IVM et les polymères utilisés pour la fabrication de ces particules, liée à leur lipophilie similaire, a été mise en évidence par les essais de caractérisation physique : DSC (Dubernet, 1995), et DRX (Hausberger and DeLuca, 1995), taux d'encapsulation et test de libération *in vitro*. Ainsi, la faible libération du principe actif à partir de ces particules et le taux d'encapsulation élevé, ont été expliqués par la forte affinité entre le principe actif ($\log P=3,22$) et les polymères, mais aussi par la faible porosité des microparticules observée par microscopie électronique à balayage (SEM). De plus, la connaissance des caractéristiques physico-chimiques des polymères choisis pour les études a permis d'expliquer les comportements observés pendant les tests de libération d'IVM. En effet, trois types de polyesters biodégradables ont été choisis pour les études; un PLGA (H) avec sa terminaison acide libre (-COOH) (non end-capped), et un PLGA et un PLA (S) avec leur terminaisons acides estérifiées (-COOR) (end-capped). En raison des différentes compositions chimiques, des temps de dégradation variables selon les polymères, une libération également différente du principe actif était attendue. Cette hypothèse a été confirmée par les tests de libération du principe actif *in vitro*. Dans un premier temps, la très faible solubilité dans l'eau de l'IVM a été à l'origine du milieu de libération choisi pour les tests de dissolution à savoir tampon phosphate pH 7,4 contenant le tensioactif Tween 80 à 2% m/v. Ce milieu permet en effet d'assurer des conditions « sink » pour la libération du principe actif. Dans les conditions « sink », la libération du principe actif n'est plus dépendante de sa solubilité dans le milieu considéré mais reflète alors le réel comportement de la forme pharmaceutique considérée. Un milieu de libération contenant du

SDS à 0,25% s'est également révélé intéressant pour les tests de libération d'IVM. En effet, l'ajout de tensioactifs aux milieux de libération pour les tests de dissolution de molécules très hydrophobes permet l'obtention des conditions « sink » mais aussi, l'observation nette des effets de matrice (e.x. polymères).

Les microparticules réalisées par la méthode classique de simple émulsion - évaporation de solvant ont été une référence pour les études suivantes de formulation des systèmes *in situ* (ISI et ISM). Cependant, s'agissant des systèmes administrés à l'état liquide, solutions (ISI) ou émulsions (ISM), la connaissance d'autres paramètres physico-chimiques est également importante afin de formuler plus rationnellement ces systèmes de libération. En effet, dans le cas des systèmes préformés tels que les microparticules réalisées par la méthode d'émulsion simple, le durcissement du système de libération est réalisé avant qu'une quelconque libération du principe actif soit effective, *in vitro* ou *in vivo*. Autrement dit, le temps de latence (« lag time ») nécessaire pour que la solution polymérique de la phase interne (O/W) puisse être transformée en microparticule, a lieu avant que la libération s'exerce. Ainsi, le temps de latence, n'affecte pas, au moins directement, la libération du principe actif. En revanche, quand il s'agit de systèmes de formation *in situ*, le problème devient plus complexe, et il est nécessaire que les microparticules soient formées le plus rapidement possible. La dynamique de la formation de ces systèmes, est fortement liée aux propriétés physico-chimiques des solvants biocompatibles et des polymères utilisés et notamment aux interactions du couple solvant / polymère. Ainsi, lors du chapitre 3.3, les études ont été focalisées sur la meilleure compréhension de ce phénomène et de son impact sur la libération de l'IVM. Puisque dans les ISM, la phase interne est une solution polymérique (ISI), les expériences ont été réalisées sur des ISI en partant du principe que la connaissance de ces systèmes était fondamentale pour mieux comprendre les ISM.

C'est pourquoi l'influence des propriétés physico-chimiques des solvants biocompatibles utilisés et du comportement des polymères dans ces solvants, sur la vitesse de libération du principe actif, a été l'un des sujets d'étude principaux. Le tableau 19 résume les facteurs fondamentaux déterminant la libération d'IVM à partir des ISI. En effet, des propriétés telles que la solubilité dans l'eau des solvants et la viscosité des solutions polymériques ont été très utiles pour mieux comprendre les différences observées dans les profils de libération d'IVM.

Tableau 3. Propriétés physico-chimiques modifiant la libération d'IVM à partir des ISI

Propriété	Effet induit	
	Temps de latence	« Burst »
Solubilité aqueuse du solvant	↓ avec la solubilité	↑ avec la solubilité
Viscosité du solvant	↑ avec la viscosité	↓ avec la viscosité
Viscosité solution polymérique	↑ avec la viscosité	↓ avec la viscosité
Concentration du polymère	↑ avec la concentration	↓ avec la concentration

Les propriétés des solutions polymériques ont été étudiées en termes d'interactions polymère/solvant à l'aide des paramètres de solubilité de Hansen (HSP). Ainsi, il a été observé que l'utilisation de « bons » solvants des polymères tels que la NMP et la 2P dont les interactions solvant/polymère sont plus fortes, conduisaient à l'obtention de solutions de plus faible viscosité que celles obtenues avec les « mauvais » solvants pour lesquels les interactions polymère/polymère sont plus importantes. Les mauvais solvants des polymères, tels que la TA et le BB, ont été également caractérisés par des faibles solubilités dans l'eau ce qui représente toutefois une alternative intéressante pour contrôler la libération initiale de l'IVM. Ainsi, le chapitre 3.3 expose une méthode de « screening » afin de mieux choisir un solvant ou un système de solvants permettant l'obtention du profil de libération souhaité. Dans cette étude, le polymère PLA a été choisi car les résultats des expériences préliminaires ont démontré une plus faible libération du principe actif à partir des implants réalisés en utilisant ce polymère (Fig. 25).

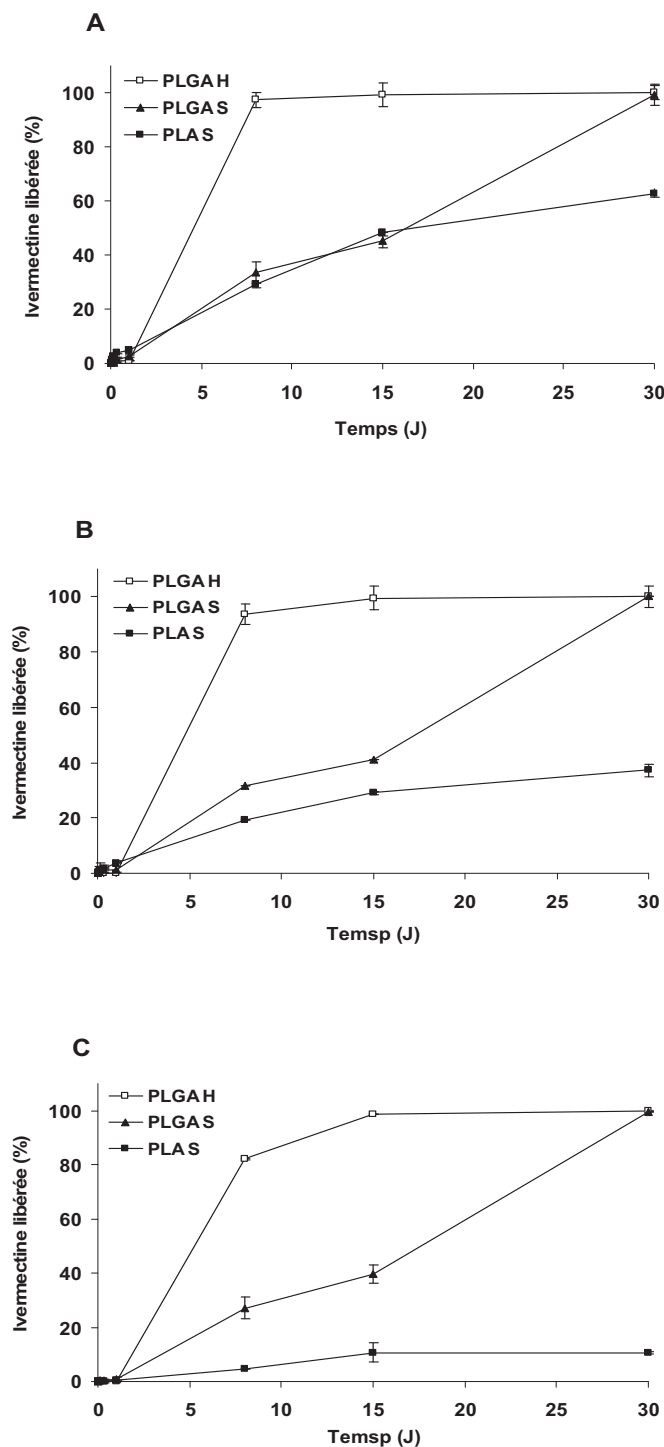


Figure 25. Profils de libération d'IVM à partir d'ISI réalisés en utilisant trois polyesters et trois solvants différents ; (A) NMP, (B) 2P et (C) TA.

En effet, d'un point de vue théorique, le PLA était le polymère le plus intéressant car sa vitesse de dégradation plus faible permettait de prolonger le temps de libération de l'antiparasitaire. Comme discuté dans les chapitres précédents, l'efficacité d'un traitement antiparasitaire dépend du temps

pendant lequel le parasite est exposé à la dose toxique. Ainsi, une libération trop importante du principe actif peut entraîner des effets toxiques pour le patient et compromettre le temps de libération prolongée à partir du système de libération. En revanche, une trop faible libération peut conduire à l'inefficacité du traitement et à l'apparition de résistances à l'antiparasitaire.

Le temps de libération du principe actif à partir du système de libération est aussi critique d'un point de vue économique étant donné des problèmes de prix auxquels sont soumis les produits vétérinaires et le coût des matières premières telles que les polyesters de l'acide lactique et / ou glycolique. Ainsi, l'obtention de conditions de formulation permettant un bon rapport durée d'action, concentration toxique pour le parasite et prix est fortement désirée.

Au cours du chapitre 3.3, la stabilité des solutions des polymères et du principe actif dans les solvants biocompatibles a été également abordée. La stabilité des solutions polymériques est un aspect très important dans la formulation des ISI. En effet, la combinaison solvant/polymère/principe actif doit non seulement fournir un profil de libération approprié vis-à-vis des impératifs thérapeutiques et des prix, mais aussi garantir la stabilité du produit. Ainsi, il a été observé une dégradation plus élevée, autant des polymères que du principe actif, dans les solvants présentant le « burst » le plus important à savoir, la NMP et la 2P. De ce fait, ces solvants ne constituaient pas des solvants de choix pour la libération d'IVM à partir des ISI. Par contre, la TA et le BB, étant moins hydrophiles et possédant des interactions moins fortes avec l'IVM et les polymères, ont abouti à des ensembles solvant/polymère/principe actif plus stables. Cependant, lors des tests de dissolution, l'injection de ces derniers systèmes s'est révélée plus difficile en raison de leur plus grande viscosité. Compte tenu de la simplicité de préparation et des profils de libération obtenus avec les ISI par rapport à ceux des microparticules obtenues par la méthode d'émulsion simple / évaporation de solvant, ces systèmes nous paraissent plus intéressants pour la libération

prolongée d'IVM. Cependant, comme discuté précédemment, les solutions polymériques les plus intéressantes du point de vue du profil de libération (à base de TA et de BB) ont été celles pour lesquelles l'injectabilité a été la plus faible.

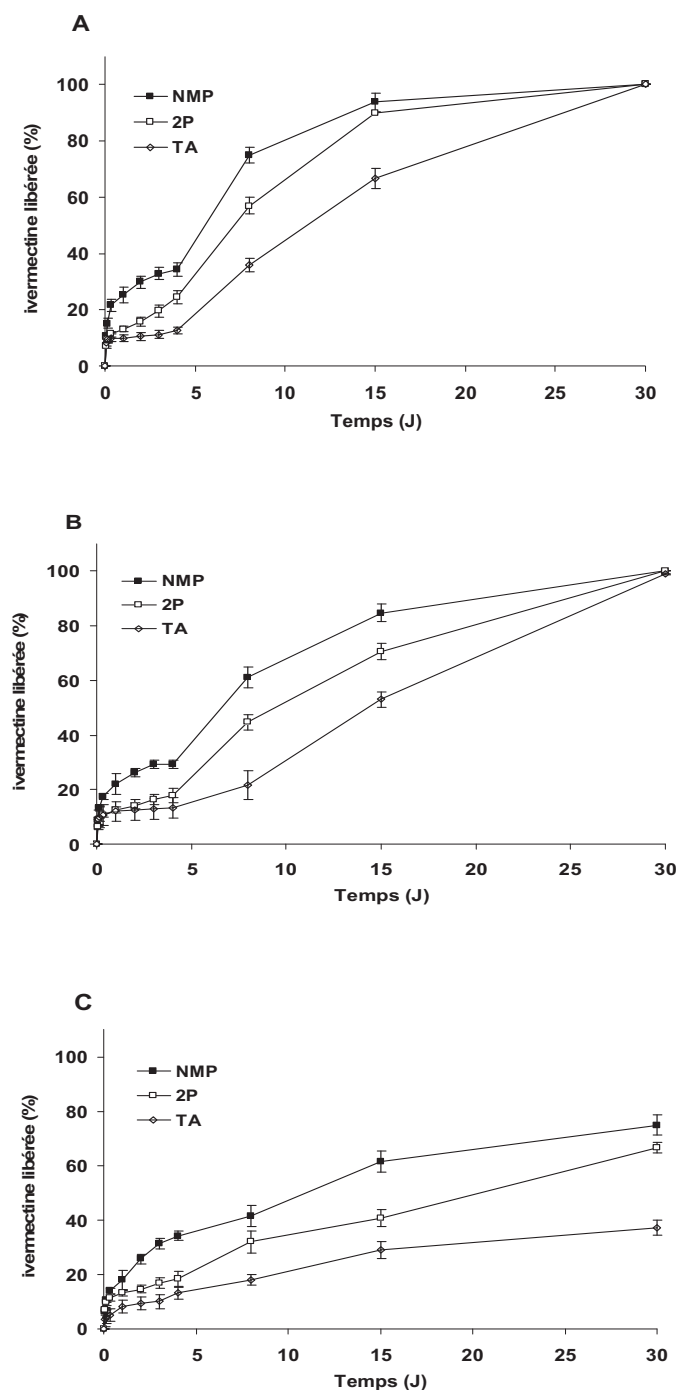


Figure 26. Profils de libération d'IVM à partir d'ISM réalisés en utilisant trois solvants et trois polymères différents ; (A) PLGA H, (B) PLGA S et (C) PLA S.

C'est pour cette raison que nous nous sommes tournés vers les ISM, connues pour être des systèmes plus facilement injectables dont les études de caractérisation ont été décrites dans la dernière partie des travaux expérimentaux (chapitre 3.4). Ainsi, les tests *in vitro* de libération d'IVM à partir des ISM-O/O réalisées avec des solvants hydrophiles tels que la NMP et la 2P, et des ISM-O/W réalisées à partir de la TA ont montré des résultats intéressants (Fig. 26). Les polymères PLA S, PLGA H et PLGA S ont été testés afin d'observer l'effet du polymère sur la vitesse de libération d'IVM. L'impact de la méthode de préparation des ISM a également été observé.

De façon similaire au comportement des ISI, l'IVM a été libérée plus rapidement à partir des ISM réalisées avec les solvants les plus hydrophiles. Cependant, la plus grande surface spécifique des ISM conduit à une libération initiale d'IVM plus élevée par rapport aux ISI. Bien qu'un peu plus élevé, le « burst » des ISM-O/W a été similaire à celui des ISI réalisés en utilisant la TA comme solvant biocompatible. De ce fait, les ISM-O/W se sont révélées très intéressantes pour plusieurs raisons industrielles et thérapeutiques telles que: i) la facilité de préparation, ii) la facilité d'injection, iii) le faible « burst » et iv) la libération prolongée. En revanche, les ISM-O/O ne représentent pas une bonne alternative car ces systèmes ne favorisent pas l'incorporation du principe actif dans les microparticules en raison des caractères lipophiles autant du principe actif que de la phase externe (huile végétale). Comme il a été expliqué dans le chapitre 3.3, la solubilité de l'IVM dans la TA est relativement faible (75 mg/mL) par rapport à celle dans la NMP (> 500 mg/mL). Cependant, en raison de son Log *P*, l'affinité de l'IVM pour la phase externe des ISM-O/W est moins importante que celle dans les ISM-O/O où la phase externe est huileuse. De ce fait, ces derniers systèmes ont été utilisés notamment pour l'encapsulation de principes actifs hydrophiles donc avec une faible affinité par la phase externe (Im-Emsap, 2002).

4.4 Toxicité cellulaire

Comme cela a été décrit dans l'étude bibliographique, la toxicité des solvants biocompatibles utilisés dans la préparation des systèmes *in situ* est un aspect très important à prendre en compte lors de la formulation de ces systèmes. Ainsi, la toxicité des solvants que nous avons sélectionnés a été testée sur des macrophages alvéolaires de rat (souche NR8383) à l'aide d'un test MTT (Figure 30) de façon à vérifier les résultats décrits dans la littérature et étudier la cytotoxicité des solvants utilisés dans les formulations développées.

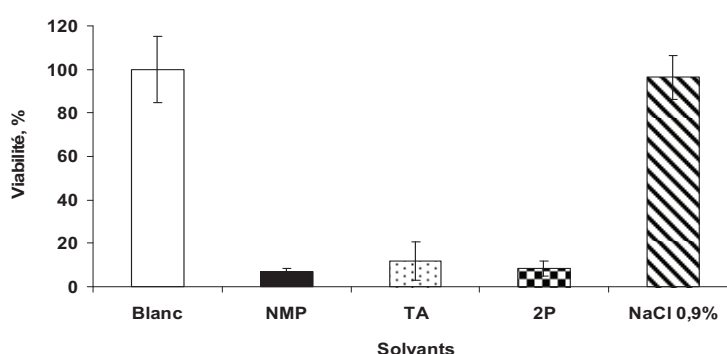


Figure 27. Toxicité des solvants biocompatibles utilisés dans les formulations *in situ* sur des macrophages alvéolaires de rat NR8383 par la méthode du MTT. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart type. ($n=8$).

Puisque les macrophages sont des cellules médiatrices de la réponse inflammatoire lorsque l'organisme est soumis à des agents toxiques (Laskin, 2009), leur niveau de résistance aux agents xénobiotiques tels que les solvants peut être considéré comme un indicatif de toxicité. Ainsi, l'hypothèse était que, plus la viabilité des macrophages en présence des solvants est importante, moins le solvant était toxique. Le test MTT est un essai colorimétrique relativement simple mesurant l'activité déshydrogénase mitochondriale. En effet, les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes clivent l'anneau tétrazolium du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium induisant la formation de cristaux pourpres de formazan insolubles dans l'eau. La quantité de précipité formé est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également

à l'activité métabolique de chaque cellule). Ainsi, la mesure spectrophotométrique à 550 nm de la couleur développée (suite à la solubilisation des cristaux de formazan dans le DMSO), permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement. D'après les résultats du test, les trois solvants se sont révélés cytotoxiques envers les macrophages. En effet, des pourcentages de viabilité avoisinant pour les trois solvants testés les 10% ont été observés. Des résultats dans le même sens ont été obtenus lors de tests de myotoxicité de ces solvants. La NMP a montré une myotoxicité plus importante que la 2P (Kranz et al., 2001). En revanche, la myotoxicité de la TA par rapport à celle de solvants hydrophiles n'a pas été encore reportée dans la littérature. Ces résultats doivent être analysés attentivement car ils représentent la toxicité des solvants purs. Lorsque les solvants sont utilisés dans la formulation d'ISI ou d'ISM, la concentration et donc la toxicité due aux solvants sont plus faibles (Rungseevijitprapa et al., 2008).

4.5 Etudes in vivo

4.5.1 Libération in vivo et biodisponibilité

Les principaux résultats des tests effectués chez le rat sont résumés dans le chapitre 4. En ce qui concerne la libération du principe actif, le modèle animal a répondu d'une façon similaire aux conditions *in vitro*. Notamment, l'effet « burst » observé *in vitro* pour les formulations testées a été retrouvé d'une façon relativement claire d'après les tests statistiques. En même temps, les paramètres pharmacocinétiques étudiés ont montré l'effet prolongé (notamment dans le cas des formulations à base de PLA S réalisées avec la TA) dans la libération de l'IVM. Bien que les paramètres pharmacocinétiques représentent une bonne approche pour connaître la biodisponibilité d'un principe actif, il n'existe pas de relation directe entre ces paramètres et l'effet thérapeutique, notamment dans le cas des parasitoses où différentes souches ou variétés du parasite doivent être éradiquées.

De ce fait, des études d'efficacité doivent être encore réalisées afin de vérifier si les formulations proposées dans ce travail, dont la libération de l'IVM a été la plus prolongée, possèdent l'effet antiparasitaire souhaité. Ceci pourrait, par exemple, être étudié de la façon suivante : dans le cas du traitement du « ver du cœur » chez le chien, en utilisant des microparticules de PLGA chargées en IVM, l'efficacité du traitement antiparasitaire pourrait être mesurée par comparaison, après nécropsie des animaux, du nombre de vers du cœur trouvés dans les individus traités par rapport au groupe contrôle (non traité et infesté) (Clark et al., 2004). Le pourcentage d'efficacité serait alors été déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ efficacité} = [(\text{Nb de vers groupe contrôle}) - (\text{Nb de vers groupe traité})] / \text{Nb de vers groupe contrôle} \times 100\%$$

4.5.2 Douleur et injectabilité des formes proposées

La douleur générée chez les animaux lors de l'administration des formulations, a été variable en fonction des solvants et du système de libération injecté. De façon générale, les solvants purs ont généré une douleur plus forte chez les animaux par rapport aux ISI, qui eux même ont généré une plus forte douleur que les ISM. La douleur ressentie par les animaux a été la plus élevée lorsque le solvant le plus hydrosoluble (NMP) a été utilisé. Ce comportement peut être lié au « burst » des formulations tel que décrit dans la dernière partie des travaux expérimentaux. En effet, étant plus soluble dans l'eau donc diffusant plus rapidement vers les tissus environnant le site d'injection, la concentration de NMP dans ces tissus est plus importante, d'où une probabilité plus élevée d'endommager les tissus. Le tableau 4 présente un classement de la douleur induite par l'injection des formulations, réalisé suite aux simples observations du comportement des animaux durant les expérimentations (système qualitatif).

Tableau 4. Niveaux de douleur observés chez les rats lors de l'administration des différentes formulations

Formulation	Douleur
MP-ES	+
ISI-NMP	+++
ISI-TA	++
ISM-NMP-O/O	++
ISM-NMP-O/W	++

+ (Faible) ; ++ (Modérée) ; +++ (Forte)

D'après des résultats de toxicité cellulaire et de douleur apparente suite à l'injection des formulations, la NMP est un solvant présentant une toxicité plus élevée et qui nous paraît donc moins intéressant pour la formulation des systèmes *in situ* par rapport à la TA. En revanche, en ce qui concerne l'injectabilité des formulations, il a été observé une meilleure injectabilité des formulations proposées à base de NMP (« bons » solvant) par rapport à celles à base de TA (« mauvais » solvant), notamment dans le cas des ISI. Par contre, lorsque les ISM ont été formulées, la différence apparente a été très faible car les deux formulations ISM-O/O et ISM-O/W ont présenté pratiquement la même injectabilité. Ceci peut être expliqué par l'effet des phases externes des émulsions, lesquelles déterminent dans une grande mesure, la viscosité des formulations (Kranz and Bodmeier, 2007).

Tableau 5. Injectabilité apparente des formulations chez le rat

Formulation	Injectabilité
MP-ES	+++
ISI-NMP	++
ISI-TA	+
ISM-NMP-O/O	+++
ISM-NMP-O/W	+++

+++ (Bonne) ; ++ (Moyenne) ; + (Mauvaise)

Bien que des méthodes quantitatives plus précises, pour déterminer l'injectabilité des formulations, ont été déjà développées (Rungseevijitprapa and Bodmeier, 2009), le tableau précédent (tableau 4) résume les observations issues des expérimentations *in vivo* réalisées.

4.6 Perspectives

En ce qui concerne la formulation des systèmes *in situ*, ce travail peut être poursuivi par l'utilisation de PLA de plus faible masse molaire qui diminuerait la viscosité des formulations améliorant ainsi leur injectabilité et le processus de fabrication. Ceci peut être spécialement intéressant dans le cas des ISI réalisés à partir des « mauvais » solvants des polyesters tels que la TA où l'IVM s'est montrée très stable. Puisque la réduction de la viscosité des phases polymériques (ISM) peut entraîner une augmentation du « burst » des formulations (notamment dans le cas des ISM-O/W), il pourrait être possible de corriger ce problème par une augmentation du rapport phase externe/phase interne. Ce changement entraînerait également une réduction du coût de la formulation. L'addition de stabilisants tels que des antioxydants, améliorant la stabilité de l'IVM, peut être un aspect intéressant à étudier afin de prolonger le temps de péremption des formulations plus attractives tels que les ISM-O/W.

Par rapport à la performance des formulations *in vivo*, des essais d'efficacité antiparasitaire pourraient être envisagés avec les formulations les plus intéressantes. A ce propos, la mise en place d'un modèle de parasitose chez le rat (qui n'a pas été encore décrit à notre connaissance) pourrait permettre une évaluation préliminaire et le « screening » des formulations avant de les tester chez l'animal cible. De même, afin de réduire le nombre d'études à réaliser sur l'animal, le développement d'un test d'efficacité accéléré contre le parasite *in vitro*, peut toutefois être une alternative innovante, moins coûteuse et rapide. Enfin, pour les formulations d'ISM-O/W l'ajout d'un anesthésique locale (par exemple procaine) dans la phase externe aqueuse, pourrait se révéler

intéressant afin de soulager de la douleur induite par le solvant, améliorant ainsi le confort du patient.

5. CONCLUSION

5 CONCLUSION

Dans ce travail, trois systèmes parentéraux biodégradables pour la libération prolongée d'ivermectine, un principe actif antiparasitaire faiblement biodisponible par la voie orale (BCS-Classe II), ont été préparés, testés et comparés *in vitro* et *in vivo*. Les méthodes de formulation utilisées ont compris: i) celle classique, dite par émulsion simple - évaporation de solvant, couramment utilisée pour l'incorporation de principes actifs lipophiles et ii) deux plus nouvelles, permettant la formation d'implants et de microparticules *in situ*. Pour chacune de ces préparations, une caractérisation physicochimiques poussée et une évaluation chez l'animal des principaux paramètres pharmacocinétiques ont été réalisées. Au regard des résultats, les trois méthodes ont permis de moduler la libération du principe actif en fonction du polymère utilisé. La libération la plus prolongée a été obtenue pour les formes à base des polymères les plus hydrophobes selon l'ordre suivant : PLGA H>PLGA S>PLA S.

Dans le cas des microparticules obtenues par la méthode d'émulsion simple - évaporation de solvant, la libération du principe actif a été ralentie par la faible porosité obtenue et par la forte interaction entre les polymères et le principe actif. Cependant, il a été démontré que la libération du principe actif peut être accélérée par l'ajout de PVP, agent formateur de pores et rendant la matrice des microparticules « plus hydrophile ». De plus, la formation d'un complexe IVM:PVP, plus hydrophile que le principe actif seul, a été également proposé comme étant à l'origine de la libération plus rapide constatée du principe actif à partir de ces systèmes.

En ce qui concerne les systèmes *in situ*, une étude systématique a été réalisée sur différents solvants pour déterminer quelles étaient les caractéristiques physicochimiques à prendre en compte pour ce type de formulation et pour moduler la vitesse de libération d'IVM. Une méthodologie de « screening » a été utilisée pour sélectionner les solvants. Les systèmes les plus appropriés pour la

formulation d'IVM ont été ceux formulés à base de TA, compte tenu de la stabilité du principe actif dans ce solvant, de sa faible libération initiale et de la prolongation plus élevée de sa libération. Les inconvénients d'injectabilité reliés aux viscosités importantes des ISI à base de TA ont été surmontés par la formulation du principe actif sous la forme d'ISM-O/W. La formation de ces systèmes dans les tissus, plus facilement injectables et permettant une libération prolongée du principe actif, a été constatée chez le rat par des images de microscopie électronique à balayage. La faisabilité de formation et l'innocuité apparente évaluée par les observations des tissus environnants au site de l'injection, font de ces systèmes une alternative très intéressante aux microparticules obtenues par émulsion simple - évaporation de solvant.

La pertinence des résultats issus des tests de libération d'IVM *in vitro* et *in vivo* doit être confrontée à des tests d'efficacité vis-à-vis d'un parasite cible type *Dirofilaria immitis*, prouvant ainsi la conservation de l'activité de l'IVM à la suite de la formulation et la libération du principe actif à des doses thérapeutiques.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, A. R., Dashevsky, A., Bodmeier, R., 2010. Drug release from and sterilization of in situ cubic phase forming monoglyceride drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75, 375-380.
- Ahmed, I., Kasraian, K., 2002. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 871-882.
- AHS, 2010. How Heartworm Happens: The Life Cycle. American Heartworm Society. (19 Août 2010) Doc. [En ligne] - Adresse URL: <http://www.heartwormsociety.org/pet-owner-resources/heartworm.html>.
- Alfrey, T., 1947. The influence of solvent composition on the specific viscosities of polymer solutions. *Journal of Colloid Science* 2, 99-114.
- Alonso, M. J., Gupta, R. K., Min, C., Siber, G. R., Langer, R., 1994. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine* 12, 299-306.
- Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., Crison, J. R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research* 12, 413-420.
- Anderson, J. M., Shive, M. S., 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 5-24.
- Arifin, D. Y., Lee, L. Y., Wang, C. H., 2006. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 1274-1325.
- Bailey, J. W., Barker, R. L., Karlstad, M. D., 1992. Total parenteral nutrition with short- and long-chain triglycerides: Triacetin improves nitrogen balance in rats. *Journal of Nutrition* 122, 1823-1829.

- Barton, A. F. M., 1991. Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters. 2 edition. CRC Press. Boca Raton. Florida. pp. 385-390.
- BASF, 1991. Technical Information, Soluphor P. 2-pyrrolidone as a solvent for the pharmaceutical industry. Me 139e.
- Bassissi, F., Lespine, A., Alvinerie, M., 2006. Assessment of a liposomal formulation of ivermectin in rabbit after a single subcutaneous administration. Parasitology Research 98, 244-249.
- Bastioli, C., 2005. Handbook of biodegradable polymers. Rapra Technology, 540.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., Gurny, R., 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57, 19-34.
- Bhardwaj, R., Blanchard, J., 1997. In vitro evaluation of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymer-based implants containing the α -melanocyte stimulating hormone analog, Melanotan-I. Journal of Controlled Release 45, 49-55.
- Blanco-Prieto, M. J., Campanero, M. A., Besseghir, K., Heimgatner, F., Gander, B., 2004. Importance of single or blended polymer types for controlled in vitro release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres. Journal of Controlled Release 96, 437-448.
- Blasi, P., D'Souza, S. S., Selmin, F., DeLuca, P. P., 2005. Plasticizing effect of water on poly(lactide-co-glycolide). Journal of Controlled Release 108, 1-9.
- Bleiberg, B., Beers, T. R., Persson, M., Miles, J. M., 1993. Metabolism of triacetin-derived acetate in dogs. American Journal of Clinical Nutrition 58, 908-911.
- Bodmeier, R., 1998. Mutiphase system. Int. Patent Application WO 98/55100.
- Bodmeier, R., Chen, H., 1988. Preparation of biodegradable poly($\pm$)lactide microparticles using a spray-drying technique. Journal of Pharmacy and Pharmacology 40, 754-757.

- Bodmeier, R., Chen, H., 1989a. Preparation and characterization of microspheres containing the anti-inflammatory agents, indomethacin, ibuprofen, and ketoprofen. *Journal of Controlled Release* 10, 167-175.
- Bodmeier, R., Chen, H. G., 1989b. Evaluation of biodegradable poly(lactide) pellets prepared by direct compression. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 78, 819-822.
- Bodmeier, R., McGinity, J. W., 1987. The preparation and evaluation of drug-containing poly(dl-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Pharmaceutical Research* 4, 465-471.
- Bodmeier, R., McGinity, J. W., 1988. Solvent selection in the preparation of poly(DL-Lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *International Journal of Pharmaceutics* 43, 179-186.
- Bodmer, D., Kissel, T., Traechslin, E., 1992. Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems. *Journal of Controlled Release* 21, 129-138.
- Boisdron-Celle, M., Menei, P., Benoit, J. P., 1995. Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded microparticles as biodegradable anticancer drug carriers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 47, 108-114.
- Brannon-Peppas, L., 1995. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 116, 1-9.
- Brannon-Peppas, L., Vert, M., 2000. Polylactic and polyglycolic acids as drug delivery carriers. In: Wise, D.L., editor. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. New York. CRS Press. p.99-130., 890.
- Broadhead, J., Edmond Rouan, S. K., Rhodes, C. T., 1992. The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 18, 1169-1206.

- Brodbeck, K. J., DesNoyer, J. R., McHugh, A. J., 1999. Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery: Part II. The role of solution thermodynamics and bath-side mass transfer. *Journal of Controlled Release* 62, 333-344.
- Brodbeck, K. J., Gaynor-Duarte, A. T., T-I, S. T., 2000. Alza Corporation. Gel composition and methods, US Patent 6,130,200. October 10.
- Burgess, D. J., Hussain, A. S., Ingallinera, T. S., Chen, M. L., 2002. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: AAPS workshop report, co-sponsored by FDA and USP. *Pharmaceutical Research* 19, 1761-1768.
- Burkersroda, F. V., Schedl, L., Göpferich, A., 2002. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* 23, 4221-4231.
- Carrier, R. L., Miller, L. A., Ahmed, I., 2007. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release* 123, 78-99.
- Cavalier, M., Benoit, J. P., Thies, C., 1986. The formation and characterization of hydrocortisone-loaded poly(($\pm$)-lactide) microspheres. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 38, 249-253.
- Chang, C. M., Bodmeier, R., 1997. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 747-752.
- Chen, G., Junnarkar, G., 2008. Alzamer Depot bioerodible polymer technology. . In: Rathbone, M.J., Hadgraft, J., Roberts, M.S., Lane, E.M., editors. *Modified-release drug delivery technology* . Vol. 2. Informa Helath care, New York, USA., p.215-225, 703. Vol.2.
- Chern, R., Zingerman, J. R., 1999. Merck & Co., Inc. Liquid polymeric compositions for controlled release of bioactive substances. WO patent 9947073 . September 23.
- Chhabra, S., Sachdeva, V., Singh, S., 2007. Influence of end groups on in vitro release and biological activity of lysozyme from a phase-sensitive smart polymer-based in situ gel forming controlled release drug delivery system. *Int J Pharm* 342, 72-77.

- Clark, S. L., Crowley, A. J., Schmidt, P. G., Donoghue, A. R., Piche, C. A., 2004. Long-term delivery of ivermectin by use of poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid microparticles in dogs. *Am J Vet Res* 65, 752-757.
- Conway, B. R., Oya Alpar, H., 1996. Double emulsion microencapsulation of proteins as model antigens using polylactide polymers: Effect of emulsifier on the microsphere characteristics and release kinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 42, 42-48.
- Couvreux, P., Puisieux, F., 1993. Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 10, 141-162.
- Cowsar, D. R., Tice, T. R., Gilley, R. M., English, J. P., 1985. Poly(lactide-co-glycolide) microcapsules for controlled release of steroids. *Methods in Enzymology* VOL. 112, 101-116.
- De Rosa, G., Quaglia, F., La Rotonda, M. I., Besnard, M., Fattal, E., 2002. Biodegradable microparticles for the controlled delivery of oligonucleotides. *International Journal of Pharmaceutics* 242, 225-228.
- Dong, W. Y., Körber, M., Lopez Esguerra, V., Bodmeier, R., 2006. Stability of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and leuprolide acetate in in-situ forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 115, 158-167.
- Dubernet, C., 1995. Thermoanalysis of microspheres. *Thermochimica Acta* 248, 259-269.
- Dunn, R. L., English, J. P., Cowsar, D. R., Vanderbilt, D. P., 1990. Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same, US Patent 4,938,763. July 3.
- Dunn, R. L., English, J. P., Cowsar, D. R., Vanderbilt, D. P., 1994. Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same, US Patent 5,278,201. January 11.
- Dunn, R. L., English, J. P., Cowsar, D. R., Vanderbilt, D. P., 1998. Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same, US Patent 5,739,176. April 14.
- Dunn, R. L., Tipton, A. J., 1997. Atrix Laboratories, Inc. Polymeric compositions useful as controlled release implants, US Patent 5,702,716. December 30.

- Dunn, R. L., Tipton, A. J., Southard, G. L., Rogers, J. A., 1997. Biodegradable polymer composition. US Patent 5,599,552. February 4.
- Dunne, M., Corrigan, I., Ramtoola, Z., 2000. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials* 21, 1659-1668.
- Dwan'Isa, L., Dinguizli, M., Pr  at, V., Ari  n, A., Brewster, M., 2005. Qualitative predictions of solubilization of highly hydrophobic drugs in block copolymer micelles. Poster Abstracts. Universit   Catholique de Louvain. Brussels, Belgium.
- Eenink, M. J. D., Feijen, J., Olijslager, J., Albers, J. H. M., Rieke, J. C., Greidanus, P. J., 1987. Biodegradable hollow fibres for the controlled release of hormones. *Journal of Controlled Release* 6, 225-247.
- Eliaz, R., Kost, J., 1997. Composition and method for forming biodegradable implants in situ and uses of these implants. WO Patent 9742987. November 20. .
- Eliaz, R. E., Kost, J., 2000. Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins. *Journal of Biomedical Materials Research* 50, 388-396.
- Eliaz, R. E., Szoka Jr, F. C., 2002. Robust and prolonged gene expression from injectable polymeric implants. *Gene Therapy* 9, 1230-1237.
- Eliaz, R. E., Wallach, D., Kost, J., 2000. Delivery of soluble tumor necrosis factor receptor from in-situ forming PLGA implants: In vivo. *Pharmaceutical Research* 17, 1546-1550.
- EMA, 1997. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. ICH Topic Q3C, Impurities: residual solvents
- EMA, 1998. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. ICH Topic Q3C, Impurities: residual solvents
- Engstrom, S., Engstrom, L., 1992. Phase behaviour of the lidocaine-monoolein-water system. *International Journal of Pharmaceutics* 79, 113-122.

- Erden, N., Celebi, N., 1996. Factors influencing release of salbutamol sulphate from poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique. *International Journal of Pharmaceutics* 137, 57-66.
- Faisant, N., Siepmann, J., Benoit, J. P., 2002. PLGA-based microparticles: Elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 355-366.
- FDA, 2005. Proheart 6. Veterinary Medical Advisory Committee.
- FDA, 2010. ProHeart 6 - Briefing Package. U.S. Food and Drug Administration. Veterinary Medical Advisory Committee, March 24, 2010. (07Août 2010) Doc. [En ligne] - Adresse URL : <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/VeterinaryMedicineAdvisoryCommittee/UCM205053.pdf>.
- Folkman, J., Long, D. M., 1964. The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. *Journal of Surgical Research* 4, 139-142.
- Folkman, J., Long Jr, D. M., Rosenbaum, R., 1966. Silicone rubber: A new diffusion property useful for general anesthesia. *Science* 154, 148-149.
- Fort-Dodge, 2008. Risk minimization action plan (RiskMAP) for: PROHEART® 6 (moxidectin) Sustained Release Injectable for Dogs. U.S. FDA. (15 August 2010) Doc. [En ligne]-Adresse URL : <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/UCM054539.pdf>.
- Fort-Dodge, 2010. Guardian SR. Fort Dodge Animal Health. (15 August 2010) Doc. [En ligne]-Adresse URL: http://www.fortdodge.eu/product.asp?name=guardian_sr.
- Frank, A., Rath, S. K., Venkatraman, S. S., 2005. Controlled release from bioerodible polymers: Effect of drug type and polymer composition. *Journal of Controlled Release* 102, 333-344.
- Freiberg, S., Zhu, X. X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics* 282, 1-18.

- Freitas, S., Merkle, H. P., Gander, B., 2005. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: Reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release* 102, 313-332.
- Freytag, T., Dashevsky, A., Tillman, L., Hardee, G. E., Bodmeier, R., 2000. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *Journal of Controlled Release* 69, 197-207.
- Fu, K., Pack, D. W., Klibanov, A. M., Langer, R., 2000. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co- glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharmaceutical Research* 17, 100-106.
- Gamsiz, E. D., Miller, L., Thombre, A. G., Ahmed, I., Carrier, R. L., 2010. Modeling the influence of cyclodextrins on oral absorption of low-solubility drugs: I. Model development. *Biotechnology and Bioengineering* 105, 409-420.
- Gao, Z., Shukla, A. J., Johnson, J. R., Crowley, W. R., 1995a. Controlled release of a contraceptive steroid from biodegradable and injectable gel formulations: In vitro evaluation. *Pharmaceutical Research* 12, 857-863.
- Gao, Z. H., Crowley, W. R., Shukla, A. J., Johnson, J. R., Reger, J. F., 1995b. Controlled release of contraceptive steroids from biodegradable and injectable gel formulations: In vivo evaluation. *Pharmaceutical Research* 12, 864-868.
- Geary, T. G., 2005. Ivermectin 20 years on: Maturation of a wonder drug. *Trends in Parasitology* 21, 530-532.
- Geary, T. G., Thompson, D. P., 2003. Development of antiparasitic drugs in the 21st century. *Veterinary Parasitology* 115, 167-184.
- Ghahremankhani, A. A., Dorkoosh, F., Dinarvand, R., 2007. PLGA-PEG-PLGA tri-block copolymers as an in-situ gel forming system for calcitonin delivery. *Polymer Bulletin* 59, 637-646.

- Glickman, L. T., Glickman, N. W., Moore, G. E., Cobb, R., Connell, S. A., Morrison, M., LewisHugh, B., 2005. Safety Profile of Moxidectin (ProHeart 6) and Two Oral Heartworm Preventives in Dogs. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 3.(2).
- Gokbulut, C., Karademir, U., Boyacioglu, M., McKellar, Q. A., 2006. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. *Veterinary Parasitology* 135, 347-354.
- Gonzalez Canga, A., Sahagun Prieto, A. M., Jose Diez Liebana, M., Martinez, N. F., Vega, M. S., Vieitez, J. J., 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *Vet J* 179, 25-37.
- Göpferich, A., 1996. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17, 103-114.
- Göpferich, A., 1997. Polymer bulk erosion. *Macromolecules* 30, 2598-2604.
- Graham, P. D., Brodbeck, K. J., McHugh, A. J., 1999. Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery. *Journal of Controlled Release* 58, 233-245.
- Grizzi, I., Garreau, H., Li, S., Vert, M., 1995. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size dependence. *Biomaterials* 16, 305-311.
- Hansen, C. M., 1967. The three dimensional solubility parameter-key to paint component affinities: II and III. *Journal of paint technology*. 39, 505-514.
- Hansen, C. M., 2004. Polymer additives and solubility parameters. *Progress in Organic Coatings* 51, 109-112.
- Hansen, C. M., 2007. Hansen solubility parameters: A user's handbook. CRC Press, New York.
- Hatefi, A., Amsden, B., 2002. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 80, 9-28.
- Hausberger, A. G., DeLuca, P. P., 1995. Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 13, 747-760.

- Havlicek, M., Straw, R. S., Langova, V., Dernell, W. S., 2009. Intra-operative cisplatin for the treatment of canine extremity soft tissue sarcomas. *Veterinary and Comparative Oncology* 7, 122-129.
- Hennessy, D. R., 1997. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology* 72, 367-382; discussion 382-390.
- Herrmann, J., Bodmeier, R., 1995. The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly(lactide) microspheres prepared by a W/O/W solvent evaporation method. *Journal of Controlled Release* 36, 63-71.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. E., Richard, J., Benoit, J. P., 2000. Lipidic nanocapsules: preparation process and use as Drug Delivery Systems. Patent No. WO02688000.
- Hildebrand, J. H., Scott, R. L., 1962. Regular solutions. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New York.
- Hoffman, A. S., 2008. The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 132, 153-163.
- Hombreiro Pérez, M., Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Astier, A., Hoffman, M., Bodmeier, R., Maincent, P., 2000. The preparation and evaluation of poly(epsilon-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *Journal of Controlled Release* 65, 429-438.
- Houdré, L., 2003. Le traitement des ectoparasitoses des rongers et lagomorphes par les avermectines. Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.
- Huang, S. J., 2005. Poly(Lactic Acid) and Copolyesters. In: Bastioli, C. editor. *Handbook of biodegradable polymers*. United Kingdom. Rapra Technology. p. 287-301.
- Huggins, M. L., 1942. The viscosity of diluted solutions of long-chain molecules IV. Dependence of concentration. *Journal of the American Chemical Society*. 64, 2716-2718.

- Huynh, N. T., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J. P., 2009. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics* 379, 201-209.
- Im-Emsap, W., 2002. Dissertation: In vitro and in vivo properties of injectable biodegradable in situ forming microparticle systmes. Faculty of Biology, Chemistry and Pharmacy. Freie Universität Berlin. Germany, Berlin.
- Jain, R. A., 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21, 2475-2490.
- Jain, R. A., Rhodes, C. T., Railkar, A. M., Malick, A. W., Shah, N. H., 2000. Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres: Effect of various formulation variables. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 257-262.
- Jaraswekin, S., Prakongpan, S., Bodmeier, R., 2007. Effect of poly(lactide-co-glycolide) molecular weight on the release of dexamethasone sodium phosphate from microparticles. *Journal of Microencapsulation* 24, 117-128.
- Javot, L., Lecompte, T., Rabiskova, M., Maincent, P., 2009. Encapsulation of low molecular weight heparins: Influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio. *Journal of Controlled Release* 139, 8-14.
- Jiang, G., Woo, B. H., Kang, F., Singh, J., DeLuca, P. P., 2002. Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release* 79, 137-145.
- Johansen, P., Estevez, F., Zurbriggen, R., Merkle, H. P., Glück, R., Corradin, G., Gander, B., 2000. Towards clinical testing of a single-administration tetanus vaccine based on PLA/PLGA microspheres. *Vaccine* 19, 1047-1054.
- Katou, H., Wandrey, A. J., Gander, B., 2008. Kinetics of solvent extraction/evaporation process for PLGA microparticle fabrication. *International Journal of Pharmaceutics* 364, 45-53.
- Kissel, T., Brich, Z., Bantle, S., Lancranjan, I., Nimmerfall, F., Vit, P., 1991. Parenteral depot-systems on the basis of biodegradable polyesters. *Journal of Controlled Release* 16, 27-42.

- Kissel, T., Maretschke, S., Packhäuser, C., Schnieders, J., Seidel, N., 2006. Parenteral depot systems and their application in the pharmaceutical industry In: Benita, S., editor. *Microencapsulation; Methods and industrial application*. Boca raton.CRS Press. p.113-122.
- Klose, D., Siepmann, F., Elkharraz, K., Krenzlin, S., Siepmann, J., 2006. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 314, 198-206.
- Klose, D., Siepmann, F., Elkharraz, K., Siepmann, J., 2008. PLGA-based drug delivery systems: importance of the type of drug and device geometry. *International Journal of Pharmaceutics* 354, 95-103.
- Körber, M., Bodmeier, R., 2008. Development of an in situ forming PLGA drug delivery system. I. Characterization of a non-aqueous protein precipitation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 35, 283-292.
- Kranz, H., Bodmeier, R., 2007. A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 332, 107-114.
- Kranz, H., Bodmeier, R., 2008. Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: In situ implants versus in situ microparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 34, 164-172.
- Kranz, H., Brazeau, G. A., Napaporn, J., Martin, R. L., Millard, W., Bodmeier, R., 2001. Myotoxicity studies of injectable biodegradable in-situ forming drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 212, 11-18.
- Kubin, A., Loew, H. G., Burner, U., Jessner, G., Kolbabeck, H., Wierrani, F., 2008. How to make hypericin water-soluble. *Pharmazie* 63, 263-269.
- Lalla, J. K., Sapna, K., 1993. Biodegradable microspheres of poly(DL-lactic acid) containing piroxicam as a model drug for controlled release via the parenteral route. *Journal of Microencapsulation* 10, 449-460.

- Lambert, W. J., Peck, K. D., 1995. Development of an in situ forming biodegradable poly-lactide-co-glycolide system for the controlled release of proteins. *Journal of Controlled Release* 33, 189-195.
- Laskin, D. L., 2009. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: A battle of forces. *Chemical Research in Toxicology* 22, 1376-1385.
- Lee, J., Kellaway, I. W., 2000. In vitro peptide release from liquid crystalline buccal delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 195, 29-33.
- Leelarasamee, N., Howard, S. A., Malanga, C. J., 1986. Kinetics of drug release from polylactic acid-hydrocortisone microcapsules. *Journal of Microencapsulation* 3, 171-179.
- Leelarasamee, N., Howard, S. A., Malanga, C. J., Ma, J. K. H., 1988. A method for the preparation of polylactic acid microcapsules of controlled particle size and drug loading. *Journal of Microencapsulation* 5, 147-157.
- Legrand, P., Lesieur, S., Bochot, A., Gref, R., Raatjes, W., Barratt, G., Vauthier, C., 2007. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics* 344, 33-43.
- Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineau, T., Orlowski, S., Alvinerie, M., 2007. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: Structure-affinity relationship. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30, 84-94.
- Lewis, D. H., 1990. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin, M., Langer, R., editors. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. New York. Marcel Dekker. p. 1-41.
- Li, M., Rouaud, O., Poncelet, D., 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics* 363, 26-39.

- Lifschitz, A., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A., Jauregui Lorda, J., Lanusse, C., 2004. Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves. *Veterinary Parasitology* 119, 247-257.
- Lim, L. T., Auras, R., Rubino, M., 2008. Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science (Oxford)* 33, 820-852.
- Linse, P., Malmsten, M., 1992. Temperature-dependent micellization in aqueous block copolymer solutions. *Macromolecules* 25, 5434-5439.
- Liu, X., Sun, Q., Wang, H., Zhang, L., Wang, J. Y., 2005. Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. *Biomaterials* 26, 109-115.
- Loffler, D., Ternes, T. A., 2003. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1021, 133-144.
- Luan, X., Bodmeier, R., 2006a. In situ forming microparticle system for controlled delivery of leuprolide acetate: influence of the formulation and processing parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27, 143-149.
- Luan, X., Bodmeier, R., 2006b. Influence of the poly(lactide-co-glycolide) type on the leuprolide release from in situ forming microparticle systems. *Journal of Controlled Release* 110, 266-272.
- Luan, X., Skupin, M., Siepmann, J., Bodmeier, R., 2006. Key parameters affecting the initial release (burst) and encapsulation efficiency of peptide-containing poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 324, 168-175.
- Lucks, J. S., Müller, R. H., 1991. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid Nanospheres SLN). EP0000605497.
- Maeda, H., Brandon, M., Sano, A., 2003. Design of controlled-release formulation for ivermectin using silicone. *International Journal of Pharmaceutics* 261, 9-19.

- Martinez, M., Amidon, G., Clarke, L., Jones, W. W., Mitra, A., Riviere, J., 2002a. Applying the biopharmaceutics classification system to veterinary pharmaceutical products: Part II. Physiological considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 825-850.
- Martinez, M., Augsburger, L., Johnston, T., Jones, W. W., 2002b. Applying the biopharmaceutics classification system to veterinary pharmaceutical products. Part I: Biopharmaceutics and formulation considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 805-824.
- Matschke, C., Isele, U., van Hoogevest, P., Fahr, A., 2002. Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. *Journal of Controlled Release* 85, 1-15.
- Mauduit, J., Bukh, N., Vert, M., 1993. Gentamycin/poly (lactic acid) blends aimed at sustained release local antibiotic therapy administered per-operatively. III. The case of gentamycin sulfate in films prepared from high and low molecular weight poly (DL-lactic acids). *Journal of Controlled Release* 25, 43-49.
- McGinity, J. W., O'Donnell, P. B., 1997. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 25-42.
- McTier, T. L., Shanks, D. J., Watson, P., McCall, J. W., Genchi, C., Six, R. H., Thomas, C. A., Dickin, S. K., Pengo, G., Rowan, T. G., Jernigan, A. D., 2000. Prevention of experimentally induced heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in dogs and cats with a single topical application of selamectin. *Veterinary Parasitology* 91, 259-268.
- Merck-Sanofi-Aventis, 2010. Creating a Global leader in Animal Health. Call conference 09 march 2010. (13 July 2010) Doc. [En ligne]-Adresse URL: http://www.intervet.com/binaries/2010-03-09_Presentation_tcm50-208509.pdf.
- Miller, J. A., Davey, R. B., Oehler, D. D., Pound, J. M., George, J. E., Ahrens, E. H., 1999. Control of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae) on cattle using injectable microspheres containing ivermectin. *Journal of Economic Entomology* 92, 1142-1146.

- Miller, J. A., Oehler, D. D., Pound, J. M., 1998. Delivery of ivermectin by injectable microspheres. *Journal of Economic Entomology* 91, 655-659.
- Miller, R. A., Brady, J. M., Cutright, D. E., 1977. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *Journal of Biomedical Materials Research* 11, 711-719.
- Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P., Aminabhavi, T. M., 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release* 125, 193-209.
- Nihant, N., Grandfils, C., Jerome, R., Teyssie, P., 1995. Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-co-glycolide). IV. Effect of the processing parameters on coacervation and encapsulation. *Journal of Controlled Release* 35, 117-125.
- Okada, H., 1997. One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuporelin acetate. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 43-70.
- Okada, H., Ogawa, Y., Yashiki, T., 1987. Prolonged release microcapsules and their production. US patent 4,652,441. March 24.
- Okumu, F. W., Dao, L. N., Fielder, P. J., Dybdal, N., Brooks, D., Sane, S., Cleland, J. L., 2002. Sustained delivery of human growth hormone from a novel gel system: SABER. *Biomaterials* 23, 4353-4358.
- Omura, S., 2008. Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int J Antimicrob Agents* 31, 91-98.
- Packhaeuser, C. B., Schnieders, J., Oster, C. G., Kissel, T., 2004. In situ forming parenteral drug delivery systems: An overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58, 445-455.
- Palmieri, G. F., Cantalamessa, F., Di Martino, P., Nasuti, C., Martelli, S., 2002. Lonidamine solid dispersions: In vitro and in vivo evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28, 1241-1250.

- Pan, Y., Cheng, R.-s., 2000. A novel interpretation of concentration dependence of viscosity of dilute polymer solution. *Chinese Journal of Polymer Science* 18, 57-67.
- Park, J. H., Ye, M., Park, K., 2005. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules* 10, 146-161.
- Park, T. G., 1995. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: Effect of copolymer composition. *Biomaterials* 16, 1123-1130.
- Pitt, C. G., Gratzl, M. M., Kimmel, G. L., 1981. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. *Biomaterials* 2, 215-220.
- Pitt, C. G., Shah, S. S., 1995. Manipulation of the rate of hydrolysis of polymer-drug conjugates: The degree of hydration. *Journal of Controlled Release* 33, 397-403.
- Pouton, C. W., 2006. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 29, 278-287.
- Rathbone, M. J., Martinez, M. N., 2002. Modified release drug delivery in veterinary medicine. *Drug Discovery Today* 7, 823-829.
- Rattes, A. L. R., Oliveira, W. P., 2007. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technology* 171, 7-14.
- Ravivarapu, H. B., Moyer, K. L., Dunn, R. L., 2000. Parameters affecting the efficacy of a sustained release polymeric implant of leuprolide. *International Journal of Pharmaceutics* 194, 181-191.
- Ré, M. I., 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology* 16, 1195-1236.
- Rosca, I. D., Watari, F., Uo, M., 2004. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *Journal of Controlled Release* 99, 271-280.

- Rothen-Weinhold, A., Gurny, R., Dahn, M., 2000. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. *Pharmaceutical Science and Technology Today* 3, 222-231.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Owen, S. C., 2006. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 5th Edition. APha and Pharmaceutical Press.
- Royals, M. A., Fujita, S. M., Yewey, G. L., Rodriguez, J., Schultheiss, P. C., Dunn, R. L., 1999. Biocompatibility of a biodegradable in situ forming implant system in rhesus monkeys. *Journal of Biomedical Materials Research* 45, 231-239.
- Ruan, L. P., Yu, B. Y., Fu, G. M., Zhu, D. N., 2005. Improving the solubility of ampelopsin by solid dispersions and inclusion complexes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38, 457-464.
- Ruel-Gariépy, E., Leroux, J. C., 2004. In situ-forming hydrogels - Review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58, 409-426.
- Rungseevijitprapa, W., Bodmeier, R., 2009. Injectability of biodegradable in situ forming microparticle systems (ISM). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 36, 524-531.
- Rungseevijitprapa, W., Brazeau, G. A., Simkins, J. W., Bodmeier, R., 2008. Myotoxicity studies of O/W-in situ forming microparticle systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69, 126-133.
- Sansdrap, P., Moes, A. J., 1993. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 98, 157-164.
- Sartor, O., 2003. Eligard: Leuprolide acetate in a novel sustained-release delivery system. *Urology* 61, 25-31.
- Schakenraad, J. M., Oosterbaan, J. A., Nieuwenhuis, P., Molenaar, I., Olijslager, J., Potman, W., Eenink, M. J. D., Feijen, J., 1988. Biodegradable hollow fibres for the controlled release of drugs. *Biomaterials* 9, 116-120.

- Schenderlein, S., Lück, M., Müller, B. W., 2004. Partial solubility parameters of poly(D,L-lactide-co-glycolide). *International Journal of Pharmaceutics* 286, 19-26.
- Shah, J. C., Sadhale, Y., Chilukuri, D. M., 2001. Cubic phase gels as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, 229-250.
- Shah, N. H., Railkar, A. S., Chen, F. C., Tarantino, R., Kumar, S., Murjani, M., Palmer, D., Infeld, M. H., Malick, A. W., 1993. A biodegradable injectable implant for delivering micro and macromolecules using poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) copolymers. *Journal of Controlled Release* 27, 139-147.
- Shah, S. S., Cha, Y., Pitt, C. G., 1992. Poly (glycolic acid-co-DL-lactic acid): Diffusion or degradation controlled drug delivery? *Journal of Controlled Release* 18, 261-270.
- Shively, M. L., Coonts, B. A., Renner, W. D., Southard, J. L., Bennett, A. T., 1995. Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system. *Journal of Controlled Release* 33, 237-243.
- Siegel, R. A., Firestone, B. A., 1988. pH-dependent equilibrium swelling properties of hydrophobic polyelectrolyte copolymer gels. *Macromolecules* 21, 3254-3259.
- Siepmann, J., Elkharraz, K., Siepmann, F., Klose, D., 2005. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: A quantitative treatment. *Biomacromolecules* 6, 2312-2319.
- Smith, A., Hunneyball, I. M., 1986. Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *International Journal of Pharmaceutics* 30, 215-220.
- Souto, E. B., Müller, R. H., 2010. Lipid nanoparticles: Effect on bioavailability and pharmacokinetic changes. *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp. 115-141.
- Steinberg, D., Friedman, M., 1999. Dental drug-delivery devices: Local and sustained-release applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 16, 425-459.

- Stella, V. J., Nti-Addae, K. W., 2007. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 677-694.
- Strickley, R. G., 2004. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharmaceutical Research* 21, 201-230.
- Süheyla Kas, H., Öner, L., 2000. Microencapsulation using Coacervation/Phase separation: An overview of the technique and applications. In: Wise, D.L., editor. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. New York.CRS Press. p.301-328., 890.
- Sun, Y., Scruggs, D. W., Peng, Y., Johnson, J. R., Shukla, A. J., 2004. Issues and challenges in developing long-acting veterinary antibiotic formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 1481-1496.
- Sundback, C., Hadlock, T., Cheney, M., Vacanti, J., 2003. Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. *Biomaterials* 24, 819-830.
- Suzuki, K., Price, J. C., 1985. Microencapsulation and dissolution properties of a neuroleptic in a biodegradable polymer, poly(d,l-lactide). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74, 21-24.
- Szymanski, E. T., 1971. Implant trocar. US Patent 3,620,216. November 16.
- Takano, R., Sugano, K., Higashida, A., Hayashi, Y., Machida, M., Aso, Y., Yamashita, S., 2006. Oral absorption of poorly water-soluble drugs: computer simulation of fraction absorbed in humans from a miniscale dissolution test. *Pharmaceutical Research* 23, 1144-1156.
- Teraoka, I., 2002. *Polymer solutions: An introduction to physical properties*. John Wiley & Sons, Inc. NY. USA.
- Thomasin, C., Merkle, H. P., Gander, B., 1998. Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 2. Parameters determining microsphere formation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87, 269-275.
- Tice, T. R., Cowsar, D. R., 1984. Biodegradable controlled-release parenteral systems. *Pharmaceutical Technology* 8.

- Tipton, A. J., Richard, J., 1998. Southern Biosystems, Inc. High viscosity liquid controlled delivery system. US Patent 5,747,058. May 5.
- Tracy, M. A., Ward, K. L., Firouzabadian, L., Wang, Y., Dong, N., Qian, R., Zhang, Y., 1999. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. *Biomaterials* 20, 1057-1062.
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., Shakesheff, K. M., 1999. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews* 99, 3181-3198.
- Van de Witte, P., Esselbrugge, H., Peters, A. M. P., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Groenewegen, R. J. J., Smid, J., Olijslager, J., Schakenraad, J. M., Eenink, M. J. D., Sam, A. P., 1993. Formation of porous membranes for drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 24, 61-78.
- Varshosaz, J., Minayian, M., Moazen, E., 2010. Enhancement of oral bioavailability of pentoxifylline by solid lipid nanoparticles. *Journal of Liposome Research* 20, 115-123.
- Verrijck, R., Smolders, I. J. H., Bosnie, N., Begg, A. C., 1992. Reduction of systemic exposure and toxicity of cisplatin by encapsulation in poly-lactide-co-glycolide. *Cancer Research* 52, 6653-6656.
- Vert, M., 2005. Aliphatic polyesters: Great degradable polymers that cannot do everything. *Biomacromolecules* 6, 538-546.
- Volland, C., Wolff, M., Kissel, T., 1994. The influence of terminal gamma-sterilization on captopril containing poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release* 31, 293-304.
- Wang, L., Venkatraman, S., Kleiner, L., 2004. Drug release from injectable depots: Two different in vitro mechanisms. *Journal of Controlled Release* 99, 207-216.
- Winzenburg, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Kissel, T., 2004. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1453-1466.
- Wischke, C., Schwendeman, S. P., 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 364, 298-327.

- Wise, D. L., 2000. Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology. CRC Press, New York.
- Witschi, C., Doelker, E., 1998. Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *Journal of Controlled Release* 51, 327-341.
- Woo, B. H., Kostanski, J. W., Gebrekidan, S., Dani, B. A., Thanoo, B. C., DeLuca, P. P., 2001. Preparation, characterization and in vivo evaluation of 120-day poly(D,L-lactide) leuprolide microspheres. *Journal of Controlled Release* 75, 307-315.
- Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., Chua, C. K., 2001. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering* 7, 679-689.
- Zhang, X., Jackson, J. K., Wong, W., Min, W., Cruz, T., Hunter, W. L., Burt, H. M., 1996. Development of biodegradable polymeric paste formulations for taxol: An in vitro and in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics* 137, 199-208.
- Zhang, X., Wyss, U. P., Pichora, D., Goosen, M. F. A., Gonzal, A., Marte, C. L., 1994. Controlled release of testosterone and estradiol-17 β from biodegradable cylinders. *Journal of Controlled Release* 29, 157-161.
- Zolnik, B. S., Burgess, D. J., 2008. Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release* 127, 137-145.

Systèmes injectables biodégradables pour la libération prolongée d'ivermectine

Des systèmes injectables de formation *in situ* ont été utilisés dans les dernières années pour l'obtention de formulations de préparation facile et permettant la libération prolongée de principes actifs. Ces systèmes utilisant des solvants biocompatibles et des polymères biodégradables sont des liquides (solutions ou émulsions) qui une fois injectés dans l'organisme donnent lieu à des implants (ISI) ou à des microparticules (ISM) solides. La formation de ces systèmes est induite par la précipitation du polymère à partir des solutions polymériques qu'ils contiennent lors du contact avec les fluides corporels aqueux. Dans ce travail, des ISI et des ISM, réalisés à partir des polymères de l'acide lactique et/ou glycolique (PLA et PLGA) et des différents solvants biocompatibles, pour la libération prolongée d'ivermectine (IVM), un principe actif antiparasitaire faiblement biodisponible par la voie orale, ont été développés. Les profils de libération du principe actif *in vitro* et *in vivo* à partir de ces systèmes, ont été comparés avec ceux obtenus à partir de microparticules réalisées par la méthode classique dite d'émulsion simple - évaporation de solvant ; il s'agit d'une technique aux multiples étapes, à coût élevé et dont l'utilisation de solvants toxiques la rend difficilement industrialisable. La libération du principe actif à partir des microparticules obtenues par émulsion simple/évaporation du solvant a été influencée par la forte interaction du principe actif avec les polymères mais aussi par la porosité. Dans le cas des systèmes *in situ*, la vitesse de libération d'IVM a été conditionnée par la solubilité dans l'eau du solvant biocompatible sélectionné et par les interactions solvant/polymère. Pour les ISM, des paramètres tels que la nature de la phase externe, aqueuse (ISM-O/W) ou huileuse (ISM-O/O), la solubilité dans l'eau du solvant de la phase interne, l'affinité entre les phases et l'affinité de l'IVM pour chacune des phases, ont déterminé la vitesse de libération du principe actif. La bonne stabilité ainsi que les profils de libération plus prolongés et présentant une faible libération initiale du principe actif *in vivo* et *in vitro*, ont montré que les ISI et les ISM réalisés à partir de solvants biocompatibles de faible solubilité dans l'eau tels que la triacétine sont les plus indiqués pour l'encapsulation d'IVM par rapport à ceux plus solubles dans l'eau comme la N-méthyl-2-pyrrolidone et la 2-pyrrolidone. Ces systèmes représentent donc une alternative intéressante par rapport aux formulations conventionnelles d'IVM.

Mots-clés : In situ, ISI, ISM, libération prolongée, biocompatible, biodégradable, ivermectine, HSP

Injectable biodegradable systems for ivermectine sustained release

In situ forming injectable systems have been used in the past years to obtain sustained drug release formulations which are easy to prepare. These systems using biocompatible solvents and biodegradable polymers are liquids (solutions or emulsions) that upon injection on the body lead to solid implants (ISI) or microparticles (ISM). These systems are formed in contact with water body fluids by polymer precipitation from the polymeric solution. In this work, ISI and ISM made from lactide and/or glycolide polymers (PLA and PLGA) and different biocompatible solvents were performed to obtain sustained release of ivermectin (IVM), an antiparasitic drug with a low oral bioavailability. *In vitro* and *in vivo* drug release profiles from these systems were compared with those from microparticles obtained by the classical simple emulsion/solvent evaporation method, which is difficult to propose in industry because of its multiple steps, high cost and the solvent toxicity. Drug release from simple emulsion/solvent evaporation microparticles was affected by the strong polymer/drug interactions and porosity. Concerning to *in situ* forming systems, the rate of IVM release was dependent on solvent water solubility and solvent/polymer interactions. The nature of the external phase, water (ISM-O/W) or oil (ISM-O/O), the water solubility of the solvent in the internal phase, phase affinity and IVM/phase affinity determined drug release from ISM. The good stability, the *in vitro* and *in vivo* sustained release and the low burst effect of IVM, indicated that ISI and ISM formulated from low hydrosoluble biocompatible solvents such as triacetin are more appropriated to IVM formulation instead of those based on more hydrophilic solvent (N-methyl-2-pyrrolidone and 2-pyrrolidone). These systems are an interesting alternative to conventional IVM formulations.

Key words: In situ, ISI, ISM, sustained release, biocompatible, biodegradable, ivermectin, HSP