

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2013

THESES 2013 TOU3 2096

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

DABASSE Célia

**STRATEGIE THERAPEUTIQUE ET INNOVATION GALENIQUE DANS LE
TRAITEMENT DE LA DEGENERESCENCE MACULAIRE LIEE A L'AGE EXSUDATIVE**

Le 12 Novembre 2013

Directeur de thèse : Docteur QUINTYN Jean-Claude

JURY

Président : Madame le Docteur GIROD-FULLANA Sophie

1er assesseur : Monsieur le Docteur QUINTYN Jean-Claude

2ème assesseur : Monsieur le Docteur GALIACY Stéphane

3ème assesseur : Monsieur le Docteur ABI CHEBEL Nicolas

Remerciements

A notre Directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Jean-Claude QUINTYN

Praticien Hospitalier en Ophtalmologie au CHU de Toulouse

Pour l'intérêt que vous avez accordé à mon sujet de thèse. Pour votre aide, vos conseils et le partage de vos connaissances. Nous vous exprimons toute notre reconnaissance et notre profond respect.

A notre Président du jury,

Madame le Docteur Sophie GIROD-FULLANA

Enseignant-chercheur en galénique à la faculté de Pharmacie de Toulouse

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury. Nous avons eu la chance de bénéficier de votre enseignement. Nous vous prions d'accepter nos sincères remerciements et l'expression de notre respectueuse considération.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Docteur Nicolas ABI CHEBEL

Ingénieur R&D chez Emulsar

Pour m'avoir fait confiance dans la réalisation des travaux de recherche au sein d'Emulsar durant mon stage de fin d'études. Tous mes remerciements pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Monsieur le Docteur Stéphane GALIACY,

Chargé de recherche, EA 4555 Laboratoire de Génétique des Troubles de la Réfraction et des Anomalies du Développement de l'œil, Université Paul Sabatier.

Nous vous adressons nos remerciements pour avoir accepté de juger ce travail. Trouvez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A mes parents Alain et Danièle, pour leur amour ; sans leur soutien je n'en serais pas là aujourd'hui.

A ma mère, pour sa présence, sa patience et sa rigueur.

A mon père, pour son optimisme et son soutien logistique sans faille.

A mon frère Dimitri et à Claire sa femme, pour leur enthousiasme et leurs encouragements.

A ma Mamie Suzanne pour nous avoir constamment rappelé qu'il fallait à la fois être sérieux dans le travail et profiter de sa jeunesse.

Une pensée pour Papi Michel qui je l'espère aurait été fier de moi.

A mes grands-parents Marcel et Rose, pour leur gentillesse et leur tendresse.

A mes oncles, à mes tantes et à mes cousins pour leurs encouragements. Une pensée particulière pour Nicolas, mon cousin et parrain qui m'a conseillée dans le choix de mes études et accompagnée tout au long de mon cursus.

A Claudine, ma marraine, pour son affection et l'intérêt qu'elle a porté à mes études.

A Paul, pour son écoute attentive, ses conseils, sa présence à mes côtés.

A Anaïs, pour notre amitié infaillible même à des milliers de kilomètres (à vélo). Avec Marie nous attendons ton retour de pied ferme pour de nouvelles aventures.

Aux « filles », à Audrey pour son sourire malicieux, à Edith pour m'avoir supportée lors de notre stage hospitalier à Tue-la-mort (*Tullamore, Ireland* !), à Emeline pour son dynamisme et tous ses conseils, à Emilie G pour son enthousiasme débordant, à Emilie V notre future pharmacien-ingénieur, à Karine pour avoir été ma binôme (maintenant je suis une pro de la vaisselle de paille), à Laura pour sa douceur...

A ma promotion de Master 2 de l'Université Paris XI de Chatenay, à Agnès, Claire, Jelena, Laura, Sam et les autres, qui ont su rendre mes quelques mois passés sous la grisaille parisienne moins durs.

Aux Coquinoux, (il serait trop long de tous vous citer ici) pour votre convivialité et votre humeur festive.

A toute l'équipe d'Emulsar et en particulier à Christophe et Frédéric Arnaud pour leur accueil lors de mon stage et pour m'avoir permis de présenter mes travaux de recherche dans cette thèse.

Je vous dédie ce travail

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	4
Liste des Figures.....	6
Liste des Tableaux.....	7
Abréviations	8
Introduction	10
Partie I La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age	12
I- Généralités	12
1- Définitions et classification	12
2- Anatomie de l'œil.....	13
II- Physiopathologie.....	15
III- Epidémiologie.....	17
IV- Facteurs de risque	17
1- Facteurs inévitables	18
2- Facteurs environnementaux évitables	19
V- Prévention	21
1- Prévention primaire	21
2- Prévention secondaire	23
3- Prévention tertiaire	24
VI- Diagnostic	25
1- Signes fonctionnels évoquant une DMLA	25
2- Outils de diagnostic.....	25
Partie II Prise en charge thérapeutique de la DMLA exsudative.....	29
I- Traitements physiques	29
1- Photocoagulation au laser	29
2- Photothérapie dynamique.....	30
II- Traitements anti-angiogéniques.....	31
1- Généralités sur les anti-angiogéniques.....	31
2- Molécules anti-angiogéniques.....	32
2.1- Pegaptanib de sodium	32
2.2- Ranibizumab	34
2.3- Bevacizumab.....	38
2.4- Aflibercept	41
III- Associations thérapeutiques et perspectives	44
1- Associations thérapeutiques	44
2- Perspectives thérapeutiques	45

Partie III	L'innovation galénique dans le traitement de la DMLA exsudative... 48
I-	La voie intravitréenne 48
1-	Pharmacocinétique oculaire 48
2-	Intérêt de l'injection intravitréenne 49
3-	Technique d'injection et recommandations 49
4-	Effets indésirables liés à l'injection intravitréenne 51
II-	Formes galéniques innovantes pour injection intravitréenne 51
1-	Présentation des formes galéniques innovantes 51
2-	Avantages et limites 55
III-	Travail personnel : Conception d'émulsions eau-dans-huile à libération prolongée pour une injection intravitréenne..... 56
1-	Contexte et objectifs..... 56
2-	Emulsions : notions générales 57
3-	Stabilité des émulsions 59
4-	Intérêt des émulsions eau-dans-huile injectables 61
5-	Matériel et Méthodes..... 62
5.1-	Matériel 62
5.2-	Méthodes..... 62
6-	Résultats et discussion..... 66
6.1-	Etude exploratoire de tensioactifs 66
6.2-	Etude approfondie de trois tensioactifs 69
6.3-	Cinétiques de libération de la phase interne 81
6.4-	Essais de seringabilité 82
6.5-	Discussion générale : utilisation de ces tensioactifs dans une spécialité pharmaceutique oculaire injectable 83
7-	Conclusion et perspectives 84
	Conclusion générale 86
	Références bibliographiques 88
	Annexes 96

Liste des Figures

Figure 1: Représentation schématique de l'œil.....	14
Figure 2: Représentation schématique des composants de la macula.....	14
Figure 3: Grille d'Amsler.....	25
Figure 4: Clichés de fond d'oeil.....	26
Figure 5 : Clichés angiographiques.....	27
Figure 6: Clichés rétinien par Tomographie en Cohérence Optique.....	28
Figure 7: Structure chimique du Pegaptanib de sodium.....	32
Figure 8: Schéma explicatif de la formation du ranibizumab et du bévacizumab.....	34
Figure 9: Représentation graphique des résultats de l'étude MARINA.....	35
Figure 10: Représentation graphique des résultats de l'étude ANCHOR.....	36
Figure 11: Représentation des résultats des études MARINA et ANCHOR.....	37
Figure 12: Représentation schématique de la protéine recombinante aflibercept.....	41
Figure 13: Résultats des études View 1 et 2 relatifs au maintien et au gain d'acuité visuelle.....	42
Figure 14: Schéma de la réalisation d'une injection intravitréenne.....	50
Figure 15: Schéma comparatif des cinétiques de libération.....	52
Figure 16: Représentation de formes galéniques innovantes pour injection intravitréenne.....	53
Figure 17: Représentation schématique des différents types d'émulsions.....	57
Figure 18: Représentation schématique d'une molécule de tensioactif.....	58
Figure 19: Représentation schématique de molécules de tensioactif formant.....	58
Figure 20: Représentation des différents phénomènes d'instabilité des émulsions.....	59
Figure 21: Illustrations des liens entre l'innovation galénique et l'observance du patient.....	61
Figure 22: Protocole de suivi de stabilité dans le temps.....	63
Figure 23: Représentation du déroulement de l'étude in vivo.....	64
Figure 24: Photo du dispositif d'évaluation de la cinétique de libération de la phase interne.....	65
Figure 25: Photographie du dispositif pour évaluer la seringabilité des émulsions.....	66
Figure 26: Représentation de la structure chimique du Polyglycéryl-3-polyricinoléate.....	69
Figure 27: Représentation graphique du diamètre des gouttes dispersées d3,2 (µm) en fonction de la concentration en PGPR (% total dans l'émulsion 50:50).....	70
Figure 28: Représentation graphique de la répartition de taille des gouttes pour des concentrations en PGPR décroissantes (A à E) au cours du temps.....	71
Figure 29: Représentation schématique du mûrissement d'Ostwald et de la coalescence.....	71
Figure 30: Evolution au cours du temps de la taille des gouttes dispersées en fonction de la température de stockage d'une émulsion 50:50(3) avec du PGPR.....	72
Figure 31: Représentation de la structure chimique du Monooléate de sorbitane.....	74
Figure 32: Cliché du phénomène de floculation apparaissant dans les émulsions formulées avec le Monooléate de sorbitane observées au microscope optique.....	76
Figure 33: Représentation graphique de la répartition de taille des gouttes d'une émulsion 50:50(10) avec du Monooléate de sorbitane.....	76
Figure 34: Représentation des structures chimiques du stéarate de saccharose (A) et du palmitate de saccharose (B).....	79
Figure 35: Cliché d'une émulsion contenant du polystéarate de saccharose observée au microscope optique.....	80
Figure 36: Influence du cisaillement et de la température de stockage sur des émulsions contenant du Monooléate de sorbitane et du Polystéarate/palmitate de saccharose.....	81
Figure 37: Représentation graphique de la force (N) développée par trois émulsions contenant respectivement du PGPR, du Monooléate de sorbitane et du polystéarate de saccharose.....	83

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1: Classification simplifiée de l'AREDS.....</i>	<i>13</i>
<i>Tableau 2: Etapes du développement d'une DMLA</i>	<i>16</i>
<i>Tableau 3: Résultats de l'étude GEFAL.....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 4: Récapitulatif des résultats de 3 études concernant l'association thérapeutique</i>	<i>44</i>
<i>Tableau 5: Récapitulatif des formes galéniques innovantes pour injection intravitréenne</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 6: Récapitulatif des avantages et inconvénients des formes galéniques innovantes</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 7: Récapitulatif des tensioactifs utilisés</i>	<i>62</i>
<i>Tableau 8: Températures de stockage pour le suivi de stabilité</i>	<i>63</i>
<i>Tableau 9: Récapitulatif de la formulation la plus stable avec des tensioactifs seuls ou en associés et stabilité maximale à 4°C.....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 10: Récapitulatif de la composition des émulsions étudiées en injection in vivo chez la souris</i>	<i>73</i>
<i>Tableau 11: Démarche d'optimisation de formulation avec du Monooléate de sorbitane en variant la nature de la phase grasse.....</i>	<i>75</i>
<i>Tableau 12: Démarche d'optimisation de formulation avec du Monooléate de sorbitane en variant la température d'émulsification</i>	<i>75</i>
<i>Tableau 13: Démarche d'optimisation de formulation avec le Monooléate de sorbitane en variant la proportion de phase aqueuse.....</i>	<i>78</i>
<i>Tableau 14: Démarche d'optimisation de formulation avec le polystéarate de saccharose.....</i>	<i>79</i>

Abréviations

Amb	Température ambiante
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
ALA	acide alpha-linolénique
AMD	Age-related Macular Degeneration
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé
ANCHOR	<i>Anti-VEGF Antibody for the treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD trial</i>
ANSM	Agence Nationale de Sécurité des Médicaments (ex-Afssaps)
AREDS	Age-Related Eye Disease Study
ARNm (RNA)	Acide Ribonucléique messenger
AV	Acuité Visuelle
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BHR	Barrière Hémato-rétinienne
C	Cisaillé
CATT	Comparison of AMD Treatments Trials
CFH	<i>Complement Factor H</i>
CMC	Concentration Micellaire Critique
Da	Dalton
DGS	Direction Générale de la Santé
DHA	acide docosahexaénoïque
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
E/H	Eau-dans-huile
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPA	acide eicosapentaénoïque
EPR	Epithélium Pigmentaire Rétinien
ETDRS	<i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
EUREYE	European Eye study
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	<i>Gauge</i>
GEFAL	Groupe d'Evaluation Français Avastin versus Lucentis
H/E	Huile-dans-Eau
HAS	Haute Autorité de Santé
HLB	<i>Hydrophile Lipophile Balance</i>
IC _{95%}	Indice de confiance à 95%
IMC	Indice de masse corporelle
INSEE	Institut national de la statistique et des études économique
IVAN	<i>Inhibit VEGF in Age-related choroidal Neovascularisation</i>
IVT	Injection intravitréenne
J30	30 jours
Kd	Constante de dissociation
kDa	kiloDalton
LDL	<i>Low-Density Lipoproteins</i>
LED	<i>Light-Emitting Diode</i>
M+3	3 Mois
MARINA	<i>Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular AMD</i>

<i>MCT</i>	<i>Medium Chain Triacylglycerol</i>
mg/j	milligrammes par jour
mL	millilitre
MLA	Maculopathie Liée à l'Age
MLI	Membrane Limitante Interne
mm	millimètre
µm	micromètre
n	nombre
N	Newton
<i>NAT-2</i>	<i>Nutritional AMD Treatment-2</i>
NC	Non cisailé
nm	nanomètre
<i>OCT</i>	<i>Optical Coherence Tomography</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odd ratio
p	probabilité
<i>PDT</i>	<i>PhotoDynamic Therapy</i>
PGPR	Polyglycéryl-3-polyricinoléate
<i>PlGF</i>	<i>Placental Growth Factor</i>
POLA	Pathologies Oculaires Liées à l'Age
PPI	Pour préparation Injectable
<i>RADICAL</i>	<i>Reduced Fluence Visudyne Anti-VEGF-Dexamethasone In Combination for AV Lesions</i>
RCP	Résumé des Caractéristiques du Produit
<i>RISC</i>	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RS	Rotor-Stator
SA	Segment antérieur
SFO	Société Française d'Ophtalmologie
<i>siARN</i>	<i>small interference RNA</i>
SNOF	Syndicat National des Ophtalmologistes de France
SP	Segment postérieur
T	Température
TA	Tensioactif
<i>TAP</i>	<i>Treatment of AMD with Photodynamic therapy</i>
UV	Ultra-violet
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<i>VEGFR</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
<i>VIEW</i>	<i>VEGF Trap-Eye : Investigation of Efficacy and Safety in Wet AMD</i>
<i>VISION</i>	<i>VEGF Inhibition Study In Ocular Neovascularization</i>

Introduction

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age ou DMLA est l'une des premières causes de déficience visuelle dans les pays industrialisés chez les personnes de plus de 50 ans (*site WHO*). La DMLA est une maladie dégénérative de la partie centrale de la rétine, la macula, dont les principaux symptômes sont une vision floue, une impression d'ondulation des lignes droites et la présence d'un point aveugle au milieu du champ visuel. Sans étiologie connue, cette affection peut apparaître après l'âge de 50 ans et le risque à 75 ans est estimé à 25% (*site cnib*). La population mondiale vieillissant, la DMLA est devenue un problème de santé publique de part l'augmentation de son incidence. Ces dernières décennies, des avancées majeures ont été réalisées pour le traitement de la forme humide de la DMLA avec une stabilisation ou une amélioration de la vision dans 90% des cas (*Mitchell P et al., 2010*).

La DMLA sous forme humide ou exsudative se caractérise par la croissance anormale de vaisseaux sanguins au niveau de la macula appelée néovascularisation ou angiogénèse. En l'absence de traitement des complications sévères peuvent apparaître rapidement et entraîner une perte de la vision centrale. C'est pour cela que ces dernières décennies l'offre thérapeutique s'est largement développée. En effet, dans les années 80, seule la photocoagulation laser permettait de limiter la propagation de l'angiogénèse en détruisant les néovaisseaux anormaux. Mais, du fait des lésions importantes que cette technique entraînait au niveau de la rétine saine adjacente un second traitement a vu le jour à l'an 2000 : la photothérapie dynamique ou PDT. Son action plus sélective permet de limiter la détérioration de l'acuité visuelle des patients traités. Mais ce n'est qu'en 2006 avec l'ère révolutionnaire des traitements anti-angiogéniques que la stratégie thérapeutique de la DMLA exsudative s'est réellement améliorée. En effet, ces molécules permettent de cibler spécifiquement un médiateur, le *VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)* impliqué dans la croissance des néovaisseaux anormaux. Deux molécules sont déjà présentes sur le marché français, le pegaptanib de sodium (Macugen[®]) et le ranibizumab (Lucentis[®]) et une troisième l'aflibercept (Eylea[®]) le sera très prochainement.

Pour être actives au niveau de leur cible, les néovaisseaux maculaires, ces molécules anti-angiogéniques doivent être directement injectées par voie intravitréenne dans la partie postérieure du globe oculaire. Or, l'administration doit, au moins en début de traitement, se faire une fois par mois. La répétition de ces injections peut entraîner des effets indésirables dont les plus graves sont un décollement de rétine, une hémorragie de la rétine, une endophtalmie et une augmentation trop importante de la pression intraoculaire (*Wu H and Chen TC, 2009*). Cela peut induire une gêne importante et un manque d'observance du patient vis-à-vis du traitement. Pour répondre à cette problématique de nombreuses recherches dans le domaine de la formulation galénique sont mises en place. Elles visent à développer un système

qui assure à la fois une bonne biodisponibilité de la substance active et une durée d'action prolongée de quelques mois à plusieurs années tout en minimisant les risques de complications. Ainsi, la conception de formes galéniques innovantes à libération prolongée permettrait de diminuer la fréquence des injections et d'améliorer la prise en charge des patients ainsi que leur qualité de vie. Cette innovation sera illustrée par un cas pratique réalisé lors de mon stage de fin d'études.

Dans cette thèse, la première partie sera consacrée aux connaissances actuelles en termes de physiopathologie, épidémiologie, facteurs de risque, prévention et diagnostic de la DMLA exsudative. Dans la deuxième partie, nous nous intéresserons à l'arsenal thérapeutique actuellement disponible pour le traitement de cette pathologie et aux perspectives thérapeutiques. Pour finir, nous exposerons l'intérêt des formes galéniques innovantes pour le traitement du segment postérieur de l'œil, avec comme application un travail personnel sur la conception d'émulsions eau-dans-huile à libération prolongée pour une injection intravitréenne.

Partie I

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

Dans cette première partie, nous définirons tout d'abord ce qu'est la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age avant d'aborder la physiopathologie, les aspects épidémiologiques, les facteurs de risque associés, la prévention qui peut être mise en place et enfin les outils de diagnostic disponibles.

I- Généralités

1- Définitions et classification

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age ou DMLA est définie par l'ANAES comme « une maladie rétinienne chronique, évolutive et invalidante, qui débute après l'âge de 50 ans. Elle atteint de manière sélective la macula, partie centrale de la rétine, en provoquant une dégénérescence des cellules visuelles rétiniennes » (ANAES, 2001).

Les stades précoces correspondent à la Maculopathie Liée à l'Age ou MLA. Ils sont caractérisés par la présence de drusen, petites taches blanches observées dans la région périmaculaire, correspondant à l'accumulation de dépôts lipido-protéiques sous l'épithélium pigmentaire. Ces stades ne sont pas responsables d'altération de la fonction visuelle.

Par contre, les stades tardifs qui correspondent à la DMLA proprement dite regroupent deux formes symptomatiques : la forme exsudative également appelée DMLA humide ou néovasculaire et la forme atrophique dite sèche, toutes deux responsables d'altérations sévères de la vision centrale.

Nous approfondirons ces définitions tout au long de cette thèse afin de comprendre l'apparition de cette pathologie et les moyens de la traiter.

L'importante étude multicentrique *AREDS* a, entre autres, permis de différencier 4 catégories selon la gravité des atteintes liées à la DMLA. Cette classification simplifiée est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Classification simplifiée de l'AREDS

Catégorie 1	Pas de dégénérescence maculaire liée à l'âge : <ul style="list-style-type: none">• aucun ou quelques petits drusen (diamètre inférieur à 63 µm)
Catégorie 2 : MLA	Un ou plusieurs des éléments suivants : <ul style="list-style-type: none">• multiples petits drusen ;• quelques drusen de diamètre entre 63 et 125 µm ;• ou anomalies de l'épithélium pigmentaire.
Catégorie 3 : DMLA	Un ou plusieurs des éléments suivants : <ul style="list-style-type: none">• multiples drusen de diamètre entre 63 et 125 µm et au• moins un drusen de diamètre supérieur à 125 µm ;ou atrophie géographique excluant la fovéa.
Catégorie 4 : DMLA avancée	Atrophie géographique touchant la fovéa et/ou la présence d'une dégénérescence maculaire liée à l'âge exsudative.

Cette classification simplifiée prend en compte la présence et la taille des drusen observables dans le fond de l'œil mais aussi l'atteinte de la fovéa (zone centrale de la macula). Elle sert pour le diagnostic et le suivi de l'évolution de la DMLA.

Dans cette thèse, nous nous intéresserons spécifiquement à la DMLA exsudative qui représente 20% des sujets atteints de MLA/DMLA. En effet, du fait de l'augmentation grandissante de sa prévalence liée au vieillissement de la population, de son évolution rapide qui peut aboutir à une perte de la vision centrale et des possibilités thérapeutiques, elle fait l'objet de recherches scientifiques poussées dans de multiples domaines.

2- Anatomie de l'œil

La Figure 1 représente la structure schématique de l'anatomie de l'œil humain. Celui-ci peut se partager en un segment antérieur (SA) et un segment postérieur (SP). Dans le cas de la DMLA, et comme l'illustre la définition de l'ANAES vue précédemment, nous nous intéresserons aux tissus du segment postérieur dont fait partie la macula.

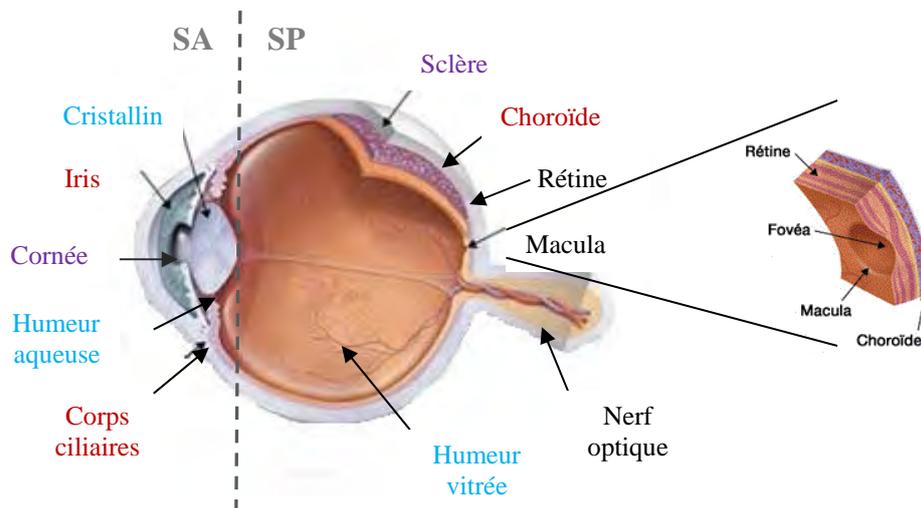


Figure 1 : Représentation schématique de l'œil

SA : Segment antérieur, SP : Segment postérieur.

En bleu : milieux transparents, en violet : tuniques externes, en rouge : tuniques intermédiaires.

(d'après le site *dr-leininger*)

De la périphérie vers l'intérieur de l'œil on distingue : la sclère, la choroïde, la rétine et l'humeur vitrée contenue dans la cavité vitrénne. La sclère est formée d'un tissu conjonctif dense et peu vascularisé, elle a un rôle de protection de l'œil. La choroïde est une membrane fortement vascularisée et pigmentée en brun par des mélanocytes. La rétine est composée d'une couche pigmentaire (externe) qui empêche la lumière de diffuser dans l'œil et d'une couche interne composée de cellules photoréceptrices traitant et acheminant l'information visuelle vers le cerveau. La macula ou tache jaune est une partie de la rétine qui permet de maintenir une vision centrale et de discerner les détails. Les structures la composant sont présentées sur la Figure 2.

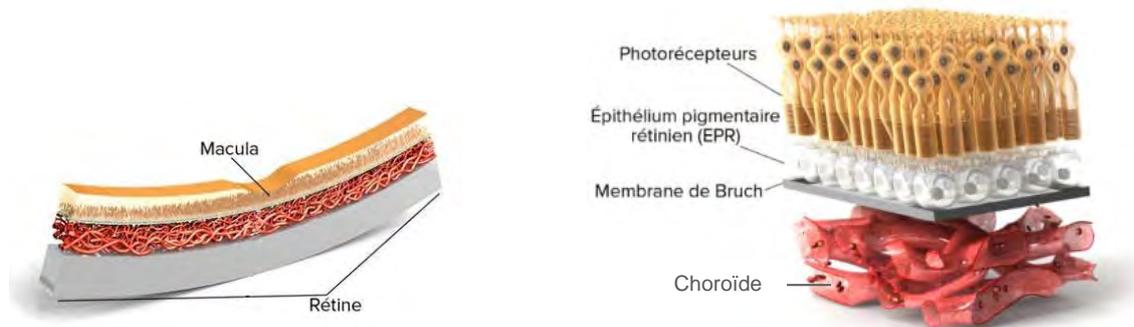


Figure 2 : Représentation schématique des composants de la macula

(site *science of AMD*)

Des couches internes à externes de la macula, on trouve respectivement : les photorécepteurs, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), la membrane de Bruch et les capillaires formant la choroïde. Les photorécepteurs regroupent les cônes permettant la vision des couleurs et les bâtonnets pour la vision en noir et blanc. Ils permettent de capter la lumière et de la transformer en influx nerveux qui se propagera le long du nerf optique pour former une image. L'un des nombreux rôles de l'EPR qui va nous intéresser dans le cas de la DMLA est la

phagocytose des articles usagés des photorécepteurs sous forme d'un produit de dégradation : la lipofuscine. La membrane de Bruch quant à elle, aide à l'oxygénation et à la nutrition de la rétine. La choroïde est un réseau de vaisseaux sanguins appelés choriocapillaires qui transportent l'oxygène et les nutriments vers la macula. Dans un œil sain, ces capillaires restent concentrés sous la membrane de Bruch et n'évoluent pas une fois formés. Enfin, on trouve dans le segment postérieur la cavité vitrénne qui contient l'humeur vitrée. Cette dernière se présente sous forme de gel qui assure la tonicité du globe oculaire et sa protection. Toute altération de la quantité ou de la transparence de l'humeur vitrée entraîne des troubles visuels. Elle est composée d'environ 99% d'eau et 0,9% de sels. Le réseau qui assure une structure gélifiée est composé de deux principales substances : des fibrilles de collagène et de l'acide hyaluronique (*Bishop PN, 2000*).

II- Physiopathologie

Dans les définitions présentées initialement, nous avons vu que la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age correspondait à un stade avancé de la maladie et qu'il en existait différentes formes. Nous allons nous intéresser ici aux phénomènes qui se produisent et aboutissent à la forme de DMLA exsudative.

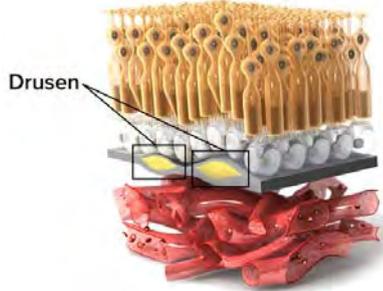
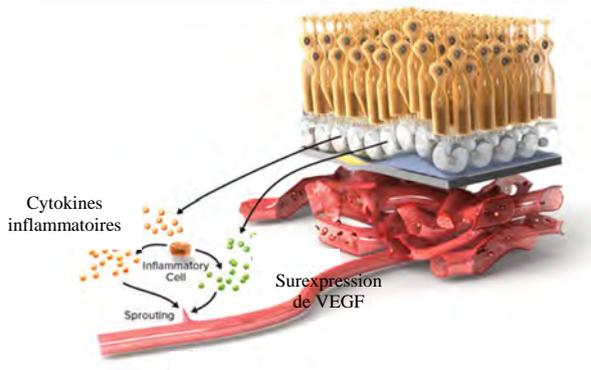
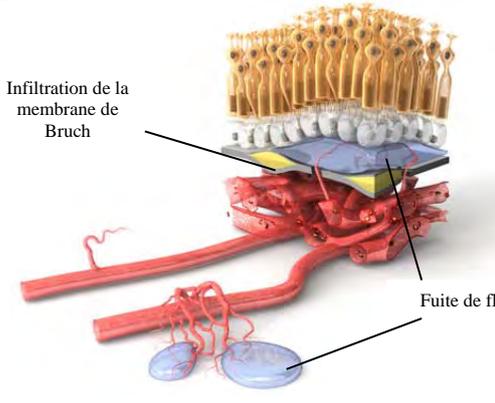
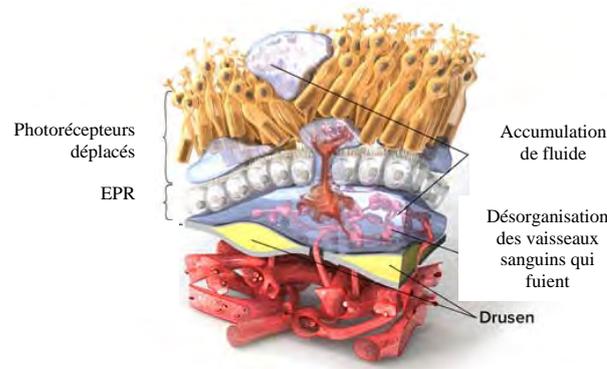
Tout débute par l'apparition de drusen, petites lésions profondes, blanchâtres ou jaunâtres observables dans le fond de l'œil au niveau de la rétine. Leur présence et leur taille permettent de diagnostiquer la maladie et son stade d'évolution. Il existe deux principaux types de drusen. Les drusen miliaires sont de petites tailles ($< 125\mu\text{m}$), amorphes et composés de matériel hyalin et les drusen séreux qui mesurent environ $250\mu\text{m}$ et présentent une structure inhomogène et granulaire. Lorsqu'ils confluent entre eux, cela aboutit à des décollements drusénoïdes de l'épithélium pigmentaire. La modification de l'EPR sous-jacent entraîne une hypo- ou hyperpigmentation de la rétine et peut évoluer vers une forme précoce de DMLA (*Soubrane G et al., 2007*). Ce stade précoce qui touche environ 40% des cas peut à son tour évoluer vers deux formes, atrophiques et exsudatives, décrites ci-dessous (*site umvf*).

La forme atrophique ou sèche touche 40% des patients atteints de MLA/DMLA. Elle est caractérisée par la disparition progressive des cellules de l'EPR ainsi que des photorécepteurs et de la choroïde sous-jacents. Elle évolue de façon lente par une extension des lésions. A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif pour cette forme sèche (*site umvf*).

La forme exsudative ou humide est, quant à elle, caractérisée par une croissance anormale de vaisseaux sanguins au niveau de la macula. Elle ne touche que 20% des patients atteints de MLA/DMLA mais entraîne des complications sévères en l'absence de traitements. Les

différentes étapes qui se produisent au niveau de la macula et qui aboutissent à ce type de DMLA exsudative sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Etapes du développement d'une DMLA

<p>Etape 1 : Formation de drusen</p> <p>En vieillissant, la lipofuscine, produit de dégradation cellulaire, s'accumule dans les cellules de l'EPR puis forme des dépôts appelés drusen au niveau de la membrane de Bruch.</p> <p>C'est le point de départ de la DMLA.</p>	
<p>Etape 2 : Inflammation et libération de VEGF</p> <p>Lorsque les drusen s'accumulent, ils causent une inflammation. Les cellules inflammatoires et celles de l'EPR libèrent alors des cytokines inflammatoires et parallèlement une surexpression de <i>VEGF</i> (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) apparaît.</p>	
<p>Etape 3 : Angiogenèse</p> <p>Le <i>VEGF</i> diffuse alors dans les choriocapillaires et stimule la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins, c'est l'angiogenèse. Ces néovaisseaux grossissent et infiltrent la membrane de Bruch.</p> <p>C'est le début d'une DMLA exsudative.</p> <p>Les néovaisseaux sont fragiles ce qui entraîne la fuite des fluides qui vont s'infiltrer dans les différentes couches de la macula.</p>	
<p>Etape 4 : DMLA exsudative avancée</p> <p>Les fluides s'accumulent entre la membrane de Bruch et la couche de photorécepteurs, ce qui endommage les nerfs nécessaires à la vision. Ces vaisseaux anormaux peuvent également entraîner des saignements ce qui laissera des cicatrices permanentes sur la macula.</p>	

(D'après Rigaudiere F, 2013 ; site science of AMD)

Cette forme exsudative entraîne de sérieuses complications si elle n'est pas traitée rapidement. Nous verrons par la suite que la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques

et le développement de formes pharmaceutiques est en plein essor afin d'assurer une prise en charge optimale des patients atteints.

III- Epidémiologie

Dans les pays industrialisés, la DMLA est l'une des principales causes de malvoyance chez les personnes âgées de plus de 50 ans (*site WHO*). En raison du vieillissement de la population et de l'augmentation de la durée de vie, la lutte contre la DMLA est devenue un enjeu majeur de santé publique (*site journees-dmla*).

La prévalence, c'est-à-dire le nombre de cas atteints à un moment donné, augmente exponentiellement avec l'âge (*Lee PP et al., 2003*). D'après l'étude EUREYE menée sur une population de plus de 65 ans de 7 pays européens, la prévalence des formes symptomatiques de DMLA est de 1% avant 70 ans, 3% entre 70 et 80 ans et 1 personne sur 10 âgée de plus de 80 ans est atteinte (*Augood CA et al., 2006*). Il en est de même pour l'étude française POLA qui confirme que la prévalence des DMLA sévères augmente fortement avec l'âge. Ainsi, on estime que 1,5 millions de personnes sont atteintes en France, 600 000 de MLA et 900 000 de DMLA (*Delcourt C et al., 2005, 2007*).

Les données sur l'incidence de la DMLA, c'est-à-dire le nombre de nouveaux cas observés pendant une période donnée varient selon la durée du suivi épidémiologique. En effet, suivant les études, le recul est compris entre 3 et 14 ans ce qui ne permet pas de mettre facilement en évidence l'apparition d'une DMLA (*Delcourt C et al. 2005 ; Buch H et al., 2005*). De plus, la faible proportion d'inclusion de personnes âgées dans ces études n'a permis que de conclure qu'en dessous de 60 ans, l'incidence de la DMLA est rare mais qu'elle augmente avec l'âge (*Soubrane G et al., 2007*).

Ainsi, les projections de l'INSEE estiment que pour la population française le nombre de cas atteints de DMLA va doubler d'ici 30 ans principalement en raison de la forte augmentation de la population âgée de plus de 80 ans (*Source INSEE, 2005*).

IV- Facteurs de risque

La DMLA est une pathologie multifactorielle associant des facteurs de risque inévitables (âge, génétique, sexe, origine ethnique) et des facteurs évitables environnementaux (tabac, facteurs cardio-vasculaires, exposition solaire). Ces deux catégories de facteurs seront présentées dans les paragraphes suivants.

1- Facteurs inévitables

- *L'âge*

Comme son nom l'indique, la dégénérescence maculaire liée à l'âge est liée au vieillissement. L'âge est donc le principal facteur de risque et la majorité des études ont montré que l'incidence, la prévalence et le développement des différentes formes de DMLA augmentent avec l'âge (*Leveziel N et al., 2009*).

- *Les facteurs génétiques*

Les liens entre DMLA et génétique sont connus depuis longtemps. Des études de jumeaux et de parents au premier degré de sujets atteints de DMLA avaient permis de mettre en évidence une prédisposition génétique à la maladie (*Piguet B et al., 1993 et Seddon JM et al., 1996a*). Il a été estimé que jusqu'à 70% du déterminisme de la DMLA serait expliqué par une composante génétique (*Scholl HP et al., 2007*). Mais ce n'est que ces dernières années que des études importantes ont été réalisées afin d'identifier les gènes impliqués dans le processus pathologique. De nombreux gènes ont été mis en évidence dans la transmission ou la survenue de la maladie. Ainsi, la mutation du gène ABCR exprimé uniquement au niveau de la rétine associé à la mutation d'autres gènes pourrait provoquer l'apparition de la DMLA (*Alikmets R et al., 1997*). De même, une modification de l'apolipoprotéine E est associée à la survenue de pathologies telles que les accidents cardio-vasculaires et à certaines rétinopathies héréditaires. Des recherches ont donc été faites sur le gène de l'apo E et ont montré que l'allèle E4 serait protecteur alors que des gènes comme le gène E2 seraient délétères vis-à-vis de la DMLA (*Baird PN et al. 2004 ; Souied EH, 1998*). Enfin, la protéine CFH (*Complement Factor H*) codée par un gène du chromosome I serait modifiée chez les sujets atteints de DMLA. Cette modification pourrait être responsable de 20 à 50% du risque de développer une DMLA et serait transmissible de génération en génération (*Chaine G. et Rohart C., 2007*). Dernièrement, un groupe de recherche international a découvert sept régions du génome humain associées à un risque accru de développer une DMLA (*Fritsche LG et al., 2013*). A ce jour, plusieurs gènes ont été identifiés comme étant associés à la DMLA de façon délétère mais aussi protectrice. La recherche de facteurs génétiques est très active car, à termes, il pourra être possible d'identifier les personnes à risque afin de les traiter précocement.

- *Le sexe*

Des études contradictoires ont été publiées concernant l'implication du genre sexuel comme facteur de risque. En effet, une méta-analyse des résultats de trois grandes études (Beaver Dam, Blue Mountain et Rotterdam) n'a pas permis de montrer de différence significative en termes de prévalence entre les deux sexes (*Smith W et al., 2001*). Inversement, l'étude NHANES III portant sur trois populations américaines a montré que la prévalence de la

MLA était plus importante chez les femmes afro-américaines et caucasiennes que chez les hommes de même origine ethnique (*Klein, R et al., 1999*). Il est donc difficile de conclure sur le rôle du sexe dans la DMLA, d'autant plus qu'il existe un biais lié à la différence d'espérance de vie entre hommes et femmes. Les femmes ne seraient pas plus atteintes que les hommes mais leur plus grande espérance de vie explique que davantage de femmes consultent et sont traitées pour une DMLA (*Chaine G. et Rohart C., 2007 ; Leveziel N et al., 2009*).

- *L'origine ethnique*

Concernant l'origine ethnique, des observations cliniques ont montré que les sujets caucasiens sont plus à risque de développer une DMLA que les sujets d'origine africaine (*Chaine G et Rohart C, 2007*).

2- Facteurs environnementaux évitables

- *Le tabagisme*

Le tabagisme, y compris le tabagisme passif est considéré comme un facteur de risque majeur dans le développement de la DMLA (*Seddon JM et al., 1996b ; Mitchell P et al., 2002*). Il est le plus souvent associé aux formes avancées de DMLA avec néo-vaisseaux choréïdiens. Le risque de développer une DMLA exsudative est multiplié par 2,6 (IC_{95%}, 1,4-4,8) chez les fumeurs et 1,7 pour les anciens fumeurs (*Chakravarthy U et al., 2007*). De plus, l'étude POLA a mis en évidence une relation dose-effet avec un risque relatif de DMLA multiplié par 3 pour les fumeurs de plus de 20 paquets-années et multiplié par 5 pour les fumeurs de plus de 40 paquets-années (*Delcourt C et al., 1998*).

- *Les pathologies cardio-vasculaires*

Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre la DMLA et des pathologies cardio-vasculaires telles que plaque athéromateuse carotidienne, accident vasculaire cérébral et accident cardio-vasculaire. Cependant l'interprétation de ces études reste complexe du fait que de nombreux facteurs de risque sont communs à la DMLA et aux atteintes cardio-vasculaires et qu'il est difficile de former des groupes de malades et de témoins homogènes en âge, sexe, antécédents tabagiques, etc... (*Klein R et al., 2003 ; Leveziel N et al., 2009*).

- *La surcharge pondérale*

Une surcharge pondérale est un facteur de risque avec un risque relatif multiplié par 2 à 2,5 pour les sujets ayant un IMC supérieur à 25 (*Seddon JM et al., 2003 ; Clemons TE et al., 2005*).

- *L'alimentation*

Une alimentation déséquilibrée est un facteur de risque associé à la DMLA. Nous verrons par la suite que le risque est inversement corrélé à la consommation en vitamines antioxydantes, caroténoïdes et omega-3.

- *L'exposition solaire*

L'impact de l'exposition solaire dans le développement de la DMLA est à ce jour un facteur de risque encore controversé. En effet, bien que des preuves expérimentales montrent une perte de viabilité des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien après irradiation aux UVA et UVB (Youn HY *et al.*, 2007, 2011), les données épidémiologiques restent incertaines. Une méta-analyse de Sui GY *et al.* réalisée en 2013 s'est basée sur 14 études pour montrer le lien entre exposition solaire et risque de survenue d'une DMLA. L'importante hétérogénéité entre les études se caractérise notamment par les différences de localisation des populations étudiées, les critères de mesure de l'exposition solaire et l'importance de la protection solaire oculaire. Ainsi, les populations étudiées ne se trouvaient pas sous les mêmes latitudes et aucune étude n'a été menée dans l'hémisphère sud ni dans les régions tropicales de l'hémisphère nord les plus exposées au soleil. De plus, la classification des groupes « exposés » et « non exposés » aux radiations solaires était variable selon les études. Le groupe « exposé » pouvait être défini comme « travaillant principalement à l'extérieur » (Xu ZH, 2009), ou selon le « temps passé à l'extérieur pendant le travail » (Cruickshanks KJ *et al.*, 1993) ou bien comme « ayant vécu ou travaillé sous un climat ensoleillé pendant au moins 5 ans » (Khan JC *et al.*, 2006). La durée de loisir à l'extérieur n'était, de plus, pas toujours prise en compte. Enfin, la protection solaire oculaire (chapeau, lunette) plus largement développée dans les pays industrialisés n'était pas non plus toujours prise en considération. Cependant, l'analyse des données de 12 études sur 14 a permis de montrer une augmentation significative du risque de développement d'une DMLA suite à une exposition solaire importante. Des études à plus grande échelle et avec une méthodologie fiable devront néanmoins être réalisées afin de montrer un lien clair de cause à effet.

La connaissance de ces facteurs de risque est importante car certains peuvent être maîtrisés ce qui permet de retarder le développement de la maladie. Nous allons voir que des actions de prévention peuvent également être mises en place afin de limiter l'impact de cette pathologie.

V- Prévention

La prévention peut se définir comme l'anticipation des phénomènes risquant d'entraîner ou d'aggraver des problèmes de santé ainsi que les actions mises en œuvre pour éviter ou limiter la gravité de ces problèmes (*Souied E et al., 2007*). Il existe trois stades de prévention : primaire, secondaire et tertiaire, stades qui seront présentés dans les paragraphes suivants.

1- Prévention primaire

La prévention primaire est définie par l'OMS comme « l'ensemble des moyens mis en œuvre pour empêcher l'apparition d'un trouble, d'une pathologie ou d'un symptôme ». Dans le cas de la DMLA, elle consisterait en la détection des sujets à risque via des analyses biologiques ou génétiques, des questionnaires sur les facteurs de risque ainsi que des campagnes de sensibilisation et d'information afin de présenter les facteurs de risque évitables.

- *Règles hygiéno-diététiques*

Un régime alimentaire équilibré est la première mesure préventive à conseiller. Ainsi, comme c'est le cas pour la prévention des maladies cardio-vasculaires ou l'ostéoporose, des mesures hygiéno-diététiques doivent être recommandées. Dans la population générale, il est conseillé de consommer du poisson gras de préférence (saumon, truite, sardine...), des légumes verts 3 fois par semaine (épinards, choux, brocolis...) et des fruits à haute teneur en vitamines C et E quotidiennement. Ces mesures sont applicables à tous, avant et près 55 ans, tout particulièrement pour les individus ayant un risque plus élevé pour cause de tabagisme, surcharge pondérale, hypercholestérolémie ou antécédents familiaux de DMLA (*Souied E et al., 2007*).

De plus, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle bénéfique de certaines substances contenues dans les aliments qui peuvent prévenir l'apparition d'une DMLA. Ces substances seront présentées dans les paragraphes suivants.

- *Les anti-oxydants*

Le rapport 8 de l'étude multicentrique *AREDS* a permis de démontrer l'effet protecteur des anti-oxydants (*AREDS, 2001*). Ainsi, une association de hautes doses de vitamine C (500 mg/j), de vitamine E (268 mg/j), de bêta-carotène (15 mg/j), de cuivre (2mg/j) et de zinc (80 mg/j) s'est révélée avoir un effet bienfaiteur chez les patients présentant une perte de la vision centrale touchant un œil (stade 4) et chez les patients présentant de larges drusen ou une atrophie géographique sans atteinte centrale (stade 3). La réduction du risque d'évolution vers une forme sévère de DMLA avec cette supplémentation a été évaluée à 25% sur 5 ans. Il reste encore à évaluer le dosage de cette supplémentation pour les stades 1 et 2 de la DMLA et

surtout pour les patients présentant des facteurs de risque tels que tabagisme, surcharge pondérale ou antécédents familiaux (*AREDS Research Group, 2001*). A noter également, que dans le cas des fumeurs la prise de bêta-carotène est contre-indiquée car elle augmenterait le risque de cancer pulmonaire (*Virtamo J et al., 2003*). D'après plusieurs études, seule l'association de ces vitamines et du zinc à forte dose semble avoir un effet protecteur. La prise indépendante des vitamines ne permet pas cet effet bénéfique (*Seddon JM, 2007*).

- *Les acides gras oméga-3*

Les acides gras poly insaturés de la série oméga-3 font partie des acides gras dits essentiels. Ils comprennent un précurseur : l'acide alpha-linolénique (ALA) que l'organisme ne synthétise pas et qui doit être obtenu *via* l'alimentation. L'ALA est métabolisé en acide eicosapentanoïque (EPA) puis en acide docosahexaénoïque (DHA) présents également dans certains aliments. Ces acides gras ont un triple rôle au niveau de la rétine : structurel, car ils font partie de la constitution des photorécepteurs ; fonctionnel, car ils participent aux étapes de phototransduction et protecteur contre le vieillissement rétinien avec une action anti-apoptotique, anti-ischémique et anti-inflammatoire. L'alimentation occidentale est pauvre en acides gras poly-insaturés oméga-3 (surtout présents dans les poissons gras et certaines huiles végétales) et trop riche en oméga-6 (largement présents dans les aliments). Or, il semble qu'un ratio oméga-6/oméga-3 trop important soit impliqué dans des pathologies notamment cardiovasculaires. Le bénéfice d'une supplémentation en oméga-3 a d'ailleurs déjà été démontré dans les maladies cardio-vasculaires, la démence sénile et certaines affections inflammatoires (*Seddon JM et al., 2006*). Des études épidémiologiques basées sur un questionnaire des habitudes alimentaires ont montrées une corrélation inverse entre la consommation en oméga-3 (particulièrement en DHA) et l'incidence de la DMLA (*Cho E et al., 2001 ; Heuberger RA et al., 2001 ; Chua B et al., 2006 ; Delcourt C et al., 2007*). Ainsi, leurs conclusions montrent que le risque de DMLA est diminué de 30 à 50% et en particulier la DMLA exsudative. La dernière étude en date, est l'étude NAT-2 réalisée dans le service d'ophtalmologie de l'Hôpital Intercommunal de Créteil qui a eu pour but d'évaluer l'efficacité d'une supplémentation orale en oméga-3 (840 mg/jour de DHA et 270 mg/jour d'EPA) pendant 3 ans par rapport à un placebo d'huile d'olive. Le dosage en oméga-3 au niveau des membranes des globules rouges sanguins des patients supplémentés a montré que lorsque le taux est élevé, il y a une diminution de 68% du risque de développer une DMLA exsudative sur 3 ans (*Soueid EH et al., 2013*).

- *Les caroténoïdes xanthophylles*

La lutéine, la zéaxanthine et la méso-zéaxanthine sont trois caroténoïdes xanthophylles. Ils ne sont pas synthétisés par notre organisme, la seule source est notre alimentation (1,3 à

3mg/jour). Ils sont notamment présents dans le jaune d'œuf, les épinards, les brocolis, le maïs et le kiwi. La lutéine et la zéaxanthine s'accumulent principalement au niveau de la macula et pourrait lui conférer une protection. En effet, ces substances ont des propriétés anti-oxydantes directes ainsi que de filtration des longueurs d'onde courtes réduisant les lésions oxydatives induites par la lumière. Ainsi, ces caroténoïdes permettraient de diminuer le risque de progression de la DMLA et d'altération de la vision. L'étude POLA publiée en 2006, a démontré une réduction significative du risque de MLA chez les individus présentant les taux sériques de zéaxanthine les plus élevés (OR=0,07 ; IC_{95%}=0,01-0,58 ; p=0,005) et que le risque de MLA était inversement corrélé aux taux sériques de l'association lutéine-zéaxanthine (OR = 0,21 ; IC_{95%}=0,05-0,79 ; p = 0,01) (*Delcourt C et al., 2006*).

Mais les conclusions des études concernant à la fois l'effet bénéfique des oméga-3 présenté précédemment et celui des caroténoïdes ont été récemment remises en question suite à l'apparition de l'étude *AREDS 2*. L'objectif principal de cette étude était de déterminer si le fait d'ajouter des caroténoïdes (lutéine + zéaxanthine), des oméga-3 (DHA + EPA) ou les deux associations à la formule de supplémentation de la première étude *AREDS* (vitamines C et E, β-carotènes et zinc) pouvait diminuer le risque de développer une DMLA. Un deuxième objectif était d'évaluer l'impact de la suppression des β-carotènes de la formule étant donné leur influence négative chez les fumeurs et de la diminution de la dose de zinc qui serait associé à un risque plus élevé de cataractes et de troubles génito-urinaires. L'étude menée sur plus de 4000 patients a montré que l'addition des caroténoïdes et des oméga-3 à la formule initiale ne réduisait pas plus le risque de progression d'une DMLA avancée. Cependant, les résultats ont montré que les caroténoïdes pouvaient remplacer les β-carotènes (*AREDS 2, 2013*).

Au fur et à mesure de la publication des études cliniques, de nombreux compléments alimentaires ont été mis sur le marché. Leur objectif est d'assurer une dose suffisante en anti-oxydants, oméga-3 et caroténoïdes pour optimiser les défenses contre le stress oxydatif au niveau de la rétine. Actuellement, ils sont recommandés par les ophtalmologistes lorsque le diagnostic de DMLA mais pas encore dans la population générale saine.

2- Prévention secondaire

La prévention secondaire d'une maladie consiste en des actions visant à limiter les conséquences néfastes de la maladie grâce à une intervention avant l'apparition des premiers symptômes. Elle a pour objectif de diminuer la morbidité et la mortalité d'une affection déclarée et de prévenir les récurrences. Elle englobe la détection de la maladie c'est-à-dire le dépistage et des mesures curatives. Dans le cas de la DMLA, la prévention secondaire

correspond à la détection des premiers signes de MLA ou de DMLA par un examen du fond d'œil à partir de l'âge de 55 ans (*Souied E et al, 2007*). Selon les recommandations de l'OMS (*Wilson JMG, Jungner G, 1970*) sur la prévention secondaire, trois niveaux de dépistage peuvent être envisagés dans le cas de la DMLA :

1) Un dépistage de masse dans la population française de plus de 55 ans par un examen du fond d'œil tous les 3 ans.

2) Un dépistage ciblé sur une population à plus haut risque. Le risque accru sera défini par des études génétiques, cliniques et épidémiologiques. Il s'agit d'individus aux antécédents familiaux de DMLA et/ou fumeurs (> 10 paquets années) et/ou avec surcharge pondérale, et/ou présentant des signes précurseurs déjà identifiés à l'examen du fond d'œil. Une auto-évaluation à l'aide d'une grille d'Amsler et un examen annuel du fond d'œil seront préconisés.

3) Un dépistage de l'apparition d'une DMLA sur le deuxième œil. Une auto-évaluation attentive hebdomadaire à l'aide d'une grille d'Amsler et un examen du fond d'œil tous les 6 mois seront préconisés. Une éducation du patient est indispensable afin de lui expliquer la conduite à tenir en cas de signes fonctionnels annonciateurs sur le deuxième œil (*Souied E et al., 2007*).

Les techniques utilisées pour le dépistage de la DMLA seront présentées dans le paragraphe VI de cette thèse.

En France, la première campagne de dépistage a été organisée en 2007 par l'Association DMLA en partenariat avec le Syndicat National des Ophtalmologistes de France, la Société Française d'Ophtalmologie, Bausch & Lomb, Lissac et Novartis. Depuis, chaque année, des ophtalmologistes et services hospitaliers reçoivent durant une semaine les personnes qui le désirent pour un dépistage gratuit de la DMLA. De plus, des campagnes publicitaires télévisées incitent les populations à risque à effectuer un dépistage (*journees-dmla*).

3- Prévention tertiaire

La prévention tertiaire a pour but la diminution des complications d'une maladie et de la morbidité. L'éducation thérapeutique des patients fait partie de cette prévention en utilisant recommandations et consensus. L'objectif est de limiter le plus possible le retentissement de la maladie sur la qualité de vie des patients par des approches médicales, psychologiques et sociales. Dans le cas de la DMLA, on retrouve une démarche de diagnostic des complications le plus précocement possible et la mise en place d'un traitement afin d'assurer une prise en charge rapide et optimale du patient (*Souied E et al., 2007*). Les recommandations, consensus et communiqués sont en général relayés par l'HAS, l'ANSM et l'ANAES.

VI- Diagnostic

Les stades précoces de la Maculopathie Liée à l'Age sont souvent asymptomatiques. Ils sont fréquemment découverts lors d'un examen de fond d'œil pour un autre problème ou dans le cadre d'une recherche en raison d'antécédents familiaux de maladies oculaires.

1- Signes fonctionnels évoquant une DMLA

La baisse de l'acuité visuelle au niveau central est fréquente mais chez les personnes âgées elle n'est pas spécifique de la DMLA. Chez un sujet de plus de 50 ans présentant des métamorphopsies, c'est-à-dire une perception déformée des lignes droites et des images, avec ou sans diminution de l'acuité visuelle, une pathologie maculaire et en particulier une DMLA doit être recherchée. D'autres signes fonctionnels peuvent également apparaître tels que des scotomes (tâches sombres dans le champ de vision), une diminution de la perception des contrastes, une gêne en vision nocturne, une sensation d'éblouissement et des modifications de la vision des couleurs. Devant chacun de ces symptômes chez un patient de plus de 50 ans, l'ophtalmologiste doit réaliser un examen clinique ophtalmologique complet (*site HAS, 2013*).

2- Outils de diagnostic

- *Mesure de l'acuité visuelle*

L'acuité visuelle est la capacité de l'œil à voir distinctement les détails d'un objet. Elle est exprimée sous forme de fraction. On parle par exemple de 10/10^{ème} pour une acuité visuelle (AV) « normale », 3/10^{ème} pour une AV faible et 16/10^{ème} pour une très bonne AV. Dans de nombreuses évaluations cliniques, comme c'est le cas pour la DMLA, l'échelle *ETDRS* est l'échelle de référence pour mesurer cette acuité visuelle. En Annexes 1 sont présentés l'échelle et le calcul du score associé à la mesure. Pour mettre en évidence des scotomes, des zones de déformation des lignes et/ou des images, symptômes apparaissant au cours de la DMLA, on utilise le test d'Amsler représenté Figure 3.

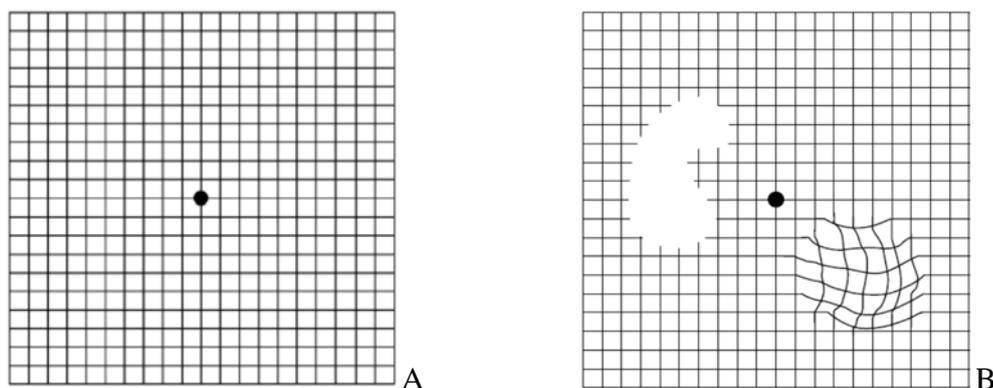


Figure 3 : Grille d'Amsler
(*site pharma.novartis.fr*)

Ce test peut être effectué chez un ophtalmologiste mais également en autoévaluation. Le patient doit porter ses lunettes de vue ou ses lentilles de contact habituelles. Le mode d'utilisation du test est le suivant : la grille (Figure 3A) doit être placée à une distance de lecture de près, soit 30-35 cm. Le patient doit couvrir un œil avec une main et fixer le point central. Tout en continuant à fixer le point, il doit observer les lignes autour. Elles peuvent apparaître droites ou ondulées, les carrés peuvent être flous ou déformés (Figure 3B). Dans ce cas, cela peut-être un symptôme précoce de DMLA. Une consultation ophtalmique doit être réalisée le plus rapidement possible.

- **Fond d'œil**

La réalisation d'un fond d'œil après dilatation de la pupille est l'examen clé du diagnostic d'une pathologie maculaire. Il doit être réalisé par un ophtalmologiste au niveau des deux yeux. Les clichés de la Figure 4 A,B,C représentent respectivement des observations de fond d'œil d'un œil normal, d'un œil atteint de MLA et d'un œil atteint de DMLA exsudative.

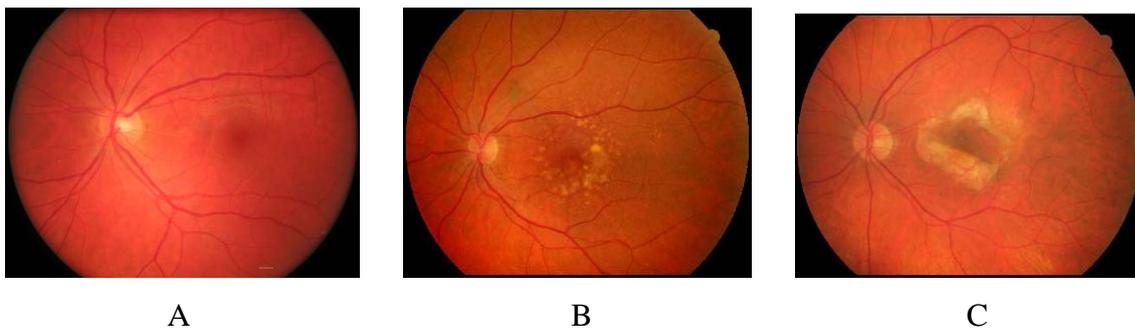


Figure 4 : Clichés de fond d'oeil

- A) Œil normal (*site oct-optovue*)
- B) Maculopathie liée à l'âge (forme précoce de DMLA) : drusen séreux et altérations de l'épithélium pigmentaire
- C) DMLA de forme exsudative : forme avancée avec fibrose au niveau de la macula
(*Service universitaire ophtalmologie, Créteil*)

Une DMLA exsudative peut être suspectée en présence d'un épaissement ou décollement rétinien, d'une lésion néovasculaire de couleur gris-verte, d'un décollement de l'épithélium pigmentaire ou en présence d'hémorragies ou fibrose sous-rétiniennes et d'exsudats rétiniens. L'étendue des atteintes et leur localisation par rapport à la macula doivent être consignées afin d'évaluer leur évolution par la suite. L'examen du fond d'œil est recommandé car il est nécessaire à l'examen de la macula. Cependant il est insuffisant pour établir un diagnostic précis, il aide à orienter les examens complémentaires.

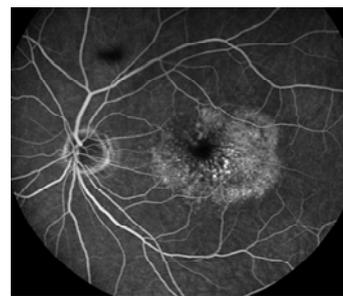
- **Angiographie à fluorescéine**

L'angiographie à fluorescéine est l'examen de référence pour la mise en évidence de lésions exsudatives ou néovasculaires. En effet, elle permet d'identifier différents tableaux

cliniques et ainsi d'orienter le choix thérapeutique. La fluorescéine est un produit de contraste qui devient fluorescent au niveau des vaisseaux rétinien lorsqu'on l'éclaire. Son injection se fait par voie intraveineuse le plus souvent au pli du coude. En général elle est bien tolérée par les patients qui présentent néanmoins une photosensibilité accrue et une coloration jaune de la peau pendant quelques heures suite à l'injection. De plus, quelques cas d'allergie et d'anaphylaxie ont été rapportés (*Yannuzzi et al., 1986*) ce qui impose un interrogatoire approfondi (prise de médicaments, antécédents cardiaques sévères...) avant tout examen ainsi qu'un accord préalable signé par le patient. Des clichés angiographiques d'un œil normal et d'un œil atteint de DMLA sont présentés sur les Figures 5A et 5B.



A) œil normal



B) œil atteint de DMLA

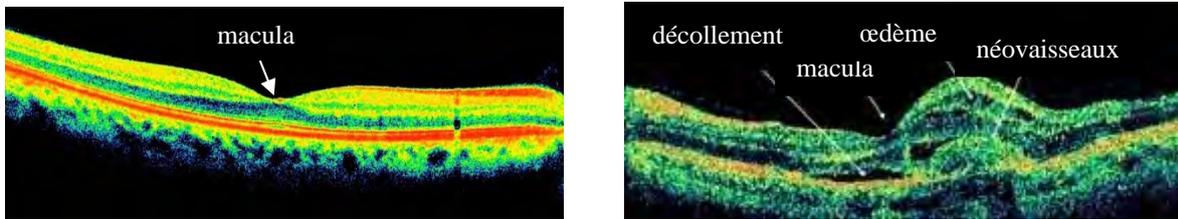
Figure 5 : Clichés angiographiques
(*chirurgie-de-la-retine-medisud*)

Lors de l'angiographie, l'aspect normal de la macula est facile à reconnaître car le pigment xanthophylle masque la fluorescence. On observe alors les artérioles et veinules rétinien sur un fond sombre (Figure 5A). Par contre, dans le cas d'un œil atteint de DMLA, des fuites du colorant au niveau des néovaisseaux choroïdiens peuvent être observées comme c'est le cas sur la Figure 5B.

Une angiographie au vert d'indocyanine peut être un complément utile et parfois nécessaire de l'angiographie à la fluorescéine (en cas d'allergie à la fluorescéine, en cas de doute sur la présence de néovaisseaux occultes, de lésions polypoïdales et d'anastomoses chorio-rétiniennes) (*site HAS*).

- **Tomographie en Cohérence Optique (OCT)**

La tomographie en cohérence optique est un examen rapide, non invasif et reproductible (*Sato T et al., 2004*) qui apporte des renseignements précis sur l'atteinte maculaire (présence de liquide sous-rétinien, néovaisseaux, décollement de l'épithélium pigmentaire...) Comme le montre la Figure 6, des images en deux dimensions peuvent être obtenues.



A) œil normal

B) Œil atteint de DMLA

Figure 6 : Clichés rétinien par Tomographie en Cohérence Optique

(sites oct-optovue et chu-lyon)

La Tomographie en Cohérence Optique peut fournir des mesures quantitatives de l'épaisseur de la rétine pour suivre l'évolution de la maladie, en particulier après traitement (Cocas G et al., 2004). Une reconstruction 3-D peut être effectuée et l'OCT « en face » permet une segmentation dans les divers plans de la rétine, de la choroïde et des néovaisseaux choroïdiens (Cocas F et al., 2013). Au stade de néovaisseaux choroïdiens, l'OCT permet d'identifier l'accumulation de fluide dans toutes les couches rétinienne et permet d'authentifier et de quantifier la perméabilité anormale des néovaisseaux (Van Kerckoven W et al., 2001). Cet examen présente cependant des limites car on ne peut, par exemple, pas visualiser la circulation rétinienne et choroïdienne et une opacité du cristallin ou une hémorragie sous-rétinienne peuvent rendre l'examen non fiable. L'OCT doit donc être réalisée en complément des photographies du fond d'œil et de l'angiographie à la fluorescéine pour un diagnostic différentiel et pronostique de DMLA (Soubrane G et al., 2007).

La synthèse de la stratégie diagnostique recommandée par l'HAS est présentée en Annexe 2.

Dans cette première partie, nous avons vu que la DMLA exsudative était une maladie chronique et évolutive qui touchait la macula. Du fait du vieillissement de la population, elle touche de plus en plus de personnes même si les facteurs de risque évitables sont maintenant connus et des mesures de prévention sont mises en place afin d'assurer un diagnostic précoce et une prise en charge optimale. Les ophtalmologistes disposent de différents moyens de diagnostic permettant de repérer les premiers symptômes, d'évaluer la localisation et l'étendue des atteintes et leur évolution. Ces outils permettent également de mettre en place une stratégie thérapeutique adaptée. Les thérapies disponibles sur le marché ainsi que celles en développement seront présentées dans la deuxième partie de cette thèse.

Partie II

Prise en charge thérapeutique de la DMLA exsudative

Le traitement de la forme néovasculaire de la DMLA fait l'objet d'une recherche intensive afin d'améliorer la prise en charge des patients. En effet, la néovascularisation au niveau de la rétine, signe d'un stade avancé, survient dans 20% des DMLA. Sa survenue est grave car la formation de néovaisseaux implique une destruction des tissus rétiens sous-jacents, des exsudats et des hémorragies responsables d'une perte rapide de la vision centrale. Le contrôle de cette angiogenèse est donc primordial et permet de limiter la perte de vision. Ainsi, différents traitements sont disponibles et la recherche scientifique est en plein essor afin d'améliorer la stratégie thérapeutique étant donné le nombre croissant de personnes atteintes (*Berdugo Polak M et Behar-Cohen F, 2008*). Dans cette deuxième partie seront présentés les traitements visant à combattre la DMLA exsudative. Deux types de thérapies sont disponibles : les traitements physiques et les traitements pharmacologiques par des antiangiogéniques principalement. Leur présentation se fera par ordre chronologique d'apparition dans la stratégie thérapeutique (du plus ancien au plus récent), ordre qui correspond aussi à leur fréquence d'utilisation (les traitements les plus récents étant plus largement utilisés).

I- Traitements physiques

Les premiers traitements disponibles pour le traitement de la DMLA étaient de type physique. Ils utilisent le procédé du laser en permettant de stabiliser l'évolution des phénomènes néovasculaires.

1- Photocoagulation au laser

Il y a encore une trentaine d'années, la photocoagulation au laser à l'argon était le seul traitement de la DMLA exsudative. Elle consiste en la destruction thermique des néovaisseaux anormaux mais un des premiers problèmes rencontré est qu'elle peut aussi toucher la rétine saine adjacente. De plus, cette technique ne concerne actuellement que des patients présentant des néovaisseaux choroïdiens extra-fovéolaires c'est-à-dire dont le centre de la vision n'est pas atteint, ce qui correspond aux stades très précoces de la maladie. Ainsi, seule une faible proportion des personnes atteintes de DMLA (20%) peut être traitée par cette technique (*Berdugo Polak M et Behar-Cohen F, 2008*). De plus, une récurrence est observée chez 50% des patients ; elle est parfois accompagnée d'une perte tardive de l'acuité visuelle (*Schmidt-Erfurth*

U et Hasan T, 2000). La situation a évolué avec l'arrivée de nouvelles thérapies présentées dans les paragraphes suivants.

2- Photothérapie dynamique

Devant le manque de traitements efficaces sur les néovaisseaux choroïdiens, la photothérapie dynamique apparue à l'an 2000 s'est alors imposée comme l'un des traitements majeurs de la DMLA exsudative en élargissant l'indication aux néovaisseaux centraux.

- **Mécanisme d'action**

Le principe de la photothérapie dynamique (PDT) est qu'une molécule photosensible non toxique dénommée photosensibilisant est injectée en intraveineux au patient. Cette molécule est ensuite activée par exposition à une lumière afin de produire un effet photochimique dans une zone déterminée. L'avantage est que, en théorie, on obtient une double sélectivité : la concentration du photosensibilisant est importante au niveau du tissu-cible et l'illumination est limitée à la zone à traiter (*Schmidt-Erfurth U et Hasan T, 2000*). Dans le cas de du traitement de la DMLA, la molécule utilisée est la vertéporfine (Visudyne® - Novartis) qui a obtenue une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 2000 aux Etats-Unis et en France. C'est une molécule lipophile dérivée de la porphyrine qui, une fois dans la circulation sanguine, se lie aux lipoprotéines *LDL*. Le complexe formé est internalisé par les cellules proliférantes endothéliales provoquant leur mort après illumination. Il en résulte une activation plaquettaire qui va former un thrombus et aboutir à une occlusion vasculaire. Ainsi, les néovaisseaux rétiniens sont détruits. Dans l'étude de phase III *TAP (Treatment of Age-related macular degeneration with Photodynamic therapy)* le traitement par vertéporfine *versus* placebo a montré une réduction du risque de perte d'acuité visuelle après 48 mois de suivi (*Français C et al., 2006*).

- **Effets indésirables et limites**

Les effets secondaires liés à la photothérapie dynamique résultent directement de son mécanisme d'action. En effet, le but est de détruire les néovaisseaux choroïdiens tout en conservant intactes les structures normales environnantes. Mais le faisceau laser qui active le photosensibilisant provoque un échauffement de la rétine qui crée un effet rebond sur la néovascularisation. De plus, des troubles visuels transitoires (vision floue, hallucinations...) peuvent apparaître dans la semaine suivant le traitement (*Soubrane G et al., 2002*) et une étude rapporte que 2% des patients ont une perte brutale de l'acuité visuelle à la suite du traitement (*Wormald R et al., 2005*). Cette technique cible uniquement les stades avancés de la maladie et

ne limite pas sa progression. En France elle avait une double indication pour le traitement des néovaisseaux visibles et occultes. Cette deuxième indication a été retirée de l'AMM européenne en juin 2007 ce qui réduit le nombre de patients pouvant être traités (*Kodjikian L, legifrance.gouv.fr, 2007*). Environ 30% des patients atteints de DMLA peuvent bénéficier de la PDT (*Quinze-vingts, 2012*).

En conclusion, la PDT réduit d'environ 50% le risque de détérioration supplémentaire de l'acuité visuelle mais il y a rarement une amélioration de celle-ci. De plus, elle nécessite un retraitement à 3 mois dans 90% des cas (*Soubrane G et al., 2002*).

Avant la mise sur le marché des traitements anti-angiogéniques présentés dans le paragraphe suivant, la PDT était le traitement de référence contre la néovascularisation choroïdienne.

II- Traitements anti-angiogéniques

En 2006, une nouvelle ère est apparue dans la stratégie thérapeutique de la DMLA exsudative avec l'arrivée des anti-angiogéniques ou anti-VEGF. En effet, ces molécules ciblent spécifiquement un des médiateurs impliqués dans la croissance et la perméabilité des néovaisseaux : le *VEGF*. Contrairement aux autres traitements, une perspective de récupération fonctionnelle de la vision des patients atteints de DMLA est alors envisageable.

Après un rappel sur le *VEGF*, nous présenterons les différentes molécules anti-angiogéniques disponibles sur le marché à travers leur structure, mécanisme d'action, études cliniques associées, posologie et effets indésirables.

1- Généralités sur les anti-angiogéniques

La recherche des mécanismes de l'angiogenèse a permis de comprendre les processus moléculaires qui conduisent à la formation de néovaisseaux. Ainsi le rôle essentiel du VEGF-A et de ses récepteurs dans la néovascularisation et dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire a abouti au développement de molécules thérapeutiques ayant pour cible le VEGF (*Van Wijngaarden P et al., 2005*).

Le VEGF est une glycoprotéine qui favorise la division des cellules endothéliales vasculaires (*Ng EW et al., 2005*). Il est fabriqué de façon excessive au niveau de l'œil lors de certains états pathologiques comme la DMLA exsudative. La famille des VEGF regroupe 6 membres : VEGF-A à VEGF-E et le PlGF (*Placental Growth Factor*). Leur structure est commune mais ils présentent des propriétés physiologiques différentes. Leur action se fait grâce à des récepteurs tyrosine kinase : VEGFR 1, 2 et 3 (*Bhisitkul RB, 2006 ; Ferrara N et*

al., 2006). Dans le cas du développement d'une angiogenèse pathologique, c'est le VEGF-A qui joue un rôle central. En effet, il favorise la néovascularisation par des actions mitogènes, de recrutement et anti-apoptotique sur les cellules endothéliales. Ainsi, il contribue à la prolifération de ces cellules, à leur survie, facilite leur migration et augmente la perméabilité vasculaire (*Kourlas H et al., 2006*). La production du VEGF est stimulée par une hypoxie et l'action d'autres facteurs de croissance. Le VEGF-A agit sur les récepteurs VEGFR1 et 2 et ce dernier joue le rôle le plus important dans la néovascularisation. Ainsi, contrairement aux vaisseaux anciennement formés, les néovaisseaux présentent une dépendance importante vis-à-vis du VEGF et constituent donc une cible de choix dans la stratégie thérapeutique. Dans les années 90, des essais expérimentaux chez le singe ont montré l'efficacité de l'injection d'anticorps anti-VEGF sur l'inhibition de la néovascularisation, notamment choroïdienne (*Adamis AP et al., 1996*). Cette preuve d'efficacité a été le point de départ du développement de molécules thérapeutiques ciblant le VEGF présentées dans cette deuxième partie.

2- Molécules anti-angiogéniques

D'après les recommandations de l'HAS, « dès que le diagnostic de DMLA exsudative rétrofovéolaire est posé, il est recommandé d'instaurer, le plus rapidement possible, un traitement par anti-VEGF, quel que soit le niveau d'acuité visuelle initial ». Ainsi, dès leur apparition sur le marché, les anti-VEGF sont devenus les traitements de référence dans la DMLA humide. Les différentes molécules seront présentées par ordre chronologique d'apparition sur le marché qui correspond également à leur fréquence d'utilisation (par ordre croissant).

2.1- Pegaptanib de sodium

○ structure

Le Pegaptanib de sodium est un aptamère, c'est-à-dire un oligonucléotide de 28 bases liées de façon covalente représenté Figure 7 (*site Macugen, Patient Information*).

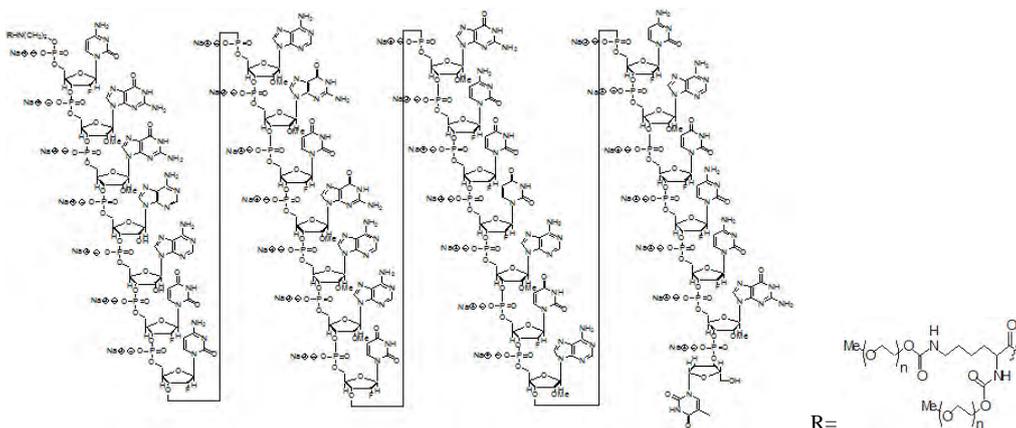


Figure 7 : Structure chimique du Pegaptanib de sodium

Deux unités de polyéthylène glycol sont fixées à cette molécule dite pégylée afin d'assurer sa stabilité conformationnelle et optimiser ses propriétés pharmacocinétiques, notamment sa demi-vie au niveau du corps vitré après injection (*Fajnkuchen F et Cohen SY, 2008*).

○ **mécanisme d'action**

La molécule se lie avec une affinité élevée et une haute spécificité à l'isoforme VEGF 165 dont l'action anti-angiogénique semble prédominante (*Ferrara N et al., 2006*). Cette liaison permet d'empêcher l'activation des récepteurs au VEGF et d'inhiber l'angiogenèse.

○ **études cliniques**

L'efficacité du pegaptanib de sodium dans le traitement des formes exsudatives de DMLA a été prouvée dans l'étude clinique *VISION (VEGF Inhibition Study In Ocular Neovascularization)* multicentrique, randomisée et contrôlée (*Chakravarthy U et al. 2006*). Une des conclusions de cette étude est que, traités à un stade précoce de la maladie, les patients ont 10 fois moins de risque de subir une perte importante d'acuité visuelle que des patients non traités (*Gonzales CR, 2005*).

○ **AMM et posologie**

Le Macugen[®] est commercialisé par les sociétés Eyetech Pharmaceuticals et Pfizer. Il a été mis sur le marché en 2004 aux Etats-Unis et en 2006 en Europe (*Gragoudas ES et al., 2004*). En France, il se présente sous forme d'une seringue pré-remplie unidose contenant 0,3mg de solution injectable. Il fait partie de la liste I des médicaments, doit être prescrit par un spécialiste en ophtalmologie et son prix est de 745 euros, 100% remboursé par la sécurité sociale. Les antécédents médicaux du patient relatifs aux réactions d'hypersensibilité doivent être évalués avant de procéder à l'administration. La fréquence d'administration est d'une injection intravitréenne dans l'œil atteint toutes les six semaines, soit 9 injections par an (*Vidal¹, 2012*).

○ **effets indésirables**

Les effets indésirables les plus fréquents (environ 1% des cas traités) sont rencontrés au niveau oculaires tels que : une augmentation de la pression intraoculaire, des endophtalmies, hémorragies rétiniennes et vitréennes et un décollement de la rétine. Dans la majorité des cas, on estime que ces effets indésirables sont dus à la procédure d'injection intravitréenne et pas au produit lui-même. Après commercialisation, des cas de réactions anaphylactiques graves de type œdème de Quincke ont été rapportés plusieurs heures après l'administration (*EMA¹, RCP Macugen, 2006*).

Le Pegaptanib de sodium bloque l'action d'un seul isoforme du VEGF. Son efficacité est moindre par rapport à d'autres molécules mises sur le marché qui seront présentées ci-dessous.

2.2- Ranibizumab

o structure

Le ranibizumab est une molécule chimérique, c'est-à-dire qu'elle est composée à la fois d'une séquence humaine ce qui la rend moins antigénique (reconnaissable par le système immunitaire) et d'un épitope issu de la souris qui se lie avec une haute affinité au VEGF-A. Cette molécule a été développée spécifiquement pour le traitement des formes exsudatives de DMLA en modifiant la structure de l'anticorps monoclonal murin A.4.6.1 dirigé contre le VEGF-A humain. Deux molécules sont issues de ce même anticorps : le ranibizumab (48 kDa) et la bevacizumab (149 kDa) comme représenté sur la Figure 8.

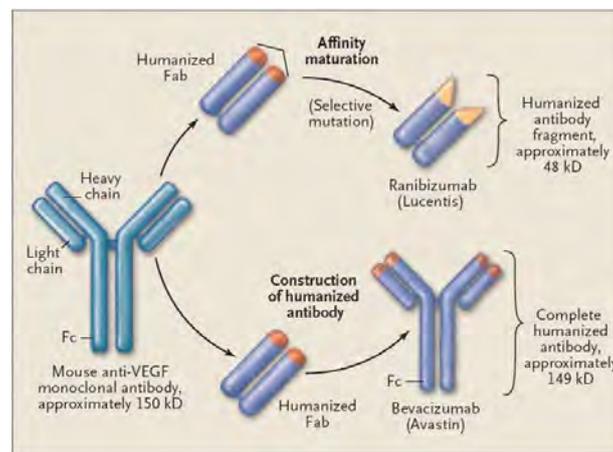


Figure 8 : Schéma explicatif de la formation du ranibizumab et du bévacizumab
(Steinbrook R, 2006)

Le ranibizumab est obtenu après maturation de la fraction humanisée Fab de l'anticorps murin (MB1.6) ce permet d'augmenter son affinité pour le VEGF-A (Kaiser PK, 2006). Ainsi, le ranibizumab ($K_d=0,14nM$) a une affinité pour le VEGF plus de 100 fois plus importante que celle de la fraction Fab-12 dont est issu le bevacizumab ($K_d=20nM$) (Ferrara N et al., 2006 ; Gillies MC, 2006). Cette forme fractionnée du ranibizumab a été développée car des études antérieures sur l'injection intravitréenne d'un anticorps entier, le Trastuzumab (Herceptin® contre le cancer du sein) avaient montré que seule sa forme fractionnée permettait une pénétration intra-rétinienne (Mordenti J et al. 1999). En effet, il a été démontré par des expériences *ex-vivo*, qu'au-delà de 76kDa la pénétration intra-rétinienne des molécules était compromise (Jackson TL et al., 2003). Compte tenu de la localisation sous-rétinienne des néovaisseaux dans la DMLA, une forme fractionnée semblerait la plus appropriée (Kaiser PK, 2006).

○ **mécanisme d'action**

Le ranibizumab est adapté au milieu confiné intraoculaire, peut pénétrer dans l'ensemble des couches de la rétine et sa demi-vie systémique est courte : 15 heures contre 21 jours pour l'anticorps entier (*Berdugo Polak M et Behar-Cohen F, 2006*). Contrairement au pegaptanib vu précédemment, le ranibizumab se lie et inhibe l'action de toutes les isoformes de VEGF-A et de ses produits de dégradation.

○ **études cliniques**

Plusieurs études randomisées ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité et la tolérance des injections de ranibizumab. Les deux principales études de phase III qui seront présentées ici, sont l'étude MARINA (*Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration*) et l'étude ANCHOR (*The Anti-VEGF Antibody for the treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration trial*).

L'étude MARINA a évalué l'efficacité et le profil de tolérance du ranibizumab administré mensuellement à 716 patients suivis pendant 2 ans. Les principaux critères d'inclusion étaient : être âgé de plus de 50 ans, avoir une acuité visuelle corrigée comprise entre 20/40 et 20/320 (correspondant à un score de 73 à 25 sur l'échelle ETDRS) et présenter des néovaisseaux compliquant une DMLA atteignant le centre de la fovéa. Les patients ont été répartis dans 3 groupes recevant respectivement : 0,3mg, 0,5mg de ranibizumab ou un placebo. La PDT par vertéporfine était autorisée s'il y avait une modification des vaisseaux occultes (sous l'épithélium pigmentaire) en néovaisseaux à prédominance visible sus-épithéliaux. Les résultats de cette étude à 2 ans sont résumés sur la Figure 9.

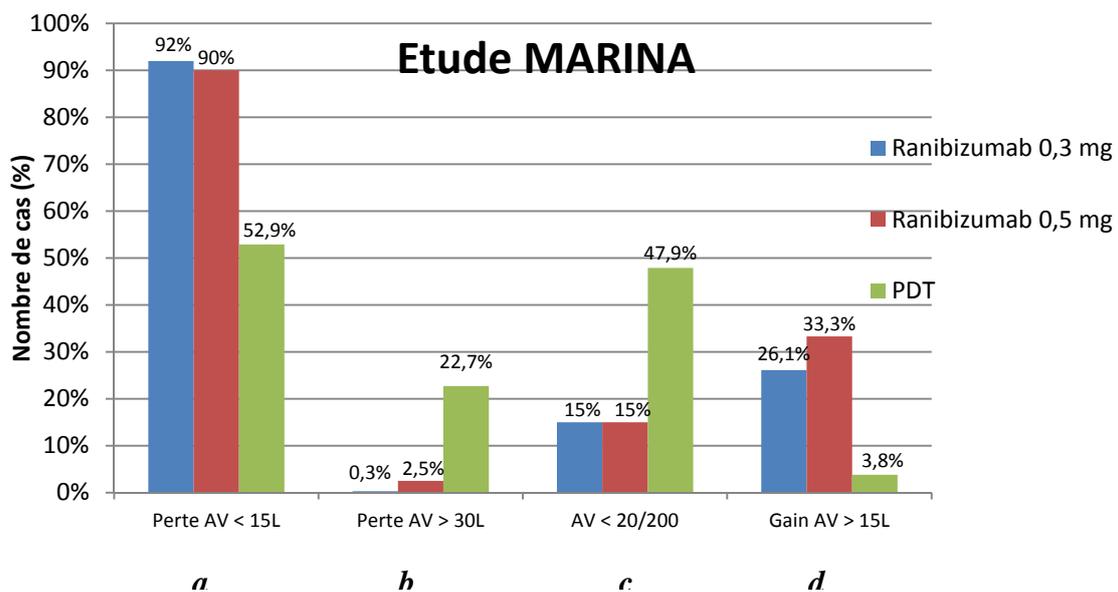


Figure 9 : Représentation graphique des résultats de l'étude MARINA
 AV : Acuité Visuelle ; <15L : moins de 15 lettres lues sur l'échelle ETDRS
 (d'après Rosenfeld PJ et al., 2006 ; Fajnkuchen F et Cohen SY, 2008)

Après deux ans de traitement, on a constaté que l'effet du ranibizumab était supérieur à celui du placebo et de la PDT. Cela en limitant la baisse d'acuité visuelle AV < 15 lettres de l'échelle EDTRS (a), en prévenant la survenue d'une baisse sévère de l'AV supérieure à 30 lettres (b) et en luttant contre l'installation d'une cécité avec une AV inférieure à 20/200 (c). De plus, une évolution majeure a été observée par rapport aux stratégies thérapeutiques présentées précédemment : le ranibizumab peut permettre un gain d'AV. Ainsi, le gain d'AV > 15 lettres atteint environ 30% des patients traités par ranibizumab pendant 2 ans (d). Ce gain est observable dès le 7^{ème} jour après l'injection alors qu'une perte progressive de l'AV tout au long du suivi a été mesurée chez les patients du groupe témoin (*Rosenfeld PJ et al., 2006*).

L'étude ANCHOR est une étude multicentrique, randomisée et en double aveugle (*Brown DM et al., 2009*). Son but était de comparer l'efficacité de l'injection de ranibizumab par rapport à la PDT. Durant 2 ans, 423 patients ont été suivis. Les patients étaient également répartis en 3 groupes : 0,3mg, 0,5mg de ranibizumab ou traitement par PDT. Les principaux critères d'inclusion étaient identiques à l'étude MARINA présentée précédemment. Les résultats présentés sur la Figure 10 confirment ceux de l'étude MARINA.

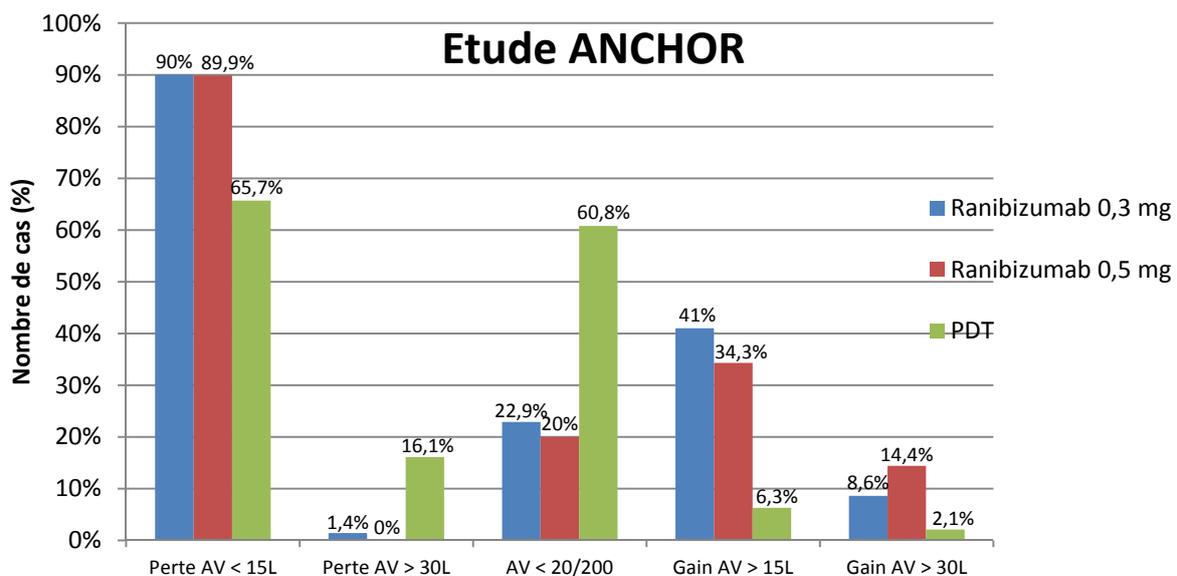


Figure 10 : Représentation graphique des résultats de l'étude ANCHOR
 AV : Acuité Visuelle ; <15L : moins de 15 lettres lues sur l'échelle ETDRS
 (d'après *Brown DM et al., 2009*)

Ces résultats montrent qu'après 2 ans de traitement le ranibizumab apporte un bénéfice clinique supérieur à celui de la PDT par vertéporfine en maintenant et améliorant l'acuité visuelle des patients. La supériorité a été mise en évidence dès le 1^{er} mois de traitement par ranibizumab et a persisté durant les deux ans de l'étude.

Le point le plus intéressant que soulignent ces deux études est le gain d'acuité visuelle possible grâce à l'injection de ranibizumab comme l'illustrent les graphes de la Figure 11

représentant le nombre de lettres gagnées ou perdues en fonction de la durée du traitement par ranibizumab ou par placebo/PDT.

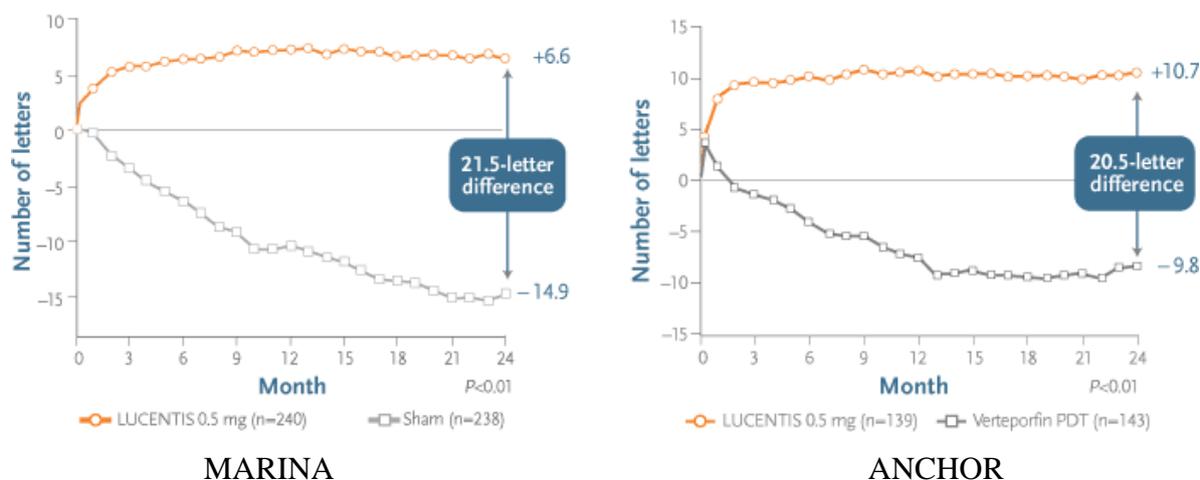


Figure 11 : Représentation des résultats des études MARINA et ANCHOR concernant le gain d'acuité visuelle
 Lucentis® : ranibizumab, Sham : injection simulée
 (site lucentis.com)

Les courbes grises représentent le nombre de lettres perdues, c'est-à-dire ne pouvant plus être lues par le patient après l'injection d'un placebo (-14,9 étude MARINA) ou lors d'un traitement par PDT (-9,8 étude ANCHOR) après 2 ans de traitement. Les courbes orange montrent le gain d'acuité visuelle permis grâce à l'injection de ranibizumab 0,5mg. Ainsi, contrairement aux traitements présentés antérieurement (photocoagulation laser, PDT et Pegaptanib de sodium), le ranibizumab permet non seulement de limiter la perte d'acuité visuelle mais surtout de l'améliorer (+6,6L et +10,7L).

o AMM et posologie

Le ranibizumab est commercialisé par le laboratoire Novartis Pharma sous le nom de Lucentis® en France depuis 2007. C'est un médicament d'exception qui fait partie de la liste I et sa prescription est réservée à un spécialiste en ophtalmologie. Il se présente sous forme d'un flacon de 0,23mL contenant une solution injectable à 10mg/mL ainsi qu'un kit (seringues et aiguilles) pour permettre son injection de manière aseptique dans la cavité intravitréenne. La dose recommandée pour l'indication « Traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge exsudative avec néovascularisation choroïdienne rétrofovéolaire » est de 0,5 mg, administrée une fois par mois en une injection intravitréenne unique. Le traitement sera poursuivi jusqu'à ce que l'acuité visuelle maximale soit atteinte, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'elle soit stable lors de trois évaluations mensuelles consécutives. Par la suite, l'acuité visuelle doit être contrôlée une fois par mois. En cas de nouvelle baisse de l'acuité visuelle le traitement doit être réinstauré. Des injections mensuelles doivent alors être réalisées jusqu'à ce que l'acuité visuelle soit à

nouveau stable lors de trois évaluations mensuelles consécutives (ceci impliquant un minimum de deux injections). L'intervalle entre deux doses ne doit pas être inférieur à 1 mois (*Vidal*³, 2013). Son prix est actuellement en France de 895,57 euros le flacon, 100% remboursé par la Sécurité Sociale. En 2012, il occupe le 2^{ème} rang en chiffre d'affaires des substances actives les plus utilisées en ville soit 300 millions d'euros en plus par rapport à 2010 (+29%) (*ANSM*², 2013).

- **effets indésirables**

Les effets indésirables les plus fréquemment rencontrés suite à une injection de ranibizumab sont : augmentation de la pression intraoculaire, endophtalmie, uvéite, hémorragie du vitré et décollement rétinien. Ils relèvent plus de l'injection intravitréenne proprement dites que de la substance active.

Du fait de l'efficacité du ranibizumab et de sa structure similaire au bevacizumab nous allons voir dans le paragraphe suivant que l'utilisation cette dernière molécule dans le traitement de la DMLA exsudative est l'objet de discordes entre les autorités de santé françaises et les praticiens spécialistes en ophtalmologie.

2.3- Bevacizumab

- **structure**

Comme illustré sur la Figure 8 vue précédemment, le bevacizumab est, comme le ranibizumab issu de l'humanisation d'un anticorps murin. Mais contrairement à ce dernier, c'est un anticorps entier de 149 kDa présentant deux domaines de liaison antigénique. Des études contradictoires ont été publiées concernant la différence d'efficacité entre les anticorps entiers et fractionnés. En effet, *Mordenti et al., 1999*, ont constaté que chez le singe, un anticorps entier (rhuMab HER2 différent du bevacizumab) ne traverse pas la limitante interne de la rétine alors qu'une fraction Fab du même anticorps diffuse à travers toutes les couches de la rétine. Au contraire, *Shahar et al., 2006*, ont montré la capacité du bevacizumab à franchir la totalité des couches de la rétine, cette fois-ci chez le lapin. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les molécules étudiées n'étaient pas identiques et que les animaux choisis étaient jeunes, dépourvus de macula et non atteint de DMLA. Ainsi, un œdème rétinien associé à une DMLA pourrait, par exemple, favoriser la pénétration des molécules (*Spaide RF et al., 2006*).

- **mécanisme d'action**

Tout comme le ranibizumab, le bevacizumab est un anti-angiogénique dirigé contre toutes les isoformes biologiquement actives de VEGF-A.

- **utilisation en ophtalmologie**

Le bevacizumab sous le nom d'Avastin[®] a obtenu un agrément de la *FDA* en 2004 (par Genentech) et en janvier 2005 dans tous les pays de l'Union Européenne (par le laboratoire Roche) pour le traitement des cancers colorectaux métastasés. Comme on l'a vu précédemment, sa structure et son mode d'action sont proches de celles du ranibizumab recommandé pour le traitement de la DMLA exsudative. Ainsi, l'utilisation de l'Avastin[®] hors AMM s'est petit à petit répandue. En effet, le coût d'un traitement par Lucentis[®] est d'environ 800 euros/mois/patient alors que celui de l'Avastin[®] est compris entre 30 et 50 euros/mois/patient (selon l'utilisation unique ou partagée d'un flacon et le coût du reconditionnement par un pharmacien), soit 20 fois moins cher. Malgré cette différence majeure de prix, en 2012 des mesures d'interdiction d'utilisation de cette spécialité hors AMM pour le traitement de la DMLA ont été prises en France. Dès 2009, l'ANSM (ex-AFSSAPS) rappelle dans un « *Point d'information sur l'utilisation hors AMM de l'Avastin[®]* » que la forme pharmaceutique (25mg/mL solution à diluer pour perfusion) n'est indiquée que pour le traitement des cancers et sa prescription est réservée aux spécialistes en oncologie. Elle n'est donc pas adaptée à une administration intravitréenne. De plus, des incertitudes persistent en ce qui concerne : la stabilité et les conditions d'asepsie lors d'un éventuel reconditionnement en seringue, le bénéfice non clairement démontré en ophtalmologie et le manque de données de sécurité d'emploi de l'Avastin[®] en ophtalmologie (*site ansm.sante.fr*). Dans un communiqué du 30 juillet 2012, la DGS rappelle que « la loi du 29 décembre 2011, relative au renforcement de la sécurité sanitaire du médicament, interdit la réalisation de préparations magistrales lorsqu'il existe déjà une spécialité pharmaceutique disposant de l'AMM » comme c'est le cas avec le Lucentis[®] déjà présent sur le marché (*Communiqué DGS, 2012*). La Ministre des Affaires sociales et de la Santé, Marisol Touraine, a demandé que soit envisagée une extension de l'AMM de l'Avastin[®] par les laboratoires Roche ainsi que la réévaluation du prix du Lucentis[®] « afin de préserver les impératifs de sécurité sanitaire tout en garantissant l'accès aux traitements ».

- **études cliniques comparatives**

Dans ce contexte la mise en place d'une étude comparant l'efficacité des deux molécules ranibizumab et bevacizumab a été mise en place par les Hospices civils de Lyon à la demande des autorités de santé. Ainsi, l'étude GEFAL (Groupe d'Evaluation Français Avastin versus

Lucentis) a eu pour objectif de démontrer la non-infériorité d'efficacité clinique de l'Avastin® par rapport au Lucentis® à 12 mois sur l'acuité visuelle de patients atteints de DMLA néovasculaire. Cette étude randomisée, en double-aveugle a été menée de juin 2009 à novembre 2012. Les patients étaient âgés de 79 ans en moyenne ; 191 ont reçu des injections intravitréennes de 1,25mg de bécavizumab et 183 ont reçu 0,5mg de ranibizumab. Les premiers résultats présentés lors du 119^{ème} congrès de la SFO par le Pr Kodjikian en mai 2013 sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Résultats de l'étude GEFAL

	Avastin® (bevacizumab)	Lucentis® (ranibizumab)
Moyenne des injections sur 12 mois (n)	6,8	6,5
Gain \geq 15 lettres	20,4%	21,3%
Acuité visuelle finale \geq 20/40	41,4%	37,3%

La non-infériorité de l'Avastin® par rapport au Lucentis® en termes d'efficacité fonctionnelle sur l'acuité visuelle a ainsi été démontrée. Concernant les effets indésirables, aucune différence significative n'a été observée mais le design de l'étude n'était pas conçu pour répondre à ce critère. Ainsi, pour obtenir une meilleure puissance statistique une méta-analyse a été réalisée par les auteurs de l'étude GEFAL. Ils ont rassemblé les données des quatre essais cliniques internationaux (CATT, Etats-Unis ; IVAN, Royaume-Uni ; MANTA, Autriche et GEFAL, France) pour assurer une homogénéité et émettre un avis sur la tolérance de l'Avastin®. Il en ressort que les effets indésirables systémiques graves sont plus fréquents avec l'Avastin® (Risque relatif=1,24, IC_{95%}=0,7-2,2) mais si chaque sous-groupe (décès, AVC, infarctus...) est analysé individuellement la conclusion est plus nuancée. Des analyses plus approfondies sont nécessaires pour conclure sur la tolérance de l'Avastin (*sites Medscape et SFO*).

Comme le rappelle la lettre ouverte destinée à la Ministre de la Santé rédigée par le Syndicat de la Médecine Générale en juin 2013, l'utilisation de l'Avastin® n'a toujours pas été autorisée pour le traitement de la DMLA malgré les résultats positifs des différentes études cliniques. Le syndicat soulève ici les liens financiers qui unissent les laboratoires Novartis (Lucentis®) et Roche (Avastin®). Ainsi, le laboratoire Roche via sa filiale Genentech assurant l'exclusivité de la vente de Lucentis® en Amérique du Nord et grâce à des royalties sur les ventes de Lucentis® dans le reste du monde en accord avec Novartis n'a pas d'intérêts à demander une extension d'AMM et les études coûteuses associées (*Genentech, 2003 ; SMG, 2013*). Au vue des besoins de santé de la population et de l'équilibre financier de l'assurance maladie en France, une décision est fortement attendue par les professionnels de santé.

L'utilisation de l'Avastin® reste, à ce jour, interdite même après reconditionnement ophtalmologique par les pharmacies hospitalières en France.

Seul le ranibizumab était donc recommandé en première intention pour le traitement des DMLA exsudative jusqu'à l'apparition très récemment d'une nouvelle molécule, l'Aflibercept présentée dans le paragraphe suivant.

2.4- Aflibercept

o structure

Contrairement aux anti-VEGF présentés précédemment, l'Aflibercept est une protéine recombinante de 115kDa et non pas un anticorps. Comme représenté Figure 12, l'ensemble est composé d'une partie mimant le VEGFR 1 (en rose) attachée à une partie mimant le VEGFR 2 (en vert) elle-même fixée au fragment Fc d'une immunoglobuline G humaine.

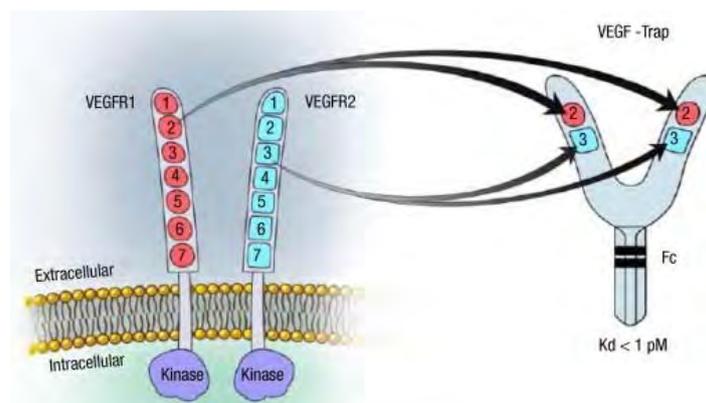


Figure 12 : Représentation schématique de la protéine recombinante aflibercept
(Mitchell EP, 2013)

Grâce à cette similarité aux récepteurs, la liaison de l'aflibercept aux VEGFR est 100 à 200 fois plus importante que celle des autres molécules thérapeutiques anti-VEGF. Il semble également que la forme de la molécule empêcherait la formation de complexes inactifs, ce qui expliquerait l'absence de perte d'efficacité au fur et à mesure des injections (Desmettre T, 2013).

o mécanisme d'action

L'aflibercept va cibler les isoformes du VEGF et le PlGF en mimant le rôle de ses récepteurs VEGFR 1 et 2. En effet, cette protéine recombinante est aussi appelée *VEGF-trap* car elle va pouvoir cibler et piéger le facteur de croissance entre les 4 domaines présentés dans la Figure 12 (Stewart MW et al., 2012). Ce ciblage permet une liaison encore plus importante

du VEGF à la protéine recombinante qu'à ses récepteurs natifs et bloque ainsi la réponse angiogénique (*Browning DJ et al., 2012*). Sa demi-vie intravitréenne est estimée à 7,1 jours et sa durée d'action peut atteindre 2,5 mois ce qui dépasse celle de 1 mois du ranibizumab

o **études cliniques**

L'aflibercept a tout d'abord été utilisé sous le nom de Zaltrap® en oncologie. L'approbation par la FDA de l'aflibercept pour une formulation intraoculaire s'est faite grâce aux résultats de deux études de phase III, randomisées, en double-aveugle : VIEW 1 et VIEW 2 (*VEGF Trap-Eye : Investigation of Efficacy and Safety in Wet Age-Related Macular Degeneration*). Ces études ont été réalisées afin d'évaluer la sécurité et l'efficacité de l'aflibercept par rapport à la molécule de référence le ranibizumab pour le traitement de la DMLA exsudative. Il est à noter que les deux études sont concurrentielles et réalisées en Amérique du Nord pour VIEW 1 (1217 patients) et au niveau international pour VIEW 2 (1240 patients). Elles présentent les mêmes conditions avec 4 groupes de traitement durant 52 semaines de traitement répartis de la manière suivante : 0,5mg ou 2mg d'aflibercept mensuellement, 2mg d'aflibercept tous les 2 mois après une dose de charge pendant 3 mois ou 0,5mg de ranibizumab mensuellement. L'évaluation principale était d'identifier le pourcentage de patients ayant maintenu leur acuité visuelle au bout de 52 semaines, ce qui est défini par une perte de moins de 15 lettres sur l'échelle ETDRS. Les résultats sont présentés sur la Figure 13.

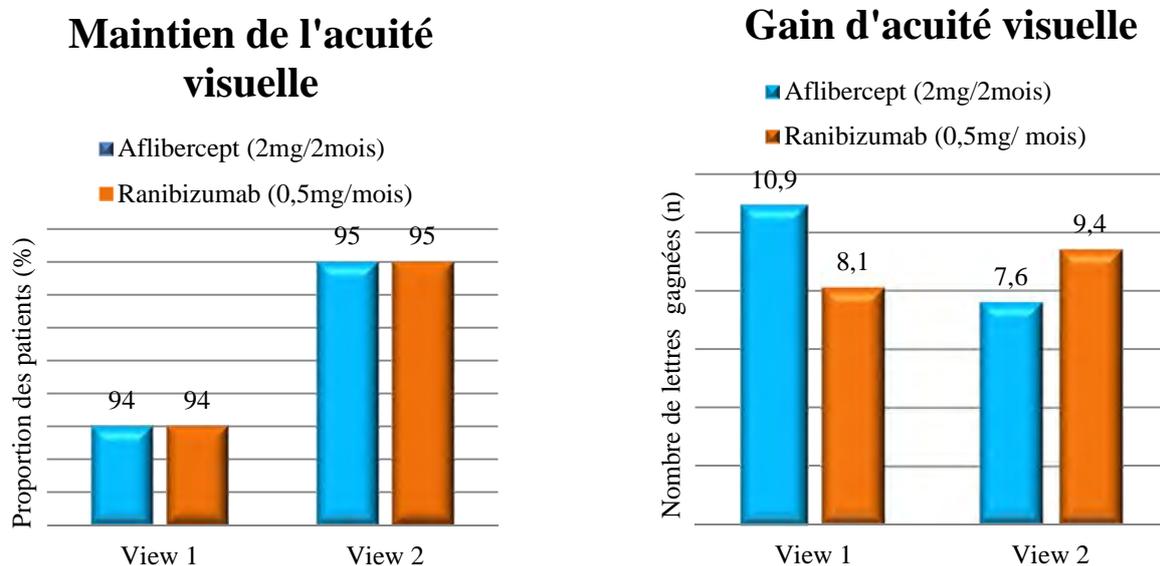


Figure 13 : Résultats des études View 1 et 2 relatifs au maintien et au gain d'acuité visuelle.

Les principales conclusions de ces deux études sont identiques : les deux groupes de patients ayant reçu l'aflibercept ont montré une non-infériorité et une équivalence sur le plan clinique par rapport à ceux ayant reçu une injection mensuelle de ranibizumab. De plus, les effets indésirables oculaires ou systémiques ont été similaires dans l'ensemble des groupes

(Heier JS et al., 2012). De ces études ressort également le fait que la dose recommandée d'aflibercept est de 2mg toutes les 4 semaines pendant 3 mois puis 2mg toutes les 8 semaines (Nguyen QD et al., 2012). Celles du ranibizumab du bevacizumab (hors-AMM) sont beaucoup plus fréquentes avec respectivement 0,5mg et 1,25-2,5mg par mois (Chen E et al., 2010 ; Costa RA et al., 2006). Ainsi, l'avantage de l'aflibercept est que la fréquence d'injection est réduite par rapport aux autres anti-VEGF ce qui diminue le nombre d'effets indésirables directement liés à l'injection ainsi que le coût engendré par le traitement (personnel de santé, logistique). Les trois traitements sont considérés équivalents en ce qui concerne leur efficacité, sécurité et effets indésirables. Seul le coût du traitement varie sensiblement entre ces trois molécules. En effet, ramené à une année de traitement pour un patient les coûts (sans frais annexe lié au personnel de santé) s'élèvent à : 23400\$ pour le ranibizumab, 14800\$ pour l'aflibercept et seulement 600\$ pour le bevacizumab prescrit hors AMM (Thomas M et al., 2013).

○ **AMM et posologie**

En France, l'obtention de l'AMM de l'aflibercept sous le nom Eylea® pour le traitement de la DMLA exsudative a été délivrée en novembre 2012 au laboratoire Bayer Santé. La spécialité sera prochainement disponible sur le marché français (fin novembre 2013) sous forme d'une solution injectable à 40mg/mL. La dose recommandée est de 2 mg d'aflibercept ce qui correspond à 50 µl de solution à injecter en intravitréen. A l'instauration du traitement, Eylea sera injecté une fois par mois pendant 3 mois consécutifs suivi d'une injection tous les 2 mois. Après les 12 premiers mois de traitement, l'intervalle entre deux injections peut être prolongé en fonction des résultats visuels et anatomiques (EMA², 2013).

○ **effets indésirables**

D'après les deux études présentées dans le paragraphe précédent, les effets indésirables les plus fréquents (chez au moins 5 % des patients traités) étaient une hémorragie conjonctivale (26,7 %), une douleur oculaire (10,3 %), un décollement du vitré (8,4 %), une cataracte (7,9%), des corps flottants vitréens (7,6 %) et une élévation de la pression intraoculaire (7,2 %). Des effets indésirables graves liés à la procédure d'injection sont apparus dans moins de 1 injection sur 1 000 et incluaient une endophtalmie, une cataracte traumatique et une élévation passagère de la pression intraoculaire (Vidal², 2013).

L'arsenal thérapeutique pour lutter contre la DMLA exsudative s'est étendu ces dernières années ce qui permet d'améliorer le pronostic des patients. Les traitements anti-angiogéniques, ranibizumab et prochainement aflibercept en monothérapie sont recommandés en première

intention. Cependant, la pertinence de traitements combinés dans la prise en charge de la DMLA exsudative a rapidement vu le jour (*Fajnkuchen F et Cohen SY, 2008*). Les études cliniques évaluant ces associations seront présentées dans le paragraphe suivant.

III- Associations thérapeutiques et perspectives

1- Associations thérapeutiques

Bien qu'une monothérapie avec le ranibizumab ou l'aflibercept ait montré une bonne efficacité, différentes études cliniques ont été ou sont en cours de réalisation pour évaluer l'effet d'une association des traitements présentés dans les paragraphes précédents. L'idée de combiner ces thérapies vient du fait que leurs cibles sont différentes. Le but de ces associations est bien entendu d'obtenir une amélioration de l'acuité visuelle mais également d'augmenter l'intervalle de temps entre deux administrations. Trois principales études ont été effectuées : RADICAL, MONT BLANC et DENALI dont les conditions et les résultats sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Récapitulatif des résultats de 3 études concernant une association thérapeutique

	RADICAL <i>(Clinicaltrial.gov¹, 2011)</i>	MONT BLANC <i>(Larsen M et al., 2012)</i>	DENALI <i>(Kaiser PK et al., 2012)</i>
Durée	12 mois		
Type	Phase 2	Phase 2	Phase 3
Objectif	Comparaison efficacité et sécurité de la combinaison PDT+ RNB par rapport à la monothérapie RNB pour diminuer la fréquence des injections de RNB		
Design	162 patients 4 groupes : - trithérapie PDT ^{1 ou 2} + RNB + DXT - bithérapie : PDT + RNB - monothérapie RNB	255 patients 2 groupes : - bithérapie : PDT + RNB - monothérapie RNB	321 patients 3 groupes : - bithérapie : PDT ^{3 ou 4} +RNB - monothérapie RNB
Résultats	- retraitement moins fréquent pour les 3 associations par rapport à la monothérapie. - pas d'augmentation de risque d'effets indésirables avec une combinaison	- gain d'acuité visuelle avec la bithérapie - pas de bénéfice démontré pour la diminution du nombre d'injection du RNB sur 12 mois	- la bithérapie et la monothérapie améliorent l'acuité visuelle à 12 mois - la tolérance et la sécurité des 3 régimes testés sont comparables

Dexa= Dexaméthasone ; PDT : Photothérapie dynamique avec vertéporfine ; PDT^{1 ou 2} : 2 doses de vertéporfine et intensités lumineuses testées (15 J/cm², 180 mW/cm² ou 25 J/cm², 300 mW/cm²) ; PDT^{3 ou 4} : 50 J/cm², 600 mW/cm² ou 25 J/cm², 300 mW/cm² ; RNB= Ranibizumab.

Les résultats de ces études sont encourageants concernant l'utilisation combinée des thérapies déjà présentes sur le marché. Néanmoins, il est encore trop tôt pour tirer des conclusions étant donné les faibles effectifs étudiés, la courte durée de suivi et l'absence d'un groupe témoin (*Fajnkuchen F et Cohen SY, 2008*).

Pour l'instant, l'arsenal thérapeutique permet aux ophtalmologistes de changer de molécules après une première période de traitement (en général 6 mois) afin d'optimiser l'efficacité de la prise en charge. Ainsi, en plus de la recherche d'associations thérapeutiques de nouveaux traitements sont en cours de développement. Ils seront présentés dans le paragraphe suivant.

2- Perspectives thérapeutiques

En septembre 2012, plus de 80 essais cliniques de phases I et II concernant de nouveaux traitements contre la DMLA sont recensés (*clinicaltrials.gov*², 2011). Cela souligne l'intérêt des chercheurs, industriels et professionnels de santé d'élargir l'offre thérapeutique pour assurer une prise en charge optimale des patients. Nous détaillerons ici le principe des siRNA et des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase qui ont montré des essais prometteurs lors de premiers essais expérimentaux.

- ***siARN : interférence par l'ARN***

Les cellules de notre organisme ont la capacité de contrôler la production de protéines en libérant des facteurs qui neutralisent les gènes codants pour ces protéines. Ce mécanisme passe par l'intermédiaire d'un ARN double brin. Les siARN (small interference ARN) pénètrent dans le cytoplasme cellulaire, sont clivés en ARN simple brin et sont agencés pour former un complexe RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Ce complexe se lie spécifiquement à l'ARNm codant une protéine, le clive et empêche ainsi la synthèse de la protéine (*Fattal E et Bochot A, 2006*). Dans le cas de la DMLA, le siARN dénommé bevasiranib est dirigé contre la synthèse du VEGF A. Son efficacité a initialement été démontrée sur des modèles murins de néovascularisation rétinienne puis dans l'étude CARE de phase II où il a été injecté dans la cavité vitréenne, il a été démontré sa capacité à stabiliser la vision de patients atteints de DMLA exsudative. De plus, une bonne tolérance locale et systémique a été observée (*Reich SJ et al., 2003*). Un autre siARN, le SIRNA-027 a démontré un bon profil de tolérance dans une étude de phase I (*Kaiser PK, 2006*). Mais une autre étude évaluant sa sécurité et son efficacité a été arrêté précocement suite au manque de sécurité observé (*Clinical trials.gov*², 2011).

- ***Inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase***

L'inhibition du VEGF peut également être obtenue indirectement à l'aide d'un anticorps dirigé contre une des protéines kinases d'activation de la voie de signalisation au niveau du récepteur au VEGF. Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase inhibent toutes les formes du VEGF-A en ciblant l'activation de tous ses récepteurs (VEGFR-1 à 3). Ainsi, différents

laboratoires se sont intéressés à ces protéines et réalisent des essais sur des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase. C'est le cas de Novartis avec le Vatalanib-PTK787 (voie orale), de Pfizer avec AG-013958 (voie sous-ténonienne oculaire) et d'Alcon avec AL-39324 (*Berdugo Polak M et Behar-Cohen F, 2008*).

- **Anti-PDGF-B**

L'aptamère E10030 est dirigé contre le *PDGF-B* (*Platelet Derivated Growth Factor*). Le *PDGF* est une protéine qui augmente la prolifération cellulaire et a un effet angiogénique via les péricytes des cellules qui protègent les vaisseaux sanguins. L'E10030 sous le nom de Fovista™ a été étudié en association avec la spécialité Lucentis®. En effet, en ciblant le *PDGF*, Fovista™ empêche ce dernier de se fixer à ses récepteurs naturels sur les péricytes. Sans protection les péricytes disparaissent et les cellules endothéliales sont alors facilement atteignables par les molécules anti-VEGF tel que le Lucentis®. On a alors une action synergique des deux traitements. Ainsi, les premiers résultats d'une étude de phase 2 ont permis de montrer un gain d'acuité visuelle de 10,6L pour la combinaison des deux molécules et de 6,5L pour la monothérapie par Lucentis®, soit 62% de bénéfice après 24 semaines de suivi. Des essais cliniques complémentaires de phase 3 sont en cours de recrutement afin d'évaluer la sécurité et l'efficacité des l'association de Fovista™ avec le Lucentis® mais aussi avec l'Avastin® et Eylea® (*ophthotech.com, 2013*).

Nous avons vu dans cette deuxième partie qu'au cours de ces dernières décennies, la stratégie thérapeutique visant à lutter contre la DMLA s'est considérablement développée. Ainsi, après l'introduction de la photocoagulation au laser dans les années 80 est apparue la photothérapie dynamique à la vertéprofine (Visudyne®) puis l'ère révolutionnaire des anti-VEGF avec tout d'abord le pegaptanib de sodium (Macugen®, 2006) puis le ranibizumab (Lucentis®, 2007) et enfin l'aflibercept (Eylea®, 2012). Ces deux derniers traitements permettent non seulement de limiter la perte d'acuité visuelle mais aussi un gain d'acuité visuelle. Le Bevacizumab fréquemment utilisé hors AMM car efficace pour limiter la néovascularisation est à ce jour encore interdit d'utilisation dans le traitement de la DMLA faute de présentation adaptée à la voie ophtalmique en France.

L'effort accru dans la recherche et le développement de nouvelles thérapies pour le traitement de la DMLA exsudative illustre l'importance de fournir aux patients une prise en charge toujours plus efficace. Mais comme tous les traitements, ceux traitant la DMLA ne sont pas dénués d'effets indésirables. La particularité notée ici est que, le plus souvent ce n'est pas la substance active elle-même qui est mise en cause mais le mode d'administration par injection intravitréenne. Les premiers traitements étaient généralement injectés mensuellement.

Le développement de nouvelles molécules vise actuellement une efficacité comparable tout en essayant de diminuer la fréquence d'injection. Cette problématique peut également être résolue via le développement de formes pharmaceutiques innovantes permettant après administration une libération prolongée de la substance active sur plusieurs mois voire années. Cette solution sera présentée dans la troisième partie de cette thèse.

Partie III

L'innovation galénique dans le traitement de la DMLA exsudative

Comme nous l'avons vu dans la partie II, la recherche de nouvelles thérapies pour lutter contre la DMLA est en perpétuelle évolution. Ainsi, de nouvelles molécules voient le jour. Molécules qu'il faut mettre en forme afin d'obtenir une spécialité pharmaceutique adaptée pour une administration, une activité et une stabilité optimales. C'est le rôle de la formulation galénique. Dans cette troisième partie, après la présentation de la voie intravitréenne et des formes galéniques innovantes développées pour l'injection intravitréenne (IVT), nous nous intéresserons au cas particulier des émulsions eau-dans-huile étudiées lors de mon stage de fin d'études pharmaceutiques.

I- La voie intravitréenne

1- Pharmacocinétique oculaire

Les tissus de l'œil peuvent être atteints par voies systémique ou locales mais certaines barrières limitent l'accès des substances actives à leur cible. Dans le paragraphe suivant seront présentées les principales barrières à la distribution du médicament au niveau de l'œil ainsi que les voies d'élimination de ces derniers.

Les deux principales barrières biologiques qui limitent le transport des molécules actives de l'humeur vitrée à la rétine sont la membrane limitante interne (MLI) et la barrière hémato-rétinienne (BHR). La MLI composée de protéines forme une membrane qui sépare le vitré de la rétine et est la première barrière à la diffusion vers la rétine. La BHR composée de cellules endothéliales forme la deuxième barrière au transport des molécules actives vers l'intérieur des cellules rétinienne (*Dalkara D et al., 2009*).

Les cinétiques de diffusion et d'élimination sont influencées par le taux de diffusion des molécules au sein de l'humeur vitrée et du volume du globe oculaire. Ainsi, les grosses molécules ont tendance à être retenue dans le vitré pour de longues périodes (de l'ordre de quelques semaines) alors que les molécules < 500 Da et sous forme par exemple de simple solution ont une durée de rétention d'environ trois jours (*Laude A et al., 2010*). Il existe deux principales voies d'élimination des médicaments à partir de l'humeur vitrée : via la chambre antérieure de l'œil et à travers la rétine. L'élimination via la voie antérieure ce fait par

renouvellement l'humeur aqueuse alors que l'élimination postérieure se fait via la BHR vers la circulation systémique pour les molécules suffisamment lipophiles (*Dalkara D et al., 2009*).

La taille et la nature des molécules mais aussi leur mise en forme influencent leur durée d'action au niveau de l'œil. Dans le cas de la DMLA, afin d'obtenir une action ciblée au niveau de la macula et cela de façon prolongée, l'injection intravitréenne d'une forme galénique à libération contrôlée sont deux approches que nous allons développer dans les paragraphes suivants.

2- Intérêt de l'injection intravitréenne

La majorité des spécialités pharmaceutiques à visée ophtalmique sont sous forme topique de type collyre à instiller en gouttes dans le cul-de-sac conjonctival ou pommades à appliquer sur la paupière, ce qui implique une faible biodisponibilité des substances actives (moins de 5%) dans le segment antérieur de l'œil (*Urtti A, 2006*). Le segment postérieur où se trouve la macula lésée lors d'une DMLA ne peut recevoir que très peu de substances actives en provenance de l'humeur aqueuse. Ainsi, les pathologies dont les organes-cibles se trouvent dans la partie postérieure comme la macula dans le cas de la DMLA doivent faire appel à un mode d'administration direct dans la chambre postérieure. Dans ce cas, il existe trois voies : systémique, sous-conjonctivale et intravitréenne. L'administration systémique ne permet pas d'atteindre une concentration intra-oculaire optimale en raison de la barrière hémato-oculaire et peut entraîner des effets indésirables systémiques. La voie sous-conjonctivale est principalement utilisée pour l'administration de corticostéroïdes lors d'inflammation intra-oculaire. Enfin, la voie intravitréenne permet, entre autres, une injection des traitements anti-angiogéniques recommandés en première ligne pour le traitement de la DMLA et présentés dans la deuxième partie de cette thèse. C'est donc à cette voie que nous allons nous intéresser. L'injection intravitréenne d'une spécialité pharmaceutique permet d'obtenir rapidement une concentration efficace au niveau des tissus cibles du segment postérieur de l'œil tout en minimisant les effets indésirables systémiques.

Dans ce paragraphe seront présentées la technique d'administration intravitréenne ainsi que ses limites qui, nous le verrons, poussent les chercheurs et les industriels à innover dans le domaine de la formulation galénique afin de réduire la fréquence des injections.

3- Technique d'injection et recommandations

L'accentuation ces dernières années de la prise en charge des pathologies rétinienne par injections intravitréennes a amené les autorités de santé à émettre des recommandations de bonnes pratiques de réalisation qui seront présentées ci-dessous (*Afssaps, 2011*).

Avant toute injection intravitréenne (IVT), le praticien doit informer le patient des bénéfices et des risques potentiels liés à la procédure d'injection. Une fiche explicative et de consentement doit être signée par le patient. Une infection oculaire qui contre-indiquerait l'IVT ou une éventuelle allergie au produit utilisé doivent être recherchées. Une antibioprophylaxie générale pré-IVT n'est pas nécessaire. Enfin, il est recommandé d'éviter d'injecter simultanément les deux yeux le même jour sauf cas exceptionnel.

Lors de la réalisation de l'IVT, un anesthésique topique sous forme de collyre unidose de type oxybuprocaine® ou tétracaïne® doit préalablement être instillé dans l'œil du patient. La table opératoire doit être préparée de façon aseptique ainsi qu'un champ stérile. Les paupières et les cils doivent être badigeonnés par de la povidone iodée en solution ophtalmique à 5% et une instillation doit être réalisée sur la conjonctive. Le tout doit être rincé avec du sérum physiologique stérile après 2 minutes de contact. La préparation de la seringue d'injection doit être réalisée de façon stérile. La mise en place d'un champ stérile isolant l'œil puis d'un blépharostat (instrument qui maintient les deux paupières écartées) afin de limiter les risques de contact entre l'aiguille et le bord libre des paupières doit être effectuée. Comme illustré sur la Figure 14, le point d'injection se situe à 3,5-4mm du limbe (bord de la cornée où elle se confond avec la sclérotique).

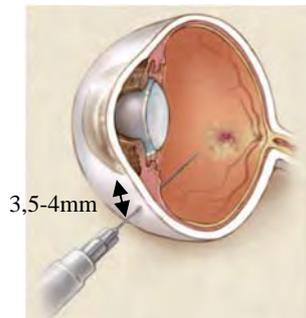


Figure 14 : Schéma de la réalisation d'une injection intravitréenne
(Steinbrook R, 2006)

L'injection du produit et le retrait de l'aiguille de 30 gauges x 0,5 doivent être lents. L'application d'un coton-tige permettra d'éviter le reflux et l'utilisation d'un antibiotique topique en post-injection est recommandée.

Après l'injection le praticien doit s'assurer que le patient perçoit la lumière au niveau de l'œil injecté. Une surveillance clinique doit être réalisée étant donné l'apparition de rares cas d'anaphylaxie dans les minutes suivant l'injection. Enfin une antibioprophylaxie post-IVT est recommandée.

L'injection intravitréenne doit être réalisée dans des conditions aseptiques par un praticien spécialiste et expérimenté. Malgré toutes les mesures mises en œuvre des effets indésirables peuvent apparaître suite à l'injection. Ils seront détaillés dans le paragraphe suivant.

4- Effets indésirables liés à l'injection intravitréenne

La majorité des effets indésirables qui apparaissent après l'injection d'une spécialité en intravitréen sont liés à l'injection elle-même et non pas à la substance active. Les plus fréquemment recensés au niveau oculaire suite à des injections répétées sont : une hémorragie vitréenne (8.0%), une endophtalmie (2.1%) et un déchirement rétinien (1.9%) (*Schmucker C et al., 2011*).

L'apparition des effets indésirables associés à l'injection est donc directement corrélée à la fréquence des injections. Ainsi, dans l'exemple de la spécialité Lucentis®, l'injection doit être réalisée une fois par mois pendant trois mois consécutifs puis tous les deux mois. Ces injections fréquentes nuisent à la qualité de vie des patients et donc *a fortiori* diminuent leur observance vis-à-vis du traitement. Ces actes sont également contraignants pour le corps de santé : spécialisation nécessaire pour ce type d'injection, coût du personnel et des locaux... Nous allons voir dans les paragraphes suivants que la formulation galénique peut apporter une réponse à cette problématique de réinjections fréquentes.

II- Formes galéniques innovantes pour injection intravitréenne

La forme galénique est la forme finale d'un médicament qui contient la substance active et les excipients neutres. La formulation galénique consiste à choisir les excipients appropriés afin d'assurer l'activité de la substance active au niveau de sa cible. Il existe trois catégories principales de formes pharmaceutiques : solide, semi-solide et liquide. Seules les deux dernières catégories peuvent être utilisées au niveau de l'œil. Pour le traitement du segment antérieur, les collyres sous forme de gouttes sont les plus répandus. Afin d'atteindre le segment postérieur, des formulations innovantes ont fait l'objet de recherches et certaines sont présentes sur le marché. Leurs avantages et limites seront présentés dans les paragraphes suivants.

1- Présentation des formes galéniques innovantes

Afin de permettre une libération prolongée dans le temps des substances actives, plusieurs formes galéniques innovantes ont été mises sur le marché ou sont en cours d'essais cliniques. Dans la majorité des cas, l'objectif est de traiter des maladies chroniques du segment postérieur de l'œil comme c'est le cas de la DMLA (*Hsu J, 2007*). Le challenge est de formuler un système qui assure à la fois une bonne biodisponibilité de la substance active et une durée

d'action prolongée de quelques semaines à plusieurs années tout en minimisant les risques de complications. Une forme à libération prolongée permet de retenir la substance active dans un système en contrôlant sa vitesse de libération. La rétention de la substance active peut se faire grâce à l'utilisation d'excipients insolubles dans les fluides de l'organisme ce qui forme une matrice de protection à partir de laquelle la substance active sera lentement libérée. Les réinjections étant moins fréquentes ces formes innovantes permettent d'améliorer la prise en charge des patients ainsi que leur qualité de vie. La Figure 15 permet de comparer la cinétique de libération de la substance active à partir d'une forme galénique classique (en bleu) de type solution à usage oculaire et d'une forme à libération prolongée (en rose).

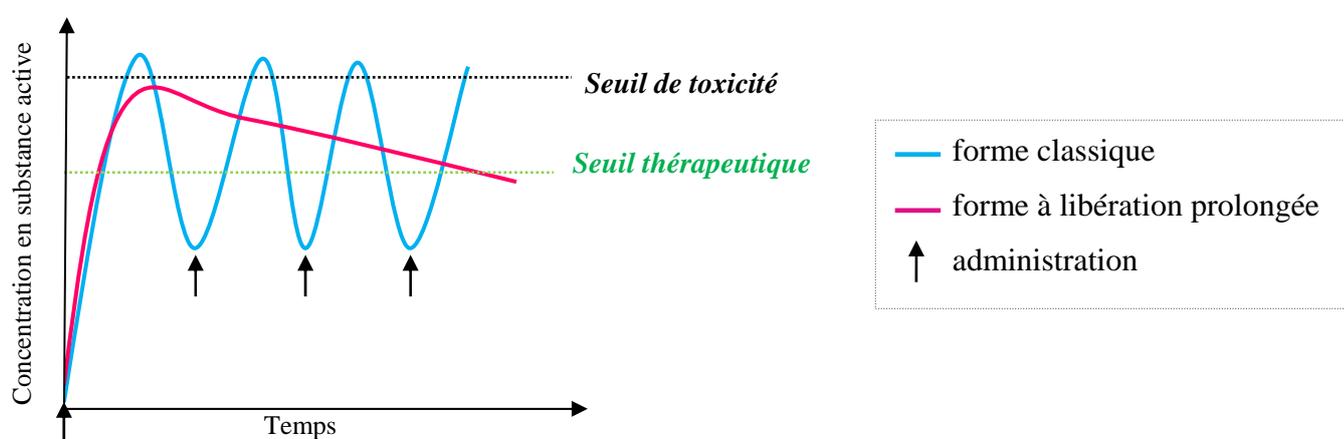
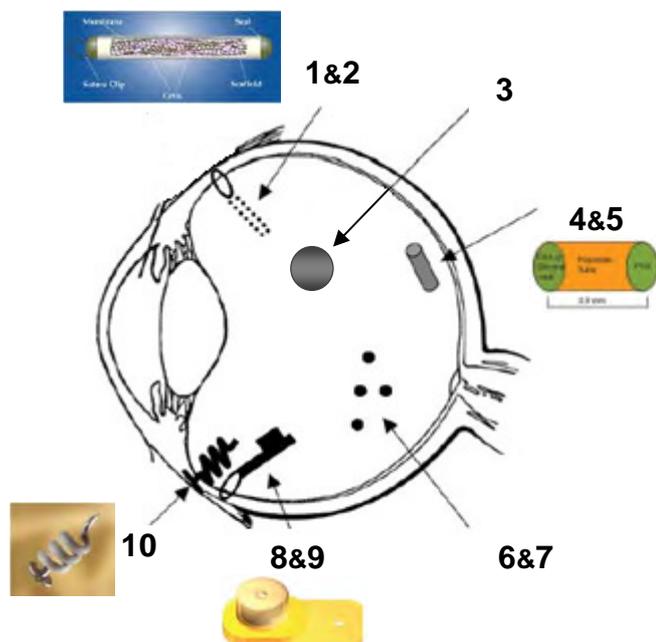


Figure 15 : Schéma comparatif des cinétiques de libération forme classique/forme à libération prolongée

La forme à libération prolongée permet d'atteindre un seuil thérapeutique (concentration minimale en dessous de laquelle il n'y a pas d'activité thérapeutique) sans dépasser le seuil de toxicité (concentration maximale en dessous de laquelle il y a l'apparition d'effets indésirables). De plus elle permet des administrations beaucoup moins fréquentes.

Sur la Figure 16, sont répertoriées les formes galéniques innovantes pour injection intravitréenne mises sur le marché (en bleu) et en cours d'essais cliniques (phase I ou II, en orange).



1&2 : NT-501, PDS (Port delivery system)

3 : NOVA63035

4&5 : Iluvien[®], Ozurdex[®],

6&7 : IBI-20089 (Verisome[™]), RETAAC

8&9 : Retisert[®], Vitrasert[®]

10 : I-vation[™] TA

Figure 16 : Représentation de formes galéniques innovantes pour injection intravitréenne
(d'après Kuno N et al., 2011)

Les formes sont variées et sont soit injectées directement dans la cavité vitréenne, soit fixées au niveau la par plana (zone très peu vascularisée en avant de la rétine). Le Tableau 5 reprend ces différentes formes galéniques en détaillant l'indication thérapeutique, les excipients qui permettent une libération contrôlée et la durée d'action escomptée.

Tableau 5 : Récapitulatif des formes galéniques innovantes pour injection intravitréenne

	Substance active	Nom	Indication	Forme	Excipient pour libération contrôlée	Durée d'action
1	CNTF (NT-501)	-	RP, DMLA sèche	implant	membrane semi-perméable	18 mois
2	Ranibizumab	PDS	DMLA humide	implant	implant rechargeable	essai sur 12 mois
3	Pro-drogue corticostéroïde	Cortiject [®]	OMD	émulsion H/E pour injection	huile	6-9 mois
4	Fluocinolone acetonide	Iluvien [®]	OMD, DMLA humide	implant	polymères	3 ans
5	Dexaméthasone	Ozurdex [®]	CRVO, BRVO, uvéite postérieure			4-6 semaines
6	Triamcinolone acetonide	IBI-20089 (Verisome [™])	CRVO, BRVO	injection	Huile se gélifiant	1 an
7		RETAAC	OMD	injection	microsphères de PLGA	1 an
8	Fluocinolone acetonide	Retisert [®]	uvéite postérieure	implant	silicone/PVA	2,5 ans
9	Ganciclovir	Vitrasert [®]	rétinite à CMV	implant	diffusion passive à travers les couches EVA/PVA	8 mois
10	Triamcinolone acetonide	I-vation [™]	OMD	implant	PMMA/EVA non-biodégradables	2 ans

BRVO : Branch Retinal Vein Occlusion : occlusion d'une branche veineuse rétinienne, CMV : Cytomégalo virus, CNTF : Ciliary Neurotrophic Factor : Facteur Neurotrophique Ciliaire, CRVO : Central retinal Vein occlusion : occlusion de la veine centrale de la rétine, EVA : Ethylène-acétate de vinyle, OMD : Œdème Maculaire Diabétique, PLGA : acide poly(lactique-co-glycolique), PMMA : poly(méthylméthacrylate), PVA : Alcool polyvinylique, RP : Rétinite pigmentaire. (D'après Kuno N et al., 2011).

On notera que parmi ses dispositifs innovants pour la voie intravitréenne seuls Iluvien® contenant de l'acétonide de fluocinolone (corticostéroïde anti-inflammatoire) et le *Ranibizumab Port Delivery System*, tout deux en cours d'essai clinique, pourraient être utilisés dans le traitement de la DMLA exsudative. L'implant PDS nous intéresse tout particulièrement car il peut contenir du ranibizumab, la molécule de référence dans le traitement de la DMLA exsudative. Les premiers résultats concernant l'étude de tolérance et d'efficacité du Ranibizumab PDS réalisée par une équipe lettone ont été présentés dernièrement. L'implant a été généralement bien toléré avec 1 cas d'endophtalmie et 2 cas d'hémorragie rétinienne dû à la procédure d'implantation contre 96 remplissages sans complication. Concernant l'efficacité de l'implant rechargeable à libération prolongée, elle est comparable à celle lors d'injections mensuelle de ranibizumab avec une amélioration de l'acuité visuelle (*Laganovska G et al., 2011*).

En outre, d'autres formes galéniques innovantes visant une action au niveau du segment postérieur de l'œil font l'objet de recherche sans toutefois avoir abouti à des essais cliniques chez l'Homme (à l'exception du Retaac). C'est le cas des systèmes colloïdaux définis comme des particules biodégradables, de petite taille dont les avantages majeurs sont leur facilité d'injection à l'aide de fines aiguilles et un ciblage des tissus avec une bonne disponibilité et une faible toxicité systémique. Les systèmes colloïdaux regroupent les microparticules (1-1000 µm), les nanoparticules (10-1000 nm) et les liposomes (100-400 nm). Les microparticules sont composées de polymères biodégradables (PLGA, PLA). Injectées dans le vitré, elles restent en suspension et libèrent la substance active avec une cinétique contrôlée. Concernant les nanoparticules, leur intérêt théorique est leur capacité d'internalisation intracellulaire. Ce sont des vecteurs potentiels de fragments nucléiques et de peptides qu'ils protègent de la dégradation enzymatique. Enfin, les liposomes sont formés d'une bicouche de phospholipides (naturellement présents dans notre organisme) ce qui les rend biocompatibles et peu toxiques. Après leur injection, ils s'étalent sur la surface rétinienne et la substance active peut alors diffuser dans les tissus oculaires (*Behar- Cohen F, 2004 ; Wang J et al., 2013*).

2- Avantages et limites

L'avantage majeur des formes galéniques innovantes présentées précédemment est qu'elles permettent une libération de la substance active sur plusieurs mois voire plusieurs années. Néanmoins, plusieurs inconvénients répertoriés dans le Tableau 6 sont liés à l'utilisation de ces formes.

Tableau 6 : Récapitulatif des avantages et inconvénients des formes galéniques innovantes

Formes	Excipients	Avantages	Inconvénients	Exemples
Implant non-biodégradable	silicone PVA EVA	- pas de produits de dégradation - pas de modification de la clarté du vitré - libération contrôlée durant une longue période	- implantation et retrait chirurgical - risque d'encapsulation	Ozurdex® Vitrasert® Retisert® Iluvien® I-vation™ NT-501
Dispositif semi-solide biodégradable	huile PLGA	- Injectable, pas de retrait	- possibilité de gêne visuelle	IBI-20089 Cortiject®
Implant solide biodégradable	PLGA PCL POE	- Pas de retrait - pas de modification de la clarté du vitré	- invasif pour mise en place - peut se retrouver dans le champ visuel - libération peut être irrégulière	Recherche
Microparticules	PLGA PLA	- bonne stabilité - modification surface polymère pour optimiser le ciblage et diminuer la phagocytose	- composants non naturels - interactions avec cellules/tissus non connues	Retaac + Recherche
Nanoparticules	PLGA PLA PCL chitosan alginate	- facilement injectable - bon contrôle libération - possibilité de ciblage	- effet burst (pic de libération SA) initial et final - opacification du vitré	Recherche <i>in vitro</i> + animaux
Liposomes		- facilement injectable - phospholipides naturels	- trouble vitréen - demi-vie courte - contrôle libération difficile	Recherche <i>in vitro</i> + animaux

PCL : polycaprolactone, POE : polyanhydride et poly(orthoester), SA : Substance Active.
(Behar-Cohen F, 2004 ; Bourges JL et al., 2006 ; Maclès A et al., 2013).

De nombreuses formes galéniques innovantes ont été développées ces dernières années pour l'injection intravitréenne. Mais le risque de survenue des effets indésirables directement liés à l'injection et les inconvénients des formes galéniques innovantes présentées ci-dessus restent des problématiques de recherche. C'est dans ce contexte que le développement d'une spécialité sous forme d'émulsion eau-dans-huile permettant une libération prolongée du principe actif pourrait être une solution. La présentation des travaux de recherche sur ce sujet effectués lors de mon stage de fin d'études seront présentés dans la partie suivante.

III- Travail personnel : Conception d'émulsions eau-dans-huile à libération prolongée pour une injection intravitréenne

Dans le but d'augmenter le confort du patient, l'innovation galénique dans le domaine de l'ophtalmologie est primordiale. En effet, le développement d'une forme pharmaceutique permettant de diminuer la fréquence des injections et les effets indésirables associés est devenu un challenge. Ainsi, la formulation d'une émulsion inverse eau-dans-huile pourrait répondre à ces problématiques. Cette forme galénique permettrait de protéger un principe actif hydrophile tel qu'une molécule anti-VEGF qui serait libérée de façon prolongée au niveau du segment postérieur de l'œil.

Les travaux effectués au cours de mon stage de fin d'études réalisé au sein de la société Emulsar concernant le développement d'une telle forme pharmaceutique seront présentés dans les paragraphes suivants.

1- Contexte et objectifs

Dans le cadre d'un projet labellisé par le pôle de compétitivité mondial MEDICEN et en collaboration avec le laboratoire Santen et l'Institut de la Vision, Emulsar a été chargé d'effectuer des recherches préliminaires sur la conception d'un injectable oculaire à libération prolongée sous forme d'une émulsion eau-dans-huile.

Le but de la recherche est de formuler une émulsion à la fois suffisamment stable pour pouvoir être stockée, tout en permettant une libération prolongée du principe actif dans le temps. En effet, une fois l'injection intravitréenne réalisée, le principe actif doit être libéré sur une période allant de 3 à 6 mois afin de présenter un avantage par rapport à la spécialité de référence, le Lucentis® déjà présente sur le marché mais qui doit être injectée tous les mois. Le principal critère retenu est donc la stabilité de l'émulsion. Le deuxième critère à remplir est lié à la voie ophtalmique ; la formulation doit être composée de substances de grade pharmaceutique et doit être stérile.

Au cours du stage d'une durée de 6 mois, un premier screening parmi des tensioactifs a été réalisé afin d'identifier ceux permettant la formulation d'émulsions suffisamment stables. A partir de ces tensioactifs sélectionnés, des études de formulation faisant varier la nature des phases, leurs proportions et les conditions d'émulsification ont été réalisées. Afin de comparer les différentes formulations, une méthode de suivi de la cinétique de libération de la phase interne aqueuse a été mise en place. Enfin, les émulsions réalisées devant être injectables, un dispositif de seringabilité a été réalisé et sera présenté dans un dernier paragraphe.

2- Emulsions : notions générales

Une émulsion est définie comme la dispersion d'un liquide immiscible dans un autre liquide sous forme de gouttes. Ce système présente alors une stabilité relative qui doit être accentuée par la présence d'un composé stabilisant. C'est en général un agent de surface également appelé surfactant ou tensioactif (*Becher P, 1977*).

Il existe deux types d'émulsions simples selon la nature de la phase dispersée interne et de la phase continue externe. Les émulsions dites directes huile-dans-eau (H/E) présentent une phase dispersée huileuse et une phase continue de nature aqueuse. Au contraire, les émulsions inverses eau-dans-huile (E/H) sont composées de gouttes de phase aqueuse dispersées dans une phase huileuse. C'est à cette deuxième catégorie que nous nous intéresserons dans nos travaux. De plus, des émulsions dites multiples peuvent également être fabriquées en deux étapes : formation d'une émulsion simple qui est ensuite ajoutée dans un troisième milieu formant la phase externe. Les différentes catégories d'émulsions sont présentées dans la Figure 17.

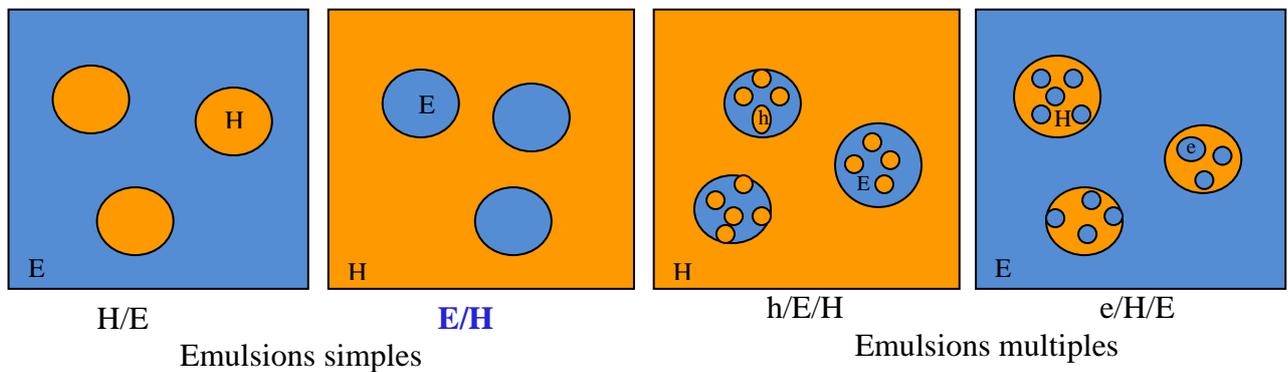


Figure 17 : Représentation schématique des différents types d'émulsions

Une classification selon la taille des gouttes a également été définie. Dans un ordre de taille de gouttes croissant on trouve, les microémulsions thermodynamiquement stables constituées de microdomaines de 10 à 50 nm, les nanoémulsions où le diamètre des particules est compris entre 10 et 100 nm et enfin les macroémulsions (*Salager JL et al, 2001*). Ce sont ces dernières qui vont nous intéresser dans cette étude. Elles présentent des tailles de gouttes de diamètre supérieur au micromètre et demandent une certaine énergie mécanique afin que la phase interne se disperse dans la phase continue. De plus, les macroémulsions présentent une stabilité thermodynamique minime et tendent vers une séparation des phases aqueuse et huileuse. Afin de ralentir ce phénomène la présence d'un tensioactif est indispensable (*Becher P, 1977*).

Un tensioactif est une molécule amphiphile qui possède une partie hydrophile (tête) et une partie hydrophobe (queue) comme représenté sur la Figure 18.

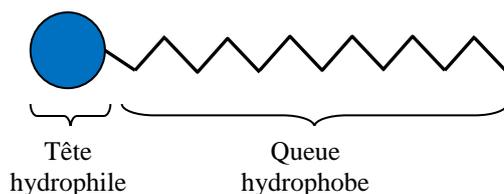


Figure 18 : Représentation schématique d'une molécule de tensioactif

Il existe quatre catégories de tensioactifs selon la nature de la partie hydrophile : les tensioactifs anioniques (charge négative), cationiques (charge positive), amphotères (charges positive et négative avec une charge globale neutre) et enfin les tensioactifs non-ioniques (aucune charge). C'est cette dernière catégorie de tensioactifs qui a été utilisée dans nos recherches car ils présentent en général une faible toxicité, sont neutres et stables vis-à-vis des électrolytes pouvant être contenus dans la formulation finale (*Harry RG and Wilkinson JB, 1973*).

Les molécules de tensioactif se positionnent à l'interface eau-huile comme représenté sur la Figure 19. Ainsi, elles permettent de diminuer la tension interfaciale et de rigidifier le film interfacial ce qui améliore la stabilité des émulsions à long terme.

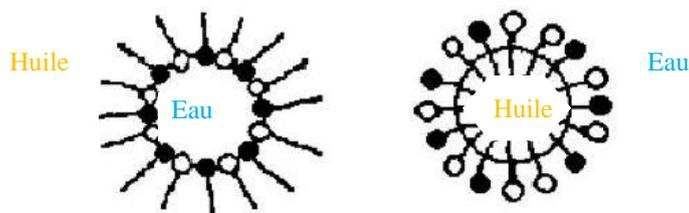


Figure 19 : Représentation schématique de molécules de tensioactif formant une micelle inverse (gauche) et directe (droite)
(d'après Fendler J.H., 1987)

A chaque tensioactif peut être attribuée une valeur de HLB (*Hydrophile Lipophile Balance*) selon la règle proposée par *Griffin en 1949*. Cette méthode permet de quantifier l'affinité des tensioactifs pour la phase aqueuse ou huileuse. Des valeurs de HLB=1 et HLB=20 ont été respectivement attribuées à l'acide oléique et à l'oléate de potassium de façon arbitraire. Ainsi, chaque tensioactif se voit attribuer une valeur de HLB suivant cette échelle. Les tensioactifs présentant un HLB entre 4 et 8 ont plus d'affinité pour la phase huileuse et seront utilisés pour stabiliser les émulsions E/H, tandis que ceux avec un HLB plus élevé (12-16) auront plus d'affinité pour la phase aqueuse et formeront des émulsions H/E. Selon *Bancroft WD, 1913*, la phase continue est celle dans laquelle le tensioactif est le plus soluble. Dans le cas des émulsions

eau-dans-huile où l'huile est la phase continue, les tensioactifs utilisés seront donc lipophiles, de faible HLB et solubilisés dans l'huile avant émulsification. La notion de HLB requis vient compléter cette première règle en introduisant l'influence de la nature de la phase interne utilisée dans le cas des émulsions huile-dans-eau. Ainsi, une base de données de valeurs de HLB requis d'un certain nombre d'huiles est disponible permettant de choisir un tensioactif avec un HLB compatible avec la phase interne huileuse utilisée. Malheureusement, cette base de données concerne essentiellement les émulsions huile-dans-eau. Soulignons que très peu de données sont disponibles concernant les émulsions inverses qui nous intéressent car elles sont en général difficiles à formuler de par leur importante instabilité (Barel AO et al., 2001).

3- Stabilité des émulsions

On peut observer différents mécanismes de déstabilisation des émulsions : la sédimentation ou crémage, le murissement d'Ostwald, la floculation et la coalescence représentés sur la Figure 20.

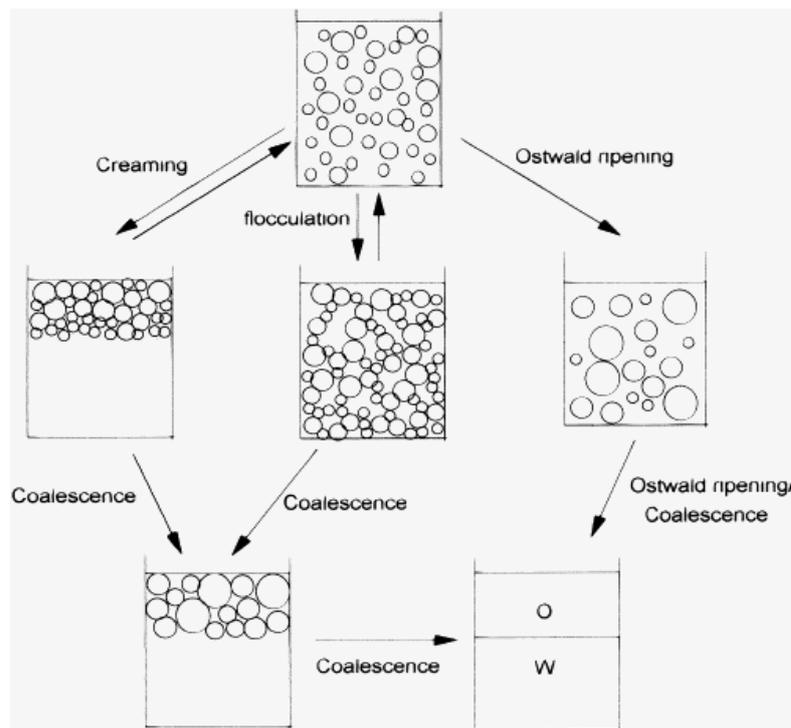


Figure 20 : Représentation des différents phénomènes d'instabilité des émulsions
(Taylor P., 1998)

La *sédimentation* et le *crémage* sont des processus régis par le champ de pesanteur et résultent de la séparation des phases selon leur différence de densité. Dans le cas de la sédimentation, la densité des gouttes est plus importante que celle de la phase dispersante. C'est l'inverse pour le phénomène de crémage (Schick MJ, 1987). En dessous d'une certaine taille particulière, le mouvement brownien d'agitation thermique s'oppose à la sédimentation et au crémage. Ces processus n'interviennent donc qu'à partir d'une certaine taille de goutte

d'environ 1µm. La vitesse de sédimentation (ou de crémage) noté V (cm.s^{-1}) peut être estimée à partir de l'équation de Stokes :

$$V = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)g}{9\eta} \quad \text{Équation 1}$$

où r en cm est le rayon d'une goutte, ρ en g.cm^3 à 20°C la densité de la goutte, ρ_0 et η en Pa.s la densité et la viscosité de la phase continue et g l'accélération due à la gravité égale à 981cm.s^{-2} . La différence $(\rho - \rho_0)$ est positive dans le cas de la sédimentation. Cela montre que le processus de sédimentation peut être inhibé par un faible rayon des gouttes, une importante viscosité de la phase continue ainsi que par une faible différence de densité entre les phases huileuse et aqueuse.

Il existe deux phénomènes de grossissement qui induisent ou accélèrent la sédimentation et le crémage. Ce sont le mûrissement d'Ostwald et la floculation. Le *mûrissement d'Ostwald* correspond à la diffusion de la phase dispersée des gouttes de petit volume vers celles de plus grand volume. Cela résulte de la différence de pressions qui est plus grande dans les petites gouttes que dans les grosses comme illustré dans l'Equation 2 dérivée de la loi de Laplace :

$$P_1 - P_2 = 2\mathcal{G}_{12} \left[\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right] \quad \text{Équation 2}$$

où P_1 , r_1 et P_2 , r_2 en Pa et en m sont respectivement les pressions et rayons d'une petite et d'une grosse goutte et \mathcal{G}_{12} en N.m^{-1} la tension interfaciale. La différence de pression entre les deux gouttes est le moteur de la diffusion de la phase interne d'une petite goutte à une plus grosse goutte et donc du mûrissement d'Ostwald.

Quant à la *floculation*, elle se définit comme le rapprochement des gouttes qui viennent en contact les unes avec les autres, sans rupture du film interfacial et qui forment des flocs ou floculats. Toutes les gouttes maintiennent leur propre intégrité et reste des entités séparées.

Enfin, la *coalescence* est liée à des forces d'interactions qui aboutissent au rapprochement de gouttes. Dans ce cas, le film interfacial se rompt et deux gouttes fusionnent en une seule goutte de volume plus important. Le terme de *stabilité* concernant les émulsions fait généralement référence à la résistance des émulsions au phénomène de coalescence des gouttes dispersées (Rosen MJ, 1989). En effet, seule la coalescence est irréversible contrairement à la sédimentation/crémage et à la floculation où les gouttes initiales conservent leur taille et leur propre intégrité.

La forme galénique sous forme d'émulsion eau-dans-huile ayant été définie, nous allons maintenant nous intéresser à son intérêt dans notre application, à savoir l'injection intravitréenne.

4- Intérêt des émulsions eau-dans-huile injectables

Comme représenté dans la Figure 21 (accompagnée des commentaires correspondants aux couleurs des encadrés), le cas de la formulation d'émulsions eau-dans-huile permet de mettre en évidence le rôle de l'innovation galénique au service du patient.



Figure 21 : Illustrations des liens entre l'innovation galénique et l'observance du patient

- ➡ Les anticorps monoclonaux étant de nature hydrophile, ils sont parfaitement adaptés à leur internalisation dans la phase interne aqueuse des émulsions eau-dans-huile où ils seront protégés du milieu extérieur (*Aucouturier J. et al., 2002*).
- ➡ De plus, le fait que les gouttes de phase aqueuse interne soient entourées d'une phase externe huileuse permet une libération prolongée dans le temps du principe actif (*Muller-Goymann C.C., 2004*).
- ➡ Cette libération prolongée permet alors de diminuer la fréquence d'administration tout en assurant la libération du principe actif sur une période donnée.
- ➡ La densité de l'émulsion étant inférieure à celle du corps vitré (environ égale à 1), cela lui permet de se positionner dans la partie supérieure de la cavité vitréenne. Ainsi, elle ne se trouve pas dans l'axe de vision et n'entraîne pas de gêne visuelle.

La formulation d'une émulsion eau-dans-huile injectable oculaire permettant la libération prolongée d'un principe actif hydrophile sera l'objectif du projet Eyeject® présenté dans ce cas pratique.

5- Matériel et Méthodes

5.1- Matériel

Les tensioactifs employés dans cette étude sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Récapitulatif des tensioactifs utilisés

Nom chimique	HLB	Nom commercial, Fournisseur
Polyglycéryl-3-polyricinoléate (PGPR)	3,4	Rdiamuls poly 2253, Oleon, Belgique
Monooléate de sorbitane	4,3	Rdiamuls sorb 2155, Oleon, Belgique Montane 80 PPI, Seppic, France
Polyoxyéthylène Monooléate de sorbitane	15	Montanox 80, Seppic, France
Monostéarate de sorbitane	4,7	Hapemuls-SMS, Oleon, Belgique
Polyoxyéthylène Monostéarate de sorbitane	14,9	Montanox 60, Seppic, France
Tristéarate de sorbitane	2,1	Rdiamuls sorb 2345, Oleon, Belgique
Monopalmitate de sorbitane	6,7	Crill 2, Croda, Royaume-Uni
Stéarate/palmitate de saccharose	1	Sisterna SP 01, Unipex, France
Polyglycéryl-3-oléate	6,2	Isolan GO33, Evonik, Allemagne
Caprylate de glycérol	5	Dub 8G, Stéarinerie Dubois, France

Les huiles utilisées sont : Triglycéride d'acide caprylique et caprique nommé dans ce rapport MCT pour *Medium Chain Triacylglycerol* (Miglyol 812, Sasol, Allemagne), Myristate d'isopropyle (Stelliesters IPM, Stéarinerie Dubois, France), Propylène glycol dicaprylate/dicaprate (Stelliesters S10 PG, Stéarinerie Dubois, France) et huile de paraffine (Prod'hyg, France). L'eau utilisée est de l'eau déminéralisée. Concernant les essais avec le PGPR la phase aqueuse est une solution de NaCl 0,9% et la phase grasse est du MCT. Pour les autres tensioactifs testés, les phases aqueuse et grasse ont fait l'objet de variation et seront précisées au cas par cas. Le colorant bleu brillant FCF hydrosoluble (E133) a été utilisé pour le suivi de relargage de la phase interne aqueuse. Des essais de seringabilité ont été réalisés à l'aide de seringues de 1mL et 10mL à l'aide d'aiguille (Braun, Allemagne) et d'un pousse-seringue (HT, Suisse).

5.2- Méthodes

5.2.1- Protocole de fabrication des émulsions

Les émulsions ont été réalisées à l'aide d'un système de rotor-stator de diamètre extérieur de 2,5cm (Ultra-turrax T25, Janke&Kunkel, IKA®- Labortechnik, Allemagne). La vitesse du système peut être fixée entre 8000 et 20500 tours par minute. La température d'émulsification est maintenue en dessous de 20°C. Dans certains essais précisés ultérieurement, la température

d'émulsification a pu faire l'objet de variations et un autre procédé d'émulsification par hélice dilacératrice a été ponctuellement utilisé. Les tensioactifs utilisés seuls pour préparer les émulsions eau-dans-huile sont hydrophobes et présentent un HLB faible. Ils sont dissous quelques minutes dans la phase huileuse grâce à une agitation magnétique juste avant émulsification. La phase aqueuse est ajoutée manuellement à l'aide d'une seringue avec un débit d'environ 15mL/min dans la phase grasse.

5.2.2- Suivi de stabilité dans le temps

Les émulsions fabriquées selon le protocole décrit précédemment ont fait l'objet d'un suivi de stabilité dans le temps. Chaque émulsion a été divisée en plusieurs échantillons stockés ensuite à différentes températures choisies afin d'observer leur différence de comportement comme décrit dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Températures de stockage pour le suivi de stabilité

Température	Explication du choix des températures de stockage
4°C	Températures de stockage pouvant être envisagées pour la spécialité pharmaceutique finale*
Ambiante 20°C	
37°C	Température de la cavité intravitréenne où sera injectée l'émulsion
50°C	Température de vieillissement accéléré

* température de conservation du Lucentis® et de Eylea® : 2-8°C.

Le suivi de stabilité dans le temps a été réalisé de la manière décrite Figure 22.

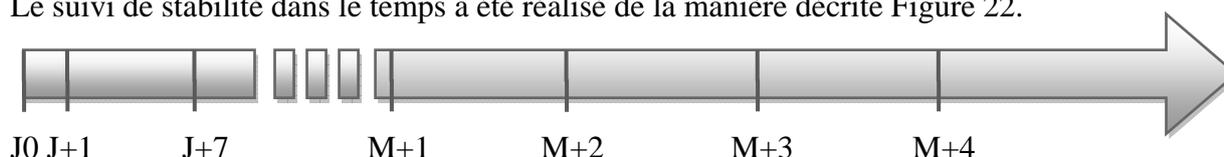


Figure 22 : Protocole de suivi de stabilité dans le temps

Ce suivi dans le temps a été réalisé à deux échelles : macroscopique et microscopique par mesures granulométriques.

Le suivi macroscopique a été fait par observation à l'œil nu à l'aide d'une lampe LED des échantillons de 5mL placés dans des tubes à essais à fond plat afin d'observer au mieux les phénomènes d'instabilité pouvant apparaître.

Le suivi par mesure granulométrique a été réalisé grâce à la technique de diffraction laser (Mastersizer, Malvern Instruments, Royaume-Uni). L'échantillon était dilué avant chaque mesure dans de l'huile de colza. Pour chaque échantillon trois mesures étaient effectuées à 3 taux d'obscurité différents : 10-15%, 15-20% et 25-30%. La taille moyenne de goutte peut

être exprimée en surface $d_{3,2}$ et en volume $d_{4,3}$ où n_i est le nombre total de goutte de diamètre d_i (Equations 3&4).

$$d(3, 2) = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2} \quad \text{Équation 3}$$

$$d(4, 3) = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3} \quad \text{Équation 4}$$

Les observations microscopiques ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique objectif 40x/0.65 (Leica DM 1000, Allemagne). Dans certains cas où les mesures de granulométrie laser ont fait l'objet de doutes, une distribution de taille des gouttes a été obtenue par comptage manuel sur des images réalisées au microscope. Les tailles des particules mesurées en pixels sur les images ont été converties en micromètre puis le $d_{3,2}$ a été calculé.

5.2.3- Tests *in vivo*

Ce projet étant en collaboration avec le laboratoire Santen et l'Institut de la Vision, des essais *in vivo* ont été réalisés par ce dernier partenaire. Les quatre premières émulsions réalisées durant mon stage et contenant différentes proportions de phases aqueuse, grasse et de tensioactif ont été testées. Un volume de 1µL de chaque émulsion a été injecté dans la cavité vitréenne de deux souris à l'aide d'un capillaire adapté. L'injection a été faite dans un seul des deux yeux afin de garder un œil témoin. Le protocole expérimental est représenté Figure 23.

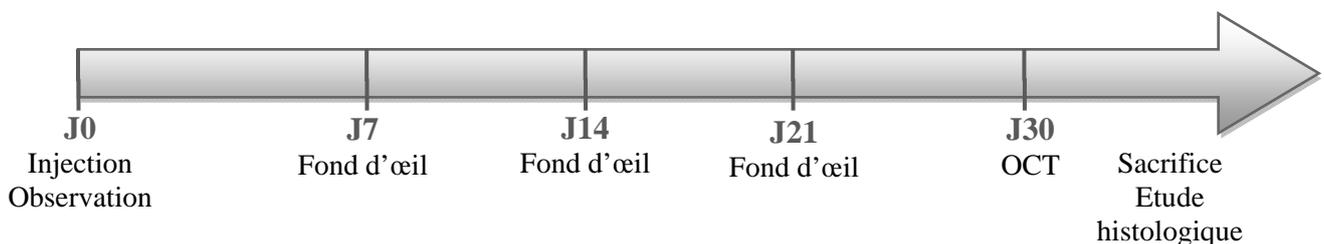


Figure 23 : Représentation du déroulement de l'étude *in vivo*

L'évaluation de l'état de la rétine 30 jours après l'injection a été effectuée grâce à la technique de Tomographie à Cohérence Optique (présentée dans la première partie de cette thèse) qui permet d'observer la néovascularisation choroïdienne. L'étude histologique a été réalisée sur les coupes des rétines des souris sacrifiées à J30 (durée de l'étude).

5.2.4- Suivi cinétique de libération

Les émulsions doivent présenter une stabilité suffisante pour pouvoir être stockées mais une fois injectée elles devront libérer le principe actif sur plusieurs mois. Afin de comparer qualitativement les émulsions formulées du point de vue de la libération du principe actif c'est-à-dire de la dispersion de la phase interne dans le milieu extérieur, une méthode a été mise au point. Elle consiste à introduire dans une seringue munie d'un cône Luer et d'un robinet d'évacuation une masse de 3,5g d'un milieu receveur identique à la phase interne de l'émulsion et 1,5g de l'émulsion testée comme illustré Figure 24. Un colorant bleu brillant FCF (E133) a

été choisi comme traceur pour mimer la substance active. Dosé à 0,06%, il a été introduit dans la phase aqueuse des émulsions afin de permettre le suivi de libération.

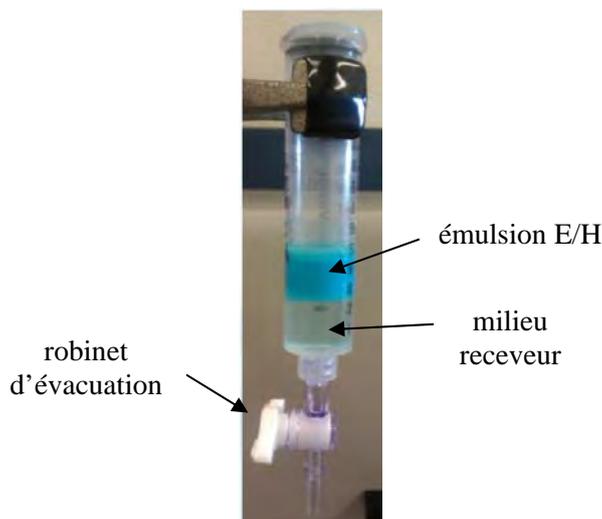


Figure 24 : Photo du dispositif d'évaluation de la cinétique de libération de la phase interne

Afin de comparer l'influence du cisaillement lié à l'injection à travers une aiguille pour injection ophtalmique, deux séries d'échantillons ont été réalisées. Dans une première série l'émulsion a été injectée à l'aide d'une seringue sans aiguille alors que dans la deuxième série, une aiguille de 27 gauges a été utilisée. Après établissement d'une gamme d'étalonnage présentée en Annexe 3 la libération de la phase interne a été mesurée sur une période de 15 jours par spectroscopie UV ($\lambda=630\text{nm}$, U-2001 Spectrophotometer, Hitachi, Japon). Ainsi, l'effet du cisaillement et de la température de stockage sur les cinétiques de libération de différentes émulsions formulées ont été établis.

5.2.5- Essais de seringabilité

Les émulsions développées doivent pouvoir être injectables par voie intravitréenne à l'aide d'une seringue et d'une aiguille très fine (27-30G). Afin de tester cette seringabilité, les émulsions présentant une bonne stabilité ont été introduites dans une seringue de 1mL puis une aiguille 27G a été placée au bout de la seringue. Un dispositif a été réalisé à l'aide d'un pousse-seringue pour estimer la seringabilité comme illustré Figure 25.

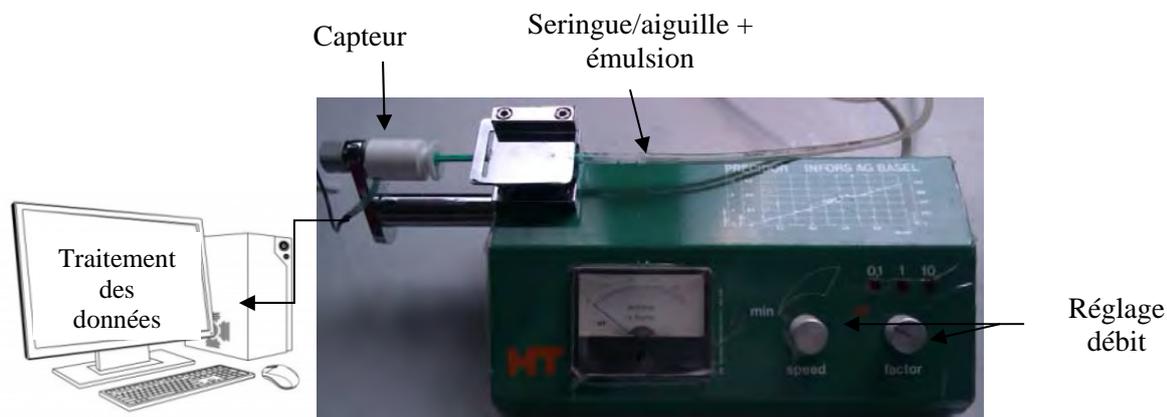


Figure 25 : Photographie du dispositif pour évaluer la seringabilité des émulsions

La seringue contenant 1mL d'émulsion et son aiguille sont placées dans le pousse-seringue. Un débit de 0,2ml/min (similaire à celui d'une injection oculaire) est appliqué par le pousse-seringue. Un capteur placé entre l'actionneur du pousse-seringue et le piston de la seringue mesure la contrainte que subit ce dernier lors de l'injection simulée et l'exprime en résistance électrique (Ohm). Ces valeurs de résistance sont converties en force à l'aide d'une gamme étalon présentée en Annexe 4.

6- Résultats et discussion

6.1- Etude exploratoire de tensioactifs

Le but de cette étude est d'identifier un ou plusieurs tensioactifs présentant un potentiel pour notre application. Le principal critère de sélection est celui de la stabilité de l'émulsion dans le temps. Les émulsions doivent être suffisamment stables afin de pouvoir être stockées après fabrication. Ensuite, afin de présenter un avantage par rapport à la spécialité Lucentis® autorisée pour le traitement de la DMLA et injectée mensuellement, la libération du principe actif doit se faire de manière prolongée sur 3 à 6 mois dans la cavité vitréenne. Pour cela, de nombreuses formulations présentées en Annexe 5 ont été testées en variant les paramètres suivants : natures du tensioactif, de la phase grasse, de la phase aqueuse, proportions phase aqueuse:phase grasse(tensioactif) noté E:H(TA) où TA est la quantité de tensioactif dans l'émulsion totale, procédé, vitesse, durée, température d'émulsification et débit d'injection de la phase aqueuse. Compte tenu du grand nombre d'émulsions testées, seule la formule présentant une meilleure stabilité ou dont la composition laissait présager une bonne stabilité pour chaque tensioactif a été détaillée dans le Tableau 9 ci-dessous. De manière générale, ces formulations présentent une concentration en tensioactif élevée (supposée au-dessus de la CMC afin d'avoir une couche protectrice) ou une faible proportion de phase dispersée (*Mobius D et al., 2001*). La

voie intravitréenne et la conception d'émulsions inverses eau-dans-huile étant encore peu développées il n'existe à ce jour pas de concentrations limites autorisées en tensioactifs ou autres excipients. Notre but étant d'en incorporer le moins possible pour des questions d'irritabilité.

Tableau 9 : Récapitulatif de la formulation la plus stable avec des tensioactifs seuls ou en associés et stabilité maximale à 4°C

Tensioactif	HLB	Proportions E:H(TA)	Stabilité/Instabilité à 4°C
Polyglycéryl-3-polyricinoléate	3,4	50:50(3) NaCl 0.9%:MCT	Toujours stable à M+4
Monooléate de sorbitane	4.3	50:50 (10) H2O:MCT	Stable à M+2 vis-à-vis de la séparation de phases mais floculation
Tristéarate de sorbitane	2,1	10:90(4,5) H2O:MCT	Stable à M+3 à 4°C mais instable à 37°C dès J+1
Monopalmitate de sorbitane	6,7	10:90(4,5) H2O:MCT	Instable à J+1
Monooléate de sorbitane (A) Polyoxyéthylène Monooléate de sorbitane (B)	4,3 (A) 15 (B) 6 (X)	20:80(10) H2O:MCT	Instable à J+1
Monostéarate de sorbitane (A) Polyoxyéthylène Monostéarate de sorbitane (B)	4,7(A) 14,9(B) 6 (X)	20:80(10) H2O:MCT	Instable à J0
Trioléate de sorbitane (A) Polyoxyéthylène Monostéarate de sorbitane (B)	2,0(A) 14,9(B) 2,02(X)	10:90(10) H2O:MCT	Instable à J+7
Caprylate de glycérol + Monooléate de sorbitane	5 4,3	10:90(10/2) H2O:MCT	Toujours stable à J+7
		Inversion H/E quand augmentation proportions eau et TA	
Polystéarate de saccharose	1	50 :50(5) H2O:MCT	Toujours stable à M+1
Polyglycéryl-3-oléate	6,2	10:90(4,5) H2O:MCT	Instable à J+1

On notera que les valeurs de HLB peuvent varier entre les publications.

Lorsqu'ils sont testés seuls, les tensioactifs choisis sont lipophiles et présentent un HLB faible pouvant stabiliser l'interface E/H. Le polyglycéryl-3-polyricinoléate a été étudié car il a déjà prouvé son efficacité dans la formulation d'émulsions eau-dans-huile (*Benichou et al., 2001*) et est couramment utilisé dans les formulations agroalimentaires chez Emulsar. Dans un deuxième temps, des tensioactifs de la famille des esters de sorbitane ont été testés. Ces derniers ont déjà été utilisés pour la formation de nano et microémulsions E/H (*Porras M et al., 2008*), d'émulsions multiples E/H/E (*Schmidts T et al., 2009*) et font partie des tensioactifs proposés dans le brevet du laboratoire Santen (*Lallemand F & Garrigue JS, 2012*). Des associations de tensioactifs ont également été testées car il a été montré que le fait d'associer des tensioactifs permet de mieux les disperser et solubiliser dans la phase continue (*Friberg*

SE, 1988). Or, il est important de pouvoir disperser la plus grande quantité de phase interne avec la plus petite quantité de tensioactifs tout en assurant une stabilité à long terme des émulsions (Peng LC et al., 2010). Selon *The HLB system, ICI America, 1976*, pour former une émulsion E/H le HLB d'un tensioactif doit être compris entre 4 et 6. Afin de calculer la proportion de chaque tensioactif dans les associations effectuées, les *Equations 5&6* ont été utilisées.

$$\%(\mathbf{A}) = \frac{(X - \text{HLB}_B) \times 100}{\text{HLB}_A - \text{HLB}_B}$$

Équation 5

$$\%(\mathbf{B}) = 100 - \%(\mathbf{A})$$

Équation 6

avec HLB_A , le HLB du surfactant lipophile (HLB faible), HLB_B , le HLB du cosurfactant (HLB élevé) et X le HLB choisi du mélange. Comme pour *Williams JM, 1991*, l'effet attendu de l'incorporation d'un cosurfactant était de former une interface plus ordonnée et plus solide. L'ensemble des essais d'association surfactant/cosurfactant n'a pas été concluant avec une instabilité sous forme de séparation des phases apparaissant dans les heures ou jours suivant la fabrication des émulsions. Cette instabilité pourrait s'expliquer par le fait que le comportement des tensioactifs aux interfaces dépend de leur concentration mais également du caractère physicochimique de la phase grasse. En effet, des interactions entre la partie apolaire du tensioactif et les chaînes d'acide gras de l'huile jouent un rôle sur la stabilité des gouttes dispersées. L'huile utilisée (MCT) pourrait jouer un rôle dans cette instabilité. Des études du comportement des tensioactifs à l'interface eau/huile auraient été judicieuses afin d'évaluer ces interactions. En outre, selon *Porrás et al., 2008*, la valeur de HLB X d'un mélange surfactant/cosurfactant dans le cas de nanoémulsions composées de décane et d'une association ester de sorbitane/POE ester de sorbitane ne devrait pas être comprise entre 4 et 6 comme pour un tensioactif seul mais serait d'environ 10 (dans l'étude présentée). Des essais de variation de HLB ont été effectués entre 4,9 et 8 sans réussir à former des émulsions stables dans le temps. D'autres essais sur une gamme plus large de HLB seraient pertinents.

Prajapati et al., 2012, ont étudié la combinaison de monoglycérides et de triglycérides d'acides gras pour le cas de microémulsions huile-dans-eau. Cette étude a permis de montrer que le fait de mélanger des mono et triglycérides permettait d'obtenir des tailles de particules dispersées plus petites que lorsque ces deux composants ont été utilisés séparément. Des essais d'émulsions eau-dans-huile ont donc été effectués en associant du caprylate de glycérol (monoglycéride), du MCT (triglycéride) et du Monooléate de sorbitane. Seules les formulations contenant peu de phase aqueuse (10 et 20%) n'ont pas abouti à une inversion de phase huile-dans-eau. L'inversion de phase semble se produire en fin d'émulsification et se caractérise par une augmentation de la fluidité de l'émulsion. Les causes peuvent être une quantité trop importante de phase aqueuse ou un cisaillement final trop important. Le but étant d'incorporer un

6.2.1.1-Influence de la concentration en PGPR sur la taille des gouttes

Le but de cette étude est d'évaluer l'influence de la concentration en PGPR sur la taille des gouttes dispersées. Pour cela, la taille de goutte ($d_{3,2}$) d'émulsions composées de 50% de phase aqueuse, 50% de phase grasse et d'une concentration en PGPR variant entre 1,6 et 3,0% ont été mesurées et présentées dans la Figure 27.

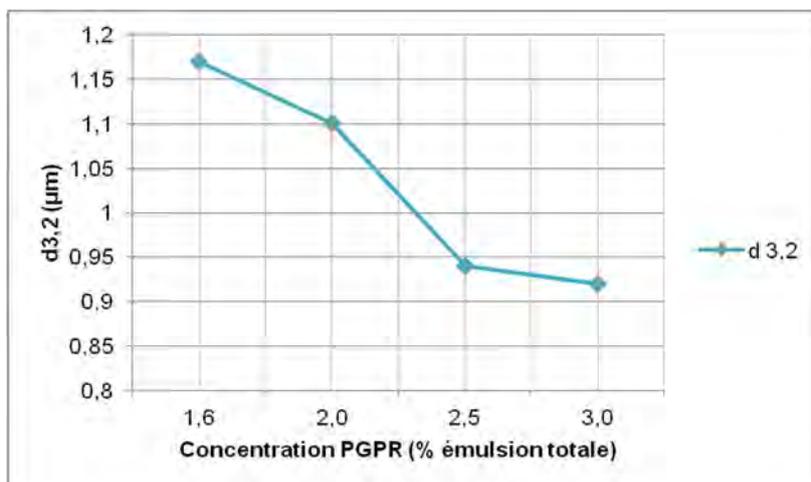


Figure 27 : Représentation graphique du diamètre des gouttes dispersées $d_{3,2}$ (μm) en fonction de la concentration en PGPR (% total dans l'émulsion 50:50)

On note que plus la concentration en PGPR augmente, plus le diamètre des gouttes dispersées diminue. En effet, en se plaçant à l'interface eau/huile, le tensioactif diminue la tension interfaciale et permet d'obtenir une dispersion fine à un coût énergétique moins élevé (*Singh and Kumar, 2012*). Les molécules de tensioactif forment un film interfacial qui, lorsqu'il est suffisamment élastique, stabilise l'émulsion en créant une barrière contre la coalescence des gouttes. Notre principal objectif est d'obtenir une émulsion stable dans le temps. L'étude suivante a donc porté sur la relation entre la quantité de tensioactif, et de façon indirecte, de la taille des gouttes dispersées d'une part et la stabilité des émulsions dans le temps d'autre part.

6.2.1.2 - Etude de stabilité des émulsions

○ Influence de la concentration en tensioactif

Une étude d'évaluation de la stabilité d'émulsions a été réalisée par mesure granulométrique de la taille des gouttes dispersées sur une période de 3 à 4 mois. L'étude a été effectuée sur cinq émulsions composées de 50% de phase aqueuse et 50% de phase grasse. Seule la concentration en PGPR varie dans un ordre décroissant : 3,0% (A), 2,5% (B), 2,0% (C), 1,6% (D) et 1,0% (E) comme indiqué Figure 28. Le but de cette étude est de mettre en évidence les phénomènes d'instabilité des émulsions apparaissant au cours du temps.

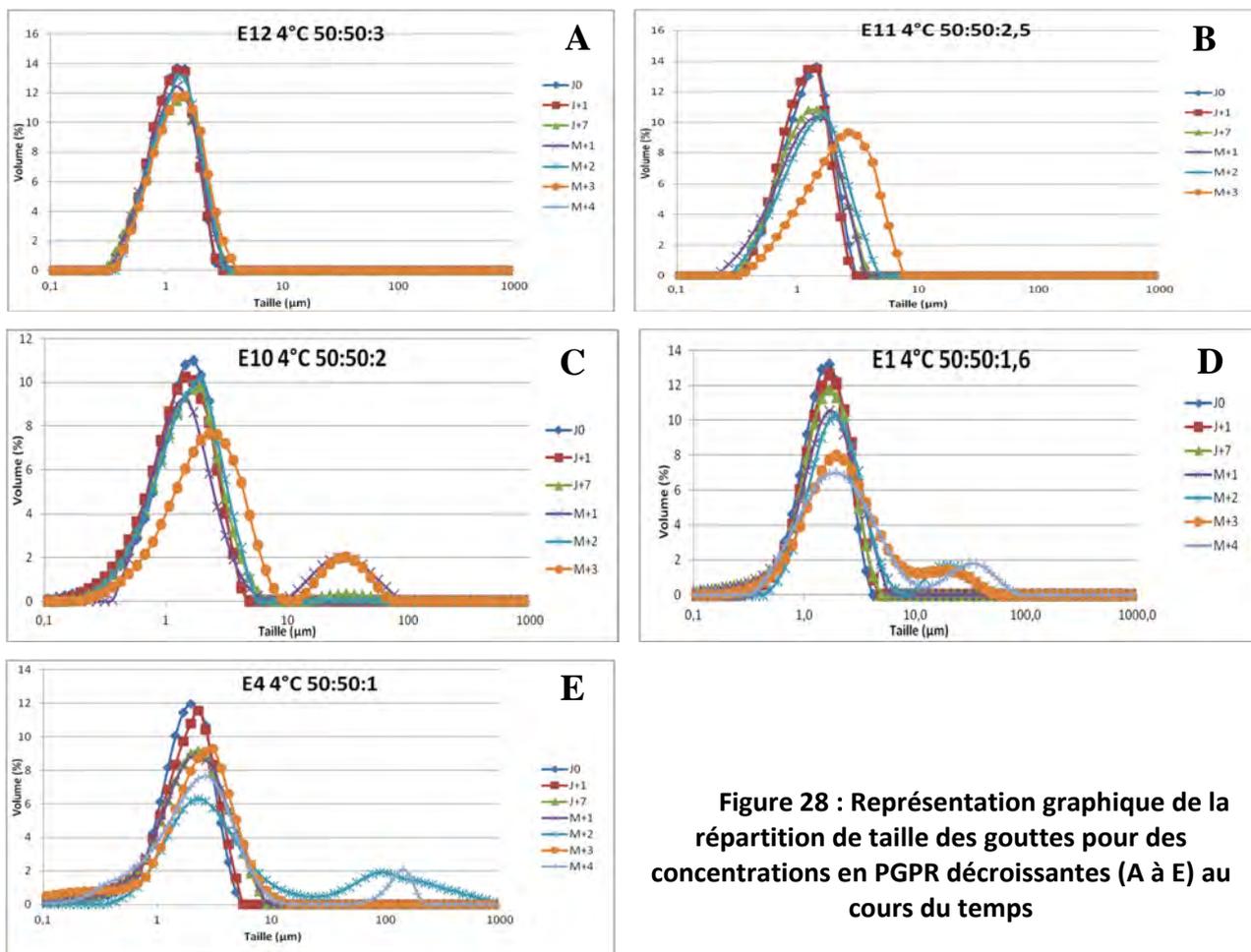


Figure 28 : Représentation graphique de la répartition de taille des gouttes pour des concentrations en PGPR décroissantes (A à E) au cours du temps

D'après la Figure 28 le diamètre initial des gouttes dispersées est de l'ordre du micromètre pour l'émulsion 50:50(3) (graphe A) et tend à augmenter lorsqu'on diminue la quantité de PGPR (graphes B à E) ce qui confirme les données de la Figure 27. De plus, on observe qu'il ya un décalage des courbes vers la droite au cours du temps c'est-à-dire vers des tailles de gouttes plus élevées. Parallèlement, la proportion en volume des gouttes initiales de faible taille (à J0) diminue. La population initialement monodisperse devient ainsi polydisperse. Ce processus est d'autant plus important que la concentration en PGPR diminue et reflète l'instabilité des émulsions. En effet, cette augmentation de la taille de goutte peut être expliquée par les phénomènes de mûrissement d'Ostwald et de coalescence. Comme représenté Figure 29, ces deux phénomènes tendent à faire disparaître les gouttes de petite taille au profit de gouttes plus grosses.

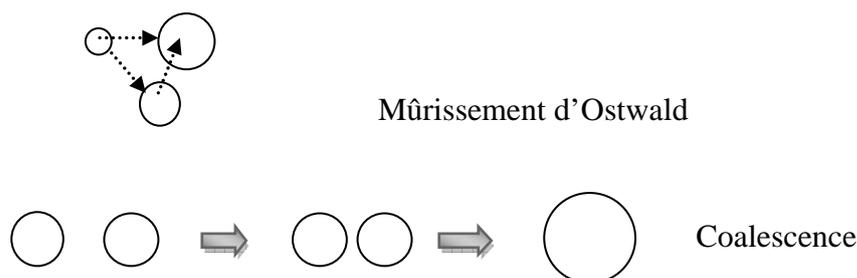


Figure 29 : Représentation schématique du mûrissement d'Ostwald et de la coalescence

Initialement, le mûrissement d'Ostwald se produit lorsqu'il y a une répartition polydisperse des gouttes alors que la coalescence peut être observée quelle que soit la répartition de taille des gouttes. En augmentant la proportion de gouttes de gros volume, la coalescence peut accroître le phénomène de mûrissement d'Ostwald. On notera que les phénomènes d'instabilité n'étant pas forcément homogènes dans l'ensemble des échantillons, les prélèvements pour les analyses peuvent présenter certains biais comme sur le graphe (E) M+3 où une deuxième population n'apparaît pas autour de 100 μ m alors qu'elle apparaissait à M+2.

Il est important de connaître ces phénomènes d'instabilité des émulsions car la formulation finale doit être suffisamment stable pour pouvoir être stockée après fabrication mais doit également permettre une libération du principe actif contenu dans la phase interne. Cette libération doit être maîtrisée dans le temps et est influencée par les phénomènes d'instabilité.

o *Influence de la température de stockage*

Les émulsions présentées précédemment ont également été stockées à température ambiante (20°C environ) qui est une température éventuelle de stockage et à 37°C, température de l'humeur vitrée. Afin d'étudier l'effet de la température sur les émulsions, l'évolution dans le temps du diamètre des particules $d_{3,2}$ (μ m) en fonction de la température de stockage est représentée sur la Figure 30.

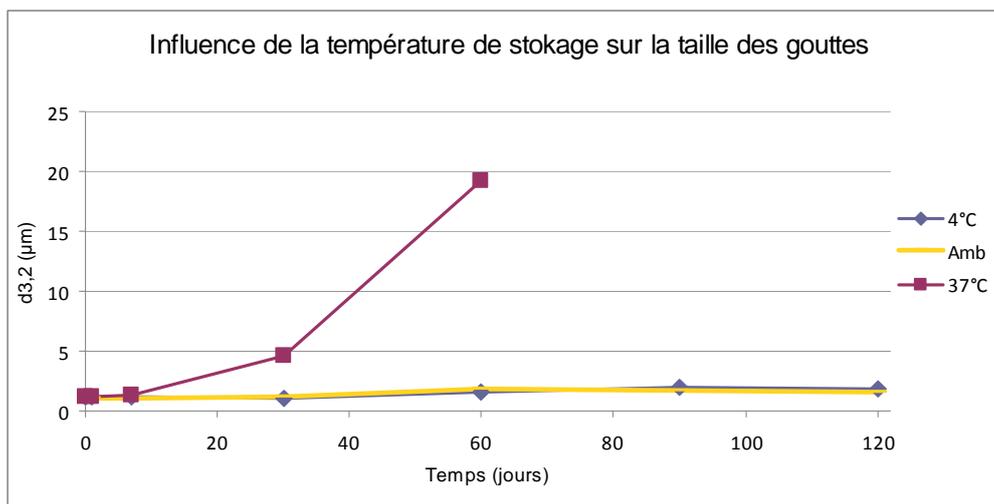


Figure 30 : Evolution au cours du temps de la taille des gouttes dispersées en fonction de la température de stockage d'une émulsion 50:50(3) avec du PGPR

On observe que la taille de gouttes de l'émulsion stockée à 37°C augmente progressivement dans le temps et ne peut plus être correctement mesurable après 60 jours de stockage du fait de l'hétérogénéité de l'échantillon liée à une sédimentation. Au contraire, pour les émulsions

stockées à 4°C et à température ambiante il n’y a pas d’évolution significative de la taille des gouttes sur une période de 120 jours. La température et la durée du stockage ont donc une influence sur la taille des gouttes et sur les phénomènes d’instabilité présentés précédemment. Ainsi, pour cette émulsion, deux températures de stockage peuvent être envisagées : 4°C et 20°C tout en assurant une stabilité sur au moins 120 jours. Le fait qu’il y ait une augmentation de la taille des gouttes à 37°C pourrait permettre leur diffusion à travers la phase externe huileuse afin d’être libérées progressivement au cours du temps après injection intravitréenne. Cette instabilité à 37°C peut alors être désirée mais doit être maîtrisée pour une libération homogène dans le temps.

6.2.1.3- Tests *in vivo*

Dans le cadre de la collaboration entre Emulsar, le laboratoire Santen et l’Institut de la Vision, des essais *in vivo* ont été réalisés par ce dernier partenaire. Les quatre premières émulsions blanches réalisées dans les phases préliminaires de développement, ont été injectées dans la cavité vitrée de souris et sont présentées dans le Tableau 10. Ces émulsions sont dites blanches car elles ne contiennent pas de principe actif dans la phase interne aqueuse.

Tableau 10 : Récapitulatif de la composition des émulsions étudiées en injection *in vivo* chez la souris

Emulsion	Composition E:H(TA)	% PGPR dans la phase grasse
E6	90:10(0,45)	0,5
E5	90:10(1,08)	1,2
E9	50:50(1,2)	2,4
E8	50:50(3)	6

Les objectifs de ces essais *in vivo* ont été d’évaluer l’injectabilité des émulsions, d’observer leur comportement et leur persistance dans l’humeur vitrée de la souris sur une période d’un mois et d’évaluer leur impact sur la rétine du point de vue histologique.

Concernant l’injectabilité, toutes les émulsions ont pu facilement être injectées et ont ensuite persistées dans la cavité vitrée durant un mois (durée de l’observation). Du point de vue de leur comportement, les émulsions contenant 10% de phase aqueuse ont eu tendance à flotter dans la cavité vitrée alors que celles avec 50% de phase aqueuse se sont d’abord réparties dans le fond de l’œil puis ont fini par migrer dans la partie supérieure de la cavité. De plus, les émulsions contenant 10% de phase aqueuse ont été délétères au niveau rétinien entraînant hémorragies, œdèmes et décollement de rétine. Inversement, aucune anomalie du point de vue histologique n’a été recensée pour les émulsions contenant 50% de phase aqueuse. On précisera que des études antérieures ont été menées pour démontrer l’absence de toxicité

oculaire du MCT. De plus, les émulsions délétères sont celles contenant la plus faible quantité de PGPR. Ces deux composants ne peuvent donc pas expliquer le caractère délétère observé. Le Polyglycéryl-3-polyricinolâte est efficace pour stabiliser des émulsions eau-dans-huile, cependant il n'est pour le moment pas autorisé pour un usage pharmaceutique oculaire (Wolf F, 2013). Nos recherches se sont donc orientées vers d'autres types de tensioactifs.

6.2.2- Essais avec le Monooléate de sorbitane

Le Monooléate de sorbitane (C18 : 1) est un tensioactif lipophile non-ionique dont la structure chimique est représentée Figure 31.

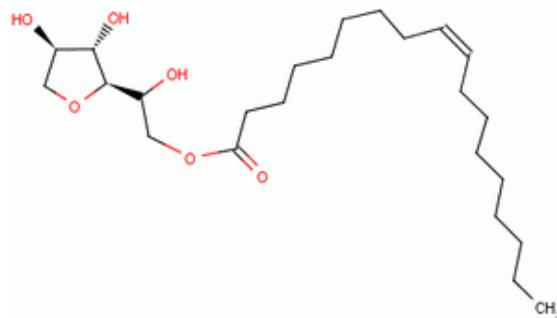


Figure 31 : Représentation de la structure chimique du Monooléate de sorbitane

Le Monooléate de sorbitane a déjà fait l'objet d'études pour la formulation d'émulsions E/H (Williams JM, 1991). D'après Schmidts et al., 2009, il est possible de former une émulsion simple E/H dont les proportions E:H(TA) sont 50:50(4) avec comme phase aqueuse une solution NaCl 0,1M et une phase grasse de paraffine. Cependant cette émulsion n'est stable que quelques heures si elle n'est pas utilisée pour former une émulsion multiple. En se basant sur cette formulation et en augmentant la quantité de Monooléate de sorbitane à 10%, une émulsion stable dans le temps (suivi à M+2) est obtenue. Cependant cette émulsion ne contient pas l'huile souhaitée (MCT) et présente une viscosité importante ce qui rend difficile l'incorporation de la phase aqueuse en fin d'émulsification ainsi qu'une éventuelle injection. Afin de palier à ces deux problèmes des essais de variation de la nature de la phase grasse et de la température d'émulsification ont été réalisés. On sait que l'incorporation d'une importante quantité de phase dispersée tend à augmenter la viscosité de l'émulsion finale (Chan et al., 2007) mais ce paramètre ne peut pas vraiment être modifié car il faut incorporer la plus faible quantité possible d'huile pour que celle-ci soit résorbable dans l'œil.

6.2.2.1-Variation de la nature de la phase grasse

Afin de remplacer l'huile de paraffine et diminuer la viscosité de l'émulsion, des huiles dont la viscosité dynamique est inférieure à celle de la paraffine ont été utilisées. Les essais réalisés sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Démarche d'optimisation de formulation avec du Monooléate de sorbitane en variant la nature de la phase grasse

	E:H(TA)	Huile	Viscosité dynamique huile à 25°C (mPa.s)	Texture émulsion finale	Stabilité maximale à 4°C vis-à-vis de la séparation de phases / temps d'observation de M+x
E16	50:50(10)	Paraffine	60,7	épaisse +++	M+3/M+3
E20	50:50(10)	MCT	26,3	épaisse ++	M+2/M+2
E41	50:50(5)	MCT		épaisse ++	Instable à M+1
E42	50:50(5)	Propylène glycol dicaprylate dicaprâte	8,0	épaisse +	M+1/M+1
E43	50:50(5)	Myristate d'isopropyle	5,6	fluide	M+1/M+1

On observe une augmentation de la fluidité de l'émulsion finale (analyse visuelle) lorsque la viscosité dynamique de l'huile diminue. Concernant la stabilité des émulsions, celle qui contient de la paraffine semble présenter une meilleure stabilité (à confirmer sur une période d'observation plus importante). Or, le *MCT* est privilégiée comme phase grasse car des études préalables réalisées par le laboratoire Santen ont montré sa résorbabilité au bout de quelques mois dans la cavité oculaire et une absence de toxicité.

6.2.2.2-Variation de la température

Afin de tenter de diminuer la viscosité des émulsions pour une meilleure incorporation de la phase aqueuse, il a été envisagé d'augmenter la température d'émulsification afin de rendre la phase grasse plus fluide. Les tests de formulation sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Démarche d'optimisation de formulation avec du Monooléate de sorbitane en variant la température d'émulsification

Température d'émulsification	Détails
70°C	Bain-marie + plaque chauffante
65°C à 40°C	Début d'émulsification à chaud puis bain froid final en homogénéisant
50°C à 40°C	
Inférieur à 20°C	Température maintenue inférieure à 20°C

Les différents essais n'ont pas montré l'amélioration attendue et ont présenté une instabilité à J+1. Cela confirme les travaux de *Peltonen et al., 2001* qui ont étudié le comportement d'une monocouche formée par du Monooléate de sorbitane par la technique de Langmuir-Blodgett. Ils ont observé que le fait d'augmenter la température au-dessus de 32°C fait que la monocouche de molécules de tensioactif devient gazeuse et ne forme pas un film solide à l'interface. De même pour *Opawale FO and Burgess DJ, 1998*, qui ont démontré que l'élasticité du film interfacial diminue à partir de 50°C. Les manipulations suivantes ont donc

été réalisées à une température inférieure à 20°C comme recommandé par le fabricant (Seppic, France).

6.2.2.3-Etude granulométrique

Les résultats de l'étude granulométrique obtenus à l'aide du granulomètre laser n'ont pas pu être exploités pour les émulsions présentées ci-dessus. En effet, comme on peut le voir sur la Figure 32 l'apparition rapide d'un phénomène de floculation a été observé ce qui introduit un biais dans les mesures par granulométrie laser.

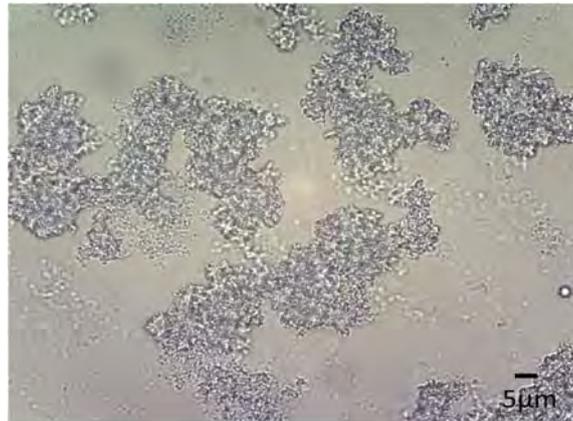


Figure 32 : Cliché du phénomène de floculation apparaissant dans les émulsions formulées avec le Monooléate de sorbitane observées au microscope optique

Néanmoins, une étude de distribution granulométrique a été réalisée manuellement à partir de clichés d'une émulsion 50:50(10) diluée au 1/10ème et est présentée Figure 33.

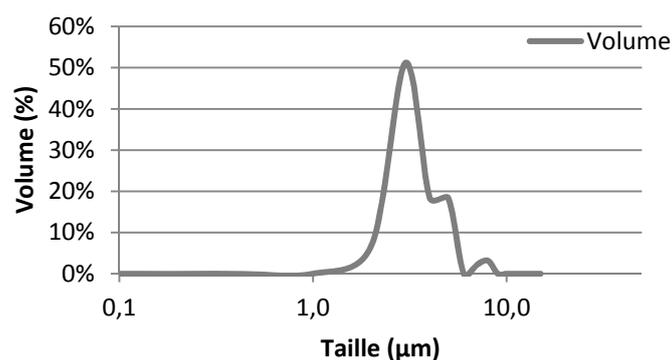


Figure 33 : Représentation graphique de la répartition de taille des gouttes d'une émulsion 50:50(10) avec du Monooléate de sorbitane

La répartition étant plutôt monodisperse avec un pic maximum à 3µm et les tailles de gouttes restant faibles avec des valeurs de $d_{3,2}$ moyen=2,96µm et $d_{4,3}$ moyen= 3,37µm des essais complémentaires ont été effectués malgré le phénomène de floculation.

6.2.2.4-Etude d'instabilité

On remarque un relargage d'une partie de la phase grasse à la surface des émulsions qui augmente avec la température et le temps de stockage. Ce relargage est dû au phénomène de floculation. En effet, les gouttes dispersées s'agrègent entre elles et piègent ainsi une partie de la phase externe. Au cours du temps les floes auront une tendance accrue à sédimenter (*Mobius et al., 2001*). L'huile piégée entre les gouttes va être libérée et on observe alors un bloc d'émulsion dense entouré d'huile. Il est difficile de s'opposer au phénomène de floculation dû aux forces d'interaction de London-Van der Waals entre les particules. L'énergie d'attraction U_a (Joules) entre deux particules est exprimée selon l'Equation 7.

$$U_a(h) = -\frac{AR}{12h} \quad \text{Equation 7}$$

où h (unité de longueur) est la distance entre deux particules, R leur rayon (longueur) et A (Joules) la constante d'Hamaker. Cette constante reflète le caractère attractif de l'interaction de Van der Waals et dépend de la nature des phases continue et dispersée. Ainsi, la phase continue peut jouer un rôle d'écran par rapport aux attractions entre particules dispersées. Une des possibilités de ralentir le phénomène de floculation est de choisir des phases interne et externe ayant des constantes A similaires (*Grossiord JL, 2012*). De plus, le cas de l'introduction d'un agent anti floculant tel que le Chromium stéarate a été reporté dans la littérature (*Möbius D et al., 2001*). Cela a permis de diminuer le taux de floculation d'une émulsion eau:diesel(monooléate de sorbitane) est ainsi d'augmenter sa stabilité vis-à-vis de la sédimentation de 0,1 à 10,5 heures. Ces deux pistes visant à maîtriser le mécanisme de floculation n'ont à ce jour pas été approfondies dans nos recherches.

6.2.2.5-Variation de la proportion de phase aqueuse

Le phénomène de floculation étant difficile à éviter, le fait d'augmenter la quantité de phase interne aqueuse permettrait un moindre relargage d'huile car elle serait présente en moins grande quantité. La quantité d'eau introduite étant importante (65-70%) un système de goutte à goutte a été développé pour ces manipulations afin que la phase aqueuse soit introduite dans la phase grasse à un débit lent d'environ 1,1mL/min. Pour la formulation de départ E69 avec 65% de phase aqueuse, la quantité de tensioactif a été calculée proportionnellement à la composition 50:50(10) étudiée précédemment. A partir de cette formule des améliorations de formulation ont été réalisées comme présenté dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Démarche d'optimisation de formulation avec le Monooléate de sorbitane en variant la proportion de phase aqueuse

	E:H(TA)	Huile	Avantage attendu	Ordre de taille des gouttes
E69	65:35(13)	MCT	Rotor-stator(RS) : cisaillement plus important	1-5µm
E70	65:35(13)	MCT	Hélice : Incorporation plus aisée de l'eau	5 - 15µm
E71	65:35(8,75)	MCT	Diminution quantité de tensioactif (RS)	1 à 15µm
E72	70:30(6)	MCT	Augmentation quantité d'eau (RS)	<i>émulsion multiple</i>
E73	70:30(6)	Myristate d'isopropyle	Diminution viscosité de l'émulsion (RS)	1µm

Pour l'ensemble de ces émulsions, le phénomène de floculation a persisté ainsi que le relargage de l'huile formant un bloc dense. Le procédé d'émulsification au rotor-stator permet un cisaillement plus important que l'hélice en début d'émulsification tant que l'émulsion n'est pas trop épaisse ce qui permet de former des gouttes de petites tailles (observation microscopique). Par contre, l'hélice permet un meilleur macromélange avec une incorporation plus aisée de la phase aqueuse même dans le cas d'émulsions très visqueuses. On remarque qu'une émulsion multiple E/H/E a été formée lorsque l'introduction de phase aqueuse a été augmentée à 70%. En effet, une première émulsion simple E/H s'est créée puis à cause de la viscosité trop importante de l'émulsion, l'eau ajoutée a constitué un troisième milieu au lieu d'être incorporée comme phase interne. La formulation avec le myristate d'isopropyle permet d'obtenir une répartition quasi monodisperse de gouttes de l'ordre du micromètre.

Le Monooléate de sorbitane est un tensioactif utilisé pour stabiliser des émulsions eau-dans-huile. Cependant lors de nos essais, un phénomène de floculation a persisté lors de la formulation à l'aide des phases grasses MCT et Myristate d'isopropyle souhaitant être utilisées. Il existe peu de données concernant les émulsions eau-dans-huile. Le fait d'utiliser une phase grasse unique (MCT) car son absence de toxicité oculaire a été démontrée, complique d'autant plus la formulation.

Les essais avec le Monooléate de sorbitane ont permis d'obtenir des émulsions présentant une taille de goutte d'environ 3µm laissant présager une bonne stabilité. Cependant, un phénomène de floculation a persisté et reste à investiguer. Au vue de ces résultats, des études portant sur une troisième catégorie de tensioactifs, les sucroesters ont été menées.

6.2.3- Essais avec le Polystéarate/palmitate de saccharose

Les esters de saccharose d'acides gras sont des tensioactifs non ioniques composés d'un saccharose polaire sur lequel peuvent se fixer une à six chaînes d'acides gras hydrophobes. Selon le nombre et la nature des acides gras, une large gamme de valeurs de HLB entre 1 et 16 peut être obtenue (Csóka G, 2007). Le tensioactif utilisé dans cette étude est un mélange de

polystéarate et polypalmitate de saccharose de HLB 1 tout deux répertoriés dans la Pharmacopée Européenne (*EDQM, Ph.Eur., 2013*) et représentés Figure 34.

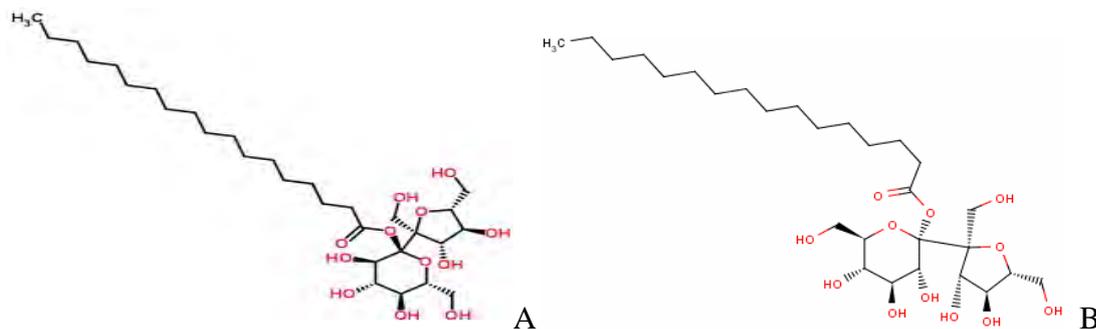


Figure 34 : Représentation des structures chimiques du stéarate de saccharose (A) et du palmitate de saccharose (B)

D'après les informations fournies par le fabricant (*Sisterna I&2*), les sucroesters permettent de produire des émulsions à des concentrations en phase aqueuse supérieure ou égale à 50%. La solubilisation des sucroesters dans la phase grasse ainsi que l'ensemble de l'émulsification doivent s'effectuer entre 60 et 80°C. C'est dans ces conditions d'utilisation qu'a été réalisé le premier essai de formulation E46 50:50(5) qui reste stable à 4°C et 37°C après un mois de stockage.

Cependant, le fait d'émulsionner à chaud implique une manipulation compliquée notamment liée à la conservation des deux phases à une température élevée tout au long de l'essai, un risque d'évaporation de la phase aqueuse et une complexité supplémentaire en cas de transposition industrielle. Des essais de formulation à température ambiante ont donc été réalisés en solubilisant préalablement le tensioactif à chaud dans la phase grasse puis en laissant refroidir. L'ensemble des essais et la démarche d'optimisation des formules sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Démarche d'optimisation de formulation avec le polystéarate de saccharose

	Proportion	Huiles	Températures émulsification	Inconvénients	Solution proposée
E46	50:50(5)	MCT	65 - 70°C	Haute température Observation particules de TA non dissout	Manipulation à T Amb → E52
E52	50:50(5)	MCT	Ambiante	Présence de particules de TA non dissout	Diminution quantité TA → E53
				Emulsion visqueuse	Huile moins visqueuse → E64
E53	50:50(2,5)	MCT	Ambiante	Toujours présence de cristaux	
E64	50:50(5)	Myristate d'isopropyle	Ambiante	Encore visqueux	

La première optimisation du procédé de fabrication a porté sur la diminution de la température d'émulsification (émulsions E46 et E52). Aucun changement significatif n'a été observé en termes de taille de gouttes et de stabilité de l'émulsion. Une émulsification à température ambiante est donc envisageable. Cependant, l'émulsion reste visqueuse. L'utilisation d'une huile présentant une viscosité dynamique plus faible que celle du MCT, le myristate d'isopropyle a été testée mais l'émulsion finale est restée visqueuse. Des essais de seringuabilité permettraient d'écartier ou non ces émulsions. De plus, le fait d'observer en microscopie optique la présence de particules de sacroester dans la formule finale comme illustré Figure 35, et ce, quelle que soit la quantité de tensioactif utilisée peut présenter un critère éliminatoire pour une injection ophtalmique.

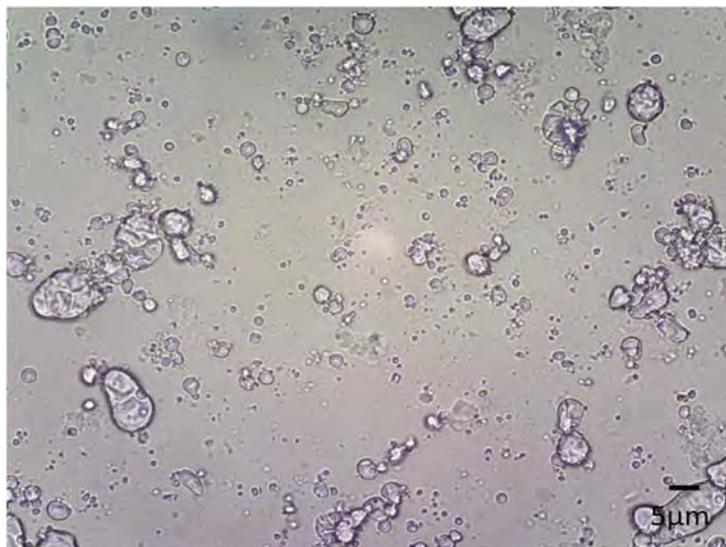


Figure 35 : Cliché d'une émulsion contenant du polystéarate de saccharose observée au microscope optique

La dissolution du polystéarate de saccharose s'est effectuée à chaud (environ 70°C) durant une dizaine de minutes sous agitation magnétique ou directement à l'aide du rotor-stator. Un temps plus important de dissolution pourrait être envisagé afin de diminuer la présence du tensioactif non dissout dans l'émulsion finale. Du point de vue formulation, il a été observé qu'un cisaillement trop important en fin d'émulsification (20500 tours par minute) peut entraîner une inversion de phase de l'émulsion.

Un seul mélange d'esters de saccharose de HLB 1 a été testé. D'autres sacroesters dont le HLB est compris entre 4 et 8 pouvant servir à former des émulsions eau-dans-huile sont disponibles sur le marché et pourront être testés.

6.3- Cinétiques de libération de la phase interne

Les émulsions formulées ayant pour but de libérer de façon prolongée le principe actif contenu dans leur phase interne aqueuse, des mesures de taux de libération ont été réalisées selon la méthode décrite dans le paragraphe 5.2.4. En effet, la libération doit être inexistante lors du stockage de l'émulsion mais une fois celle-ci injectée dans la cavité vitrénne le principe actif doit être libéré progressivement sur une période de 3 à 6 mois. Dès les premières étapes de conception d'une spécialité pharmaceutique, il est important de prendre en considération les contraintes qui seront imposées au produit fini, comme par exemple le passage de l'émulsion à travers une aiguille lors de l'injection. Ainsi, une première série d'échantillons a fait l'objet d'un passage à travers une aiguille de 27 gauges (notée C pour Cisailé) alors qu'une deuxième série n'a pas été cisailée (noté NC pour Non Cisailé). Chaque série a ensuite été divisée en deux groupes dont un a été stocké à température ambiante (température éventuelle de stockage) et l'autre à 37°C (température de la cavité vitrénne) afin de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation et d'évaluer l'influence de la température sur la libération de la phase interne. La Figure 36 présente le taux de libération du traceur contenu dans la phase interne aqueuse d'émulsions 50:50 stabilisées par du Monooléate de sorbitane (Sorb. M., 10%) et du Polystéarate/palmitate de saccharose (SP01, 5%) à J+13 et J+20 respectivement.

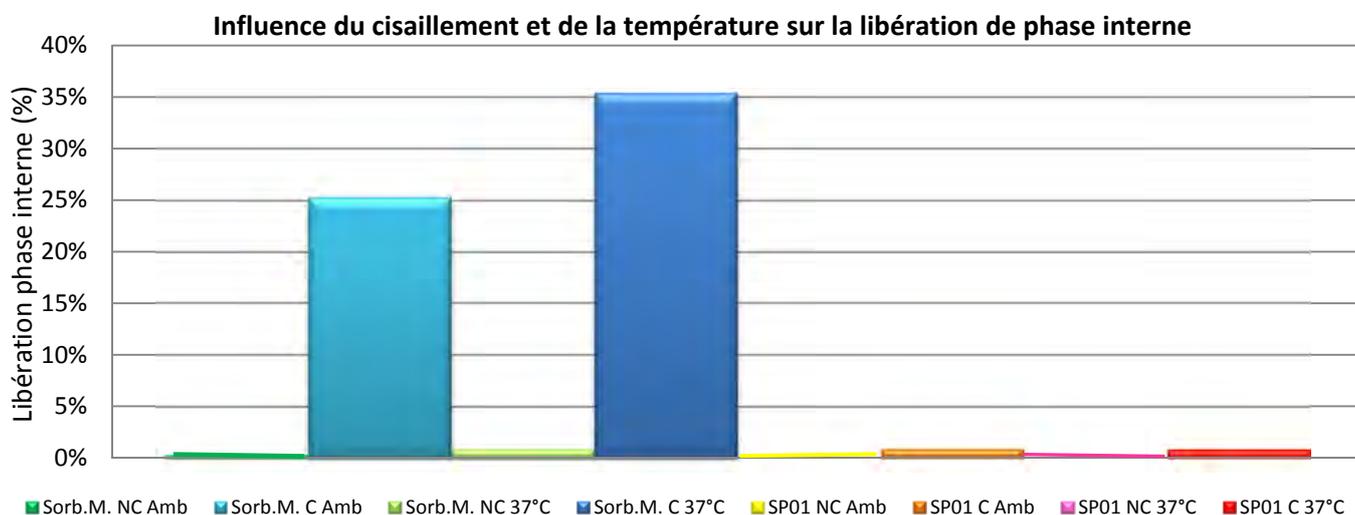


Figure 36 : Influence du cisaillement et de la température de stockage sur des émulsions contenant du Monooléate de sorbitane et du Polystéarate/palmitate de saccharose

Dans le cas du Monooléate de sorbitane, on observe une différence importante du pourcentage de phase interne libérée entre l'échantillon non cisailé et l'échantillon cisailé. Ce dernier présente un taux de libération 50 fois plus élevé que celui de l'échantillon non cisailé (en vert et bleu sur la gauche du graphique). Par contre, pour les émulsions contenant l'ester de saccharose, la différence de libération liée au cisaillement est bien moins significative. En effet,

on notera que pour les échantillons non cisailés, aucune libération n'a été observée à J+20 (plots jaune et rose) et que pour ceux cisailés la libération est inférieure à 1%. De même, l'effet de la température sur le taux de libération n'a pu être clairement mis en évidence que pour le cas du Monooléate de sorbitane. En effet, le pourcentage de libération a en moyenne été multiplié par 1,9 entre les échantillons stockés à 20°C et à 37°C. A 37°C, environ 35% de la phase interne aqueuse a été libérée après 13 jours pour l'émulsion contenant le Monooléate de sorbitane ce qui semble excessivement élevé pour un produit à libération prolongée qui est supposé libérer le principe actif pendant plusieurs mois. Cependant, on ne peut pas exclure le fait qu'il y ait une libération accrue de la substance active suite à l'injection puis ce taux peut diminuer par la suite. Cela pourrait permettre d'avoir un effet rapide du médicament juste après l'injection puis une libération prolongée sur une période de plusieurs mois. On ne peut donc pas exclure cette émulsion sur la base d'un résultat ponctuel. On notera que la surface de contact émulsion/milieu receveur n'a pas pu être calibrée du fait de l'importante viscosité des émulsions qui, pour le cas du Monooléate de sorbitane et du polystéarate de saccharose formaient des « serpentins » se répartissant de façon inhomogène dans le milieu receveur. Ces mesures ont permis d'obtenir les premières données sur l'influence du cisaillement et de la température sur la libération de la phase interne aqueuse de nos émulsions. Des analyses complémentaires seront effectuées afin d'évaluer l'influence de ces deux paramètres sur une période de temps plus importante. Notons enfin que des mesures similaires (sans cisaillement) réalisées préalablement chez Emulsar sur des émulsions stabilisées par du PGPR ont mis en évidence une rétention quasi-totale du traceur pendant une période allant jusqu'à 5 mois à température ambiante et à 37°C.

6.4- Essais de seringabilité

La seringabilité peut être définie comme la pression ou la force requise pour l'injection à un certain débit d'un fluide à travers une aiguille de taille appropriée (*Burckbuchler V et al., 2010*). L'objectif de l'étude est de concevoir une émulsion qui puisse être injectée directement dans l'humeur vitrée à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille. Nous avons vu que les émulsions qui semblaient les plus stables présentaient également une importante viscosité. Le but des premiers essais a donc été de comparer la seringabilité d'émulsions avec du Monooléate de sorbitane et du Polystéarate de saccharose présentées dans les paragraphes précédents par rapport à une émulsion avec du PGPR. En effet, cette dernière émulsion avait fait l'objet d'études *in vivo* qui avaient montrés qu'elle était facilement injectable. C'est donc notre émulsion de référence. Les valeurs de force (en N) obtenues à partir des mesures réalisées à l'aide du dispositif défini dans la partie Matériel&Méthodes 5.2.5 sont présentées sur la Figure 37.

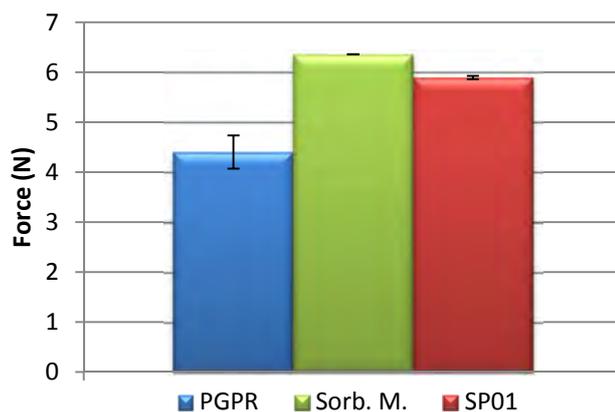


Figure 37 : Représentation graphique de la force (N) développée par trois émulsions contenant respectivement du PGPR, du Monooléate de sorbitane et du polystéarate de saccharose.

Ces premières données montrent que les émulsions testées demandent toutes une force de même ordre de grandeur pour être injectées à travers une aiguille de 27 gauges. Des mesures plus précises de seringabilité pourraient être réalisées grâce à un dispositif composé d'un texturomètre comme présenté dans l'article de *Burckbuchler V et al., 2010*.

6.5- Discussion générale : utilisation de ces tensioactifs dans une spécialité pharmaceutique oculaire injectable

La voie intravitréenne étant encore peu développée à ce jour, seuls une quinzaine d'excipients sont autorisés par la *FDA* pour cette voie d'administration. Ainsi, concernant les tensioactifs seule la forme polyoxyéthylénée du Monooléate de sorbitane connue sous le nom de Polysorbate 80 est autorisée. L'autorisation d'utilisation du Monooléate de sorbitane étudié dans ce rapport ne semble donc pas écartée. Par contre, le PGPR n'est à ce jour pas autorisé pour un usage pharmaceutique et sa teneur est limitée dans les produits agroalimentaires. Néanmoins, on notera que lors des essais *in vivo* d'injection intravitréenne présentés dans ce rapport, aucune toxicité oculaire n'a pu être imputée au PGPR. Enfin, les deux esters de saccharose utilisés ici sous forme de mélange sont autorisés par la *FDA* pour une administration orale en faible quantité (1% ou moins de 45 mg dans la formulation totale) (*site FDA*).

Outre les aspects réglementaires, l'importante viscosité de la plupart des émulsions formulées présente un défi à relever. En effet, afin d'accélérer la biorésorption de l'émulsion injectée, la quantité de phase externe huileuse doit être faible ce qui implique l'introduction d'une grande quantité de phase interne aqueuse qui fait augmenter la viscosité. Ainsi, un

dispositif développé chez Emulsar permettant d'évaluer la seringabilité des émulsions a permis de les comparer entre elles.

Enfin, les spécialités à visée ophtalmique devant être stériles, une réflexion devra être réalisée sur le procédé de stérilisation qui ne devra pas détériorer le produit fini.

La difficulté de formulation d'émulsions eau-dans-huile fait que les spécialités pharmaceutiques sous cette forme galénique sont rares. *Schmidts et al., 2009* ont fait le même constat pour le cas des émulsions multiples E/H/E pourtant plus répandues : « A ce jour, aucune émulsion multiple E/H/E n'a dépassé le stade de la recherche et de mise sur le marché puisque les émulsifiants efficaces pour ce type d'émulsions ne sont disponibles qu'en grade cosmétique et pas pharmaceutique ». La recherche et l'innovation ont donc parfaitement leur place dans ce domaine d'application pointu.

7- Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans ce cas pratique ont porté sur la conception d'un injectable oculaire sous la forme d'une émulsion inverse eau-dans-huile. Une première étude a été menée sur une dizaine de tensioactifs isolément ou en association afin d'évaluer leur capacité à former des émulsions stables dans le temps. Seuls trois tensioactifs : le Polyglycéryl-3-polyricinoléate, le Monooléate de sorbitane et le Polystéarate/palmitate de saccharose ont montré des résultats préliminaires satisfaisants et ont fait l'objet d'études plus approfondies. L'utilisation du Polyglycéryl-3-polyricinoléate a permis de formuler des émulsions suffisamment stables dans le temps avec des mécanismes d'instabilité qui n'apparaissent qu'après plusieurs mois de stockage, ce qui permettrait une libération prolongée du principe actif. En ce qui concerne les émulsions contenant du Monooléate de sorbitane, une distribution homogène de gouttes de diamètre d'environ 3 μ m a été observée laissant présager une bonne stabilité. Néanmoins, un phénomène de floculation important a été observé dans les formulations contenant les phases grasses choisies dans cette étude, le MCT et le Myristate d'isopropyle. Enfin, les essais avec le Polystéarate/palmitate de saccharose ont permis de formuler des émulsions stables mais hautement visqueuses. De plus, la présence de particules de tensioactif dans les émulsions finales reste à investiguer.

Du fait de l'incorporation d'une grande quantité de phase interne aqueuse, une viscosité importante a été observée dans de nombreuses formulations. Il faut cependant tenir compte que l'émulsion finale doit être injectable. Des premiers tests de seringabilité des émulsions ont ainsi été réalisés à partir d'un dispositif mis au point chez Emulsar lors de mon stage.

L'optimisation des émulsions pourrait être obtenue grâce à des variations de formulation mais aussi de procédés. En effet, l'étude d'autres tensioactifs pourrait être intéressante et

notamment dans la gamme des esters de saccharose qui, sous forme de mélange, permettent d'obtenir une gamme variée de HLB. En outre, dans ces travaux, nous nous sommes intéressés aux macroémulsions eau-dans-huile, or la littérature recense plus d'articles concernant les microémulsions et émulsions multiples. Ces deux types d'émulsion pourraient être une réponse aux problèmes rencontrés notamment à l'instabilité accrue de nos émulsions. Cependant, d'autres limites apparaissent comme l'utilisation en grande quantité de tensioactif pour les microémulsions (supérieure à 50%, *Chan et al., 2007*) ce qui peut entraîner des effets indésirables et la nécessité d'une étape supplémentaire dans le processus de fabrication des émulsions multiples (comme expliqué dans le paragraphe II.2.). Concernant le procédé d'émulsification, il était limité à l'utilisation d'un rotor-stator ou d'une hélice dilacératrice. Or la société Emulsar possède un savoir-faire particulier dans l'émulsification membranaire qui permettrait d'obtenir des particules dispersées plus fines ce qui pourrait améliorer la stabilité des émulsions et qui permettrait une incorporation de l'anticorps actif sans l'endommager. Cette piste de développement est en cours de réalisation.

Enfin, compte tenu de la phase précoce de recherche, les émulsions présentées dans ce rapport ne contenaient pas de principe actif dans leur phase interne. Cependant, il est important de prendre en compte le plus tôt possible l'éventuelle influence du principe actif sur la forme finale. En effet, des interactions entre les excipients et le principe actif peuvent se produire et influencer la stabilité des gouttes des émulsions (*Muschiolik et al., 2006*).

Conclusion générale

L'incidence de la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age ne cesse d'augmenter du fait du vieillissement de la population. Cette pathologie touche 1 personne sur 10 de plus de 80 ans et elle est devenue, en quelques années, un problème de santé publique. La DMLA exsudative est caractérisée par une croissance anormale de vaisseaux sanguins au niveau de la macula. De sévères complications peuvent apparaître avec notamment une cécité de la vision centrale si une prise en charge thérapeutique n'est pas mise en place rapidement après le diagnostic.

Dans ce contexte, l'arsenal thérapeutique s'est considérablement développé au cours des dernières décennies. Dans les années 80, seule la photocoagulation laser permettait de limiter l'impact de la maladie en détruisant, non spécifiquement, les néovaisseaux anormaux qui caractérisent la DMLA exsudative. Ensuite en 2000, la photothérapie dynamique a fait son apparition, ce qui a permis de viser plus spécifiquement la cible et de traiter un plus grand nombre de patients. Enfin, en 2006 une nouvelle classe thérapeutique est apparue, celle des molécules anti-angiogéniques. Elles ciblent et inactivent le VEGF, un des médiateurs de la néovascularisation. Ainsi les dernières molécules mises sur le marché permettent, non seulement de maintenir l'acuité visuelle des patients traités mais surtout de l'améliorer. Les traitements disponibles sont utilisés seuls ou en association afin d'assurer une efficacité dans le temps.

Pour agir, ces nouvelles molécules doivent atteindre leur cible, les néovaisseaux choroïdiens, dans le segment postérieur de l'œil. Cela est possible grâce à une administration intravitréenne mensuelle, au moins en début de prise en charge. Ces injections fréquentes sont contraignantes ce qui peut, à termes, entraîner un manque d'observance des patients vis-à-vis du traitement avec un risque de complications. Un des moyens de diminuer la fréquence des injections et les effets indésirables qui en découlent (décollement rétinien, endophtalmie, hémorragie...) est de présenter les molécules sous une forme pharmaceutique à libération prolongée. Ainsi, la substance active anti-angiogénique pourra être libérée au niveau de la cible pendant plusieurs mois ce qui diminuera la fréquence des injections. Pour illustrer les nombreux travaux de recherche dans ce domaine de la formulation galénique, une étude personnelle portant sur la conception d'émulsions inverses eau-dans-huile à libération prolongée a été présentée. A partir d'un screening d'une dizaine de tensioactifs, trois d'entre eux ont été retenus pour des études plus approfondies de stabilité dans le temps, de cinétique de libération de la phase interne et de seringabilité. Ces travaux préliminaires ont permis de mettre en évidence des difficultés de formulation (importante viscosité, instabilité) qui devront être étudiées.

L'émergence de nouvelles molécules thérapeutiques est inévitablement liée à la recherche de systèmes innovants pour administration intraoculaire afin de lutter contre la DMLA exsudative. Leurs objectifs sont d'assurer une action efficace de façon prolongée, une administration moins invasive et une sécurité renforcée. A terme, le challenge dans le domaine de l'ophtalmologie est de pouvoir proposer aux patients des systèmes de délivrance non invasifs et en auto-administration au niveau du segment postérieur de l'œil.

Références bibliographiques

ADAMIS AP, SHIMA DT, TOLENTINO MJ *et al.*, Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia associated iris neovascularization in a nonhuman primate, *Archives of Ophthalmology*, 1996, **114** (1), 66-71.

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité SANitaire des Produits de Santé (actuelle ANSM), Bonnes Pratiques d'injection intravitréenne, Mise au point Janvier 2011.

ALIKMETS R, SINGH N, SUN H *et al.*, A photoreceptor cell-specific Ath-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy, *Nature Genetics*, 1997, **124**, 331-43.

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé, Traitements de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, 2001

Disponible sur : <http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/DMLA.rap.pdf>.
Consulté le 27/08/13.

ANSM¹ : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, Point d'information sur l'utilisation hors AMM d'Avastin, Septembre 2009, [En ligne]

Disponible sur : <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Utilisation-hors-AMM-d-Avastin-R-Point-d-information>. Consulté le 13/09/13.

ANSM², Analyse des ventes de médicaments en France en 2012, juillet 2013 [pdf en ligne]
Disponible sur : ansm.sante.fr. Consulté le 05/09/13.

AREDS : Age-Related Eye Disease Study Research Group, A randomised, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss : AREDS report no. 8., *Archives of Ophthalmology*, 2001, **119** (10), 1417-36.

AREDS 2, Lutein_Zeaxanthin and Omega-3 Fatty Acids for Age-Related Macular Degeneration, The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS 2) Randomized Clinical Trial, *The Journal of the American Medical Association*, 2013, **309** (19), 2005-15.

AUCOUTURIER J, DUPUIS L, DEVILLE S *et al.*, Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines, *Expert Review of Vaccines*, 2002, **1** (1), 111.

AUGOOD CA, VINGERLING JR, DE JONG PT *et al.*, Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE), *Archives of Ophthalmology*, 2006, **124** (4), 529-35.

BAIRD PN, GUIDA E, CHU DT *et al.*, The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2004, **45** (5), 1311-5.

BANCROFT WD, The Theory of Emulsification, *J. Phys. Chem.*, 1913, **17** (6), 501-19.

BAREL AO, PAYE M, MAIBACH HI, Handbook of Cosmetic Science and Technology, Marcel Dekker, Inc, New York-Basel, 2001, 1ère édition, 886 pages.

BECHER P, Emulsions: theory and practice, Volume 162, Edition 2, Krieger Publishing Company, 1977, 452 pages.

BEHAR-COHEN F, Vectorisation intra-oculaire, *Medecine/Sciences*, 2004, **20** (6-7), 701-6.

BENICHOU A, ASERIN A, GARTI N, Polyols, high pressure, and refractive indices equalization for improved stability of W/O emulsions for food applications, *J. Disper. Sci. Technol.*, 2001, **22** (2-3), 268-80.

BERDUGO POLAK M et BEHAR-COHEN F, Exudative age-related macular degeneration: efficacy and limits of the different treatments, *Journal Français D'Ophtalmologie*, 2008, **31** (5), 537-56.

BHISITKUL RB, Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments, *British Journal of Ophthalmology*, 2006, **90** (12), 1542-7.

BISHOP PN, Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel, *Progress in Retinal and Eye Research*, 2000, **19** (3), 323-44.

BOMBELI T, How to make Water-in-Oil (W/O) emulsions, Somerset Cosmetic Company [En ligne]
Disponible sur : www.makingcosmetics.com. Consulté le 14/04/13.

BOURGES JL, BLOQUEL C, THOMAS A *et al.*, Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, **58** (11), 1182-202.

BROWN DM, MICHELS M, KAISER PK *et al.*, Ranibizumab versus Verteporfin Photodynamic Therapy for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Two-Year Results of the ANCHOR Study, *Ophthalmology*, 2009, **116** (1), 57-65.

BROWNING DJ, KAISER PK, ROSENFELD PJ, STEWART MW, Aflibercept for age-related macular degeneration: a game-changer or quiet addition?, *American Journal of Ophthalmology*, 2012, **154** (2), 222-6.

BUCH H, VINDING T, LA COUR M *et al.*, Risk factors for age-related maculopathy in a 14-year follow-up study : the Copenhagen City Eye Study, *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 2005, **83** (4), 409-18.

BURCKBUCHLER V, MEKHLLOUFI G, PAILLARD GITEAU A *et al.*, Rheological and syringeability properties of highly concentrated human polyclonal immunoglobulin solutions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010, **76**, 351-6.

CHAI NE G et ROHART C, Épidémiologie et facteurs de risque de la DMLA, *Journal Français D'Ophthalmologie*, 2007, **30**, Hors-série 1, Masson, Paris.

CHAKRAVARTHY U, ADAMIS AP, CUNNINGHAM ET Jr *et al.*, VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (VISION) Clinical Trial Group; Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration, *Ophthalmology*, 2006, **113** (9), 1508 e1-25.

CHAKRAVARTHY U, AUGOOD C, BENTHAM GC *et al.*, Cigarette smoking and age-related macular degeneration in the EUREYE Study, *Ophthalmology*, 2007, **114** (6), 1157-63.

CHAN J, EL MAGHRABY GMM, CRAIG JP, ALANY RG, Phase transition water-in-oil microemulsions as ocular drug delivery systems : In vitro and in vivo evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, **328** (1), 65-71.

CHEN E, BROWN DM, WONG TP *et al.*, Lucentis using Visudyne study: determining the threshold-dose fluence of verteporfin photodynamic therapy combined with intravitreal ranibizumab for exudative macular degeneration, *Clinical Ophthalmology*, 2010, **4**, 1073-9.

Chirurgie-de-la-rétine-médisud, Cliché d'une angiographie DMLA [En ligne]
Disponible sur : <http://www.chirurgie-de-la-retine-medisud.com/dmla/>.
Consulté le 20/09/13.

CHO E, HUNG S, WILLETT WC *et al.*, Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, **73**, 209-18.

CHU Lyon, cliché OCT œil atteint de DMLA [En ligne]
Disponible sur <http://www.chu-lyon.fr/web/3609>. Consulté le 30/09/13.

CHUA B, FLOOD V, ROCHTCHINA E *et al.*, Dietary fatty acids and the 5-year incidence of age-related maculopathy, *Archives of Ophthalmology*, 2006, **124**, 981-6.

CLEMONS TE, MILTON RC, KLEIN R *et al.*, Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19, *Ophthalmology*, 2005, **112**, 533-9.

Clinical trials.gov¹, Reduced Fluence Visudyne-Anti-VEGF-Dexamethasone In Combination for AMD Lesions (RADICAL), mise à jour 31/05/11 [En ligne]
Disponible sur : <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00492284>. Consulté le 11/09/13.

Clinical trials.gov², A Study Using Intravitreal Injections of a Small Interfering RNA in Patients With Age-Related Macular Degeneration, mise à jour 09/11/11 [En ligne]
Disponible sur : <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00395057?term=Sirna-027&rank=2>. Consulté le 09/10/13.

CNIB : Canadian National Institute for the Blind [En ligne]
Disponible sur : <http://www.cnib.ca/fr/vos-yeux/maladies-oculaires/dmla/diagnostiquer/symptomes-dmla/Pages/default.aspx>
Consulté le 13/05/13.

Communiqué de la Direction Générale de la Santé sur l'utilisation de la spécialité Avastin® par voie intra oculaire, 2012
Disponible sur : <http://www.sante.gouv.fr/point-sur-l-utilisation-de-la-specialite-avastin-r-par-voie-intra-oculaire.html>
Consulté le 09/09/13.

COSCAS F, COSCAS G, ZERBIB J *et al.*, OCT en face et DMLA exsudative, *Réalités ophtalmologiques*, 2013, **199**, Cahier 1.

COSCAS G, COSCAS F, ZOURDANI A, SOUBRANE G, Tomographie par cohérence optique et DMLA, *Journal Français D'Ophthalmologie*, 2004, **27** (9-C2), 7-30.

COSTA RA, JORGE R, CALUCCI D *et al.*, Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization caused by AMD (IbeNA Study): results of a phase I dose-escalation study, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, **47** (10), 4569-78.

CRUICKSHANKS KJ, KLEIN R, KLEIN BE *et al.*, Sunlight and age-related macular degeneration the Beaver Dam Eye Study, *Archives of Ophthalmology*, 1993, **111**, 514-8.

CSOKA G, MARTON S, ZELKO R *et al.*, Application of sucrose fatty acid esters in transdermal therapeutic systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, **65** (2), 233-7.

DALKARA D, KOLSTAD KD, CAPORAL N *et al.*, Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous, *Molecular Therapy*, 2009, **17** (12), 2096-102.

DEL COURT C, Rapport sur la DMLA de la Société Française d'Ophthalmologie, 2007.

DEL COURT C, DIAZ JL, PONTON-SANCHEZ A *et al.*, Smoking and age-related macular degeneration. The POLA study. Pathologies Oculaires Liées à l'Age, *Archives of Ophthalmology*, 1998, **116** (8), 1031-5.

DEL COURT C, LACROUX A, CARRIERE I, The three-year incidence of age-related macular degeneration : the « Pathologies Oculaires Liées à l'Age » (POLA) prospective study, *American Journal of Ophthalmology*, 2005, **140** (5), 924-6.

DEL COURT C, CARRIERE I, DELAGE M *et al.*, Plasma Lutein and Zeaxanthin and Other Carotenoids as Modifiable Risk Factors for Age-Related Maculopathy and Cataract: The POLA Study, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, **47** (6), 2329-35.

DEL COURT C, CARRIERE I, CRISTOL JP *et al.*, Dietary fat and the risk of age-related maculopathy: the POLANUT study, *European Journal of Clinical Nutrition*, 2007, **61** (11), 1341-4.

DESMETTRE T, Paroles d'experts, Interview du Pr A Jousseen, Service d'Ophthalmologie, Hôpital de la Charité, Berlin (Allemagne), *Réalités ophtalmologiques*, 2013, **204**, Cahier 1.

Dr Leininger, Représentation schématique de l'œil [En ligne]

Disponible sur : <http://dr-leininger.fr/oeil-et-la-vision/anatomie-de-oeil>. Consulté le 04/09/13.

EDQM: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, [En ligne] online.edqm.eu, Monographies de Saccharose (Monopalmitate de) 07/2009:2319 et Saccharose (stéarate de) 07/2009:2318, *Pharmacopée Européenne*, 7ème édition, 2013, 3094-6.

EMA¹: European Medicines Agency, Résumé des caractéristiques du produit, Macugen[®], mise à jour 12/08/2013 [En ligne]

Disponible sur :

http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR__Product_Information/human/000620/WC500026214.pdf

Consulté le 04/09/13.

EMA²: European Medicines Agency, Résumé des caractéristiques du produit, Eylea[®], mise à jour 04/09/2013 [En ligne]

Disponible sur :

http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR__Product_Information/human/002392/WC500135815.pdf.

Consulté le 10/09/13.

FAJNKUCHEN F et COHEN SY, Age-related macular degeneration and antivascular endothelial growth factor: a review, *Journal Français D'Ophthalmologie*, 2008, **31** (1), 94-110.

FATTAL E et BOCHOT A, Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, **58** (11), 1203-23.

FDA: Food and Drug Administration, Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products [En ligne]

Disponible sur : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/IIG/gettigWEB.cfm>. Consulté le 16/04/13.

FENDLER JH, Atomic and molecular clusters in membrane mimetic chemistry, *Chemical Review*, 1987, **87** (5), 877-99.

FERRARA N, DAMICO L, SHAMS N *et al.*, Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration, *Retina*, 2006, **26** (8), 859-70.

- FRANÇAIS C, COLASSE-MARTHELOT V, WEBER M, Dégénérescence maculaire liée à L'âge, *Réalités Ophthalmologiques*, 2006, **127**, 7-10.
- FRIBERG SE, Book reviews, *Langmuir*, 4 (2), 1988, 487. Phenomena in Mixed Surfactant Systems. John F. Scamehorn, Editor. ACS Symposium Series 311; American Chemical Society: Washington, DC, 1986.
- FRIEDMAN DS, O'COLMAIN BJ, MUÑOZ B et al., Prevalence of age-related macular degeneration in the United States, *Archives of Ophthalmology*, 2004, **122** (4), 564-72.
- FRITSCHÉ LG, CHEN W, SCHU M *et al.*, Seven new loci associated with age-related macular degeneration, *Nature Genetics*, 2013, **45**, 433-9.
- Genentech, Genentech and Novartis Ophthalmics Announce Development and Commercialization Agreement for Age-Related Macular Degeneration Treatment, Lucentis, 2003 [En ligne]
 Disponible sur : <http://www.gene.com/media/press-releases/6327/2003-06-24/genentech-and-novartis-ophthalmics-annou>
 Consulté le 02/10/13.
- GILLIES MC, What we don't know about avastin might hurt us, *Archives of Ophthalmology*, 2006, **124** (10), 1478-9.
- GONZALES CR, V. I. S. I. O. N. Clinical Trial Group. Enhanced efficacy associated with early treatment of neovascular age-related macular degeneration with pegaptanib sodium: an exploratory analysis, *Retina*, 2005, **25** (7), 815-27.
- GRAGOUDAS ES, ADAMIS AP, CUNNINGHAM ET Jr *et al.*, VISION Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration, *The New England Journal of Medicine*, 2004, **351**, 2805-16.
- GRIFFIN WC, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1949, **1**, 311-26.
- GROSSIORD JL, Etude quantitative du comportement et de l'évolution des dispersions, Cours Master 2 Pharmacotechnie et Biopharmacie, Paris Sud, 2012.
- HARRY RG and WILKINSON JB, Harry's cosmetology, 6ème édition, Leonard Hill Books, Londres, 1973, 824 pages.
- HAS, Haute Autorité de Santé, Recommandations des bonnes pratiques, Fiche diagnostique, Fiche thérapeutique, Fiche d'information à donner au patient, mise à jour en février 2013 [En ligne]
 Disponible sur : http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1051619/fr/degenerescence-maculaire-lee-a-lage-prise-en-charge-diagnostique-et-therapeutique. Consulté le 01/09/13.
- HEIER JS, BROWN DM, CHONG V *et al.*, VIEW 1 and VIEW 2 Study Groups, Intravitreal Aflibercept (VEGF Trap-Eye) in Wet Age-related Macular Degeneration, *Ophthalmology*, 2012, **119** (12), 2537-48.
- HEUBERGER RA, MARES-PERLMAN JA, KLEIN R *et al.*, Relationship of dietary fat to age-related maculopathy in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, *Archives of Ophthalmology*, 2001, **119**, 1833-8.
- HSU J, Drug delivery methods for posterior segment disease, *Current Opinion in Ophthalmology*, 2007, **18** (3), 235-9.
- INSEE : Institut National de la Statistique et des Études Économiques, 2005.
- JACKSON TL, ANTCLIFF RJ, HILLENKAMP J, MARSHALL J, Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2003, **44** (5), 2141-6.
- Journées Nationales d'information et de dépistage de la DMLA [En ligne]
 Disponible sur : <http://www.journees-dmla.fr/>, Consulté le 14/09/13.
- KAISER PK, Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases, *American Journal of Ophthalmology*, 2006, **142** (4), 660-8.
- KAISER PK, BOYER DS, CRUESS AF *et al.*, Verteporfin plus Ranibizumab for Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration, Twelve-Month Results of the DENALI Study, *Ophthalmology*, 2012, **119**, 1001-10.
- KHAN JC, SHAHID H, ATHURLBY D *et al.*, Age related macular degeneration and sun exposure, iris colour, and skin sensitivity to sunlight, *British Journal of Ophthalmology*, 2006, **90**, 29-32.
- KLEIN K, Formulating Water-in-Oil Emulsions: A Scary Endeavor, *Cosmetics & Toiletries*, 2003, **24**.
- KLEIN R, KLEIN BE, JENSEN SC *et al.*, Age-related maculopathy in a multiracial United States population : the National Health and Nutrition Examination Survey III, *Ophthalmology*, 1999, **106**, 1056-65.

KLEIN R, KLEIN BE, TOMANY SC *et al.*, The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study, *Ophthalmology*, 2003, **110** (6), 1273-80.

KODJIKIAN L, La dégénérescence maculaire liée à l'âge, Actualité Claude Bernard, Ophtalmologie, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon [En ligne]

Disponible sur : http://spiral.univ-lyon1.fr/files_m/M5982/Files/554254_1651.pdf. Consulté le 28/08/13.

KOURLAS H, SCHILLER DS, Pegaptanib sodium for the treatment of neovascular age-related macular degeneration: a review, *Clinical Therapeutics*, 2006, **28** (1), 36-44.

KUNO N, FUJII S, Recent Advances in Ocular Drug Delivery Systems, *Polymers*, 2011, **3** (1), 193-221.

LAGANOVSKA G, LOEWENSTEIN A, VANAGS J *et al.*, First-in-Human Results of a Refillable Drug delivery Implant Providing Release of Ranibizumab in patients with Neovascular AMD, 2011, Annual Meeting of the American Academy of Ophthalmology.

LALLEMAND F, GARRIGUE JS, A water-in-oil type emulsion for treating a disease of the eye, EP 2 425 814 A1, Mars 2012.

LARSEN M, SCHMIDT-ERFURTH U, LANZETTA P *et al.*, Verteporfin plus Ranibizumab for Choroidal Neovascularization in Age-related Macular Degeneration, Twelve-month MONT BLANC Study Results, *Ophthalmology*, 2012, **119**, 992-1000.

LAUDE A, TAN LE, WILSON CG *et al.*, Intravitreal therapy for neovascular age-related macular degeneration and inter-individual variations in vitreous pharmacokinetics, *Progress in Retinal and Eye Research*, 2010, **29** (6), 466-75.

LEE PP, FELDMAN ZW, OSTERMANN J *et al.*, Longitudinal prevalence of major eye diseases, *Archives of Ophthalmology*, 2003, **121** (9), 1303-10.

Legifrance.gouv, Arrêté du 26 novembre 2007 modifiant la liste des spécialités pharmaceutiques remboursables aux assurés sociaux

Disponible sur :

<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000017572742&dateTexte=&categorieLien=id>

Consulté le 05/10/13.

LEVEZIEL N, DELCOURT C, ZERBIB J *et al.*, Épidémiologie de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, *Journal Français D'Ophthalmologie*, 2009, **32** (6), 440-51.

Lucentis.com, Ranibizumab injection par Genentech [En ligne]

Disponible sur : <http://www.lucetis.com/hcp/amd/efficacy-amd.html>. Consulté le 10/09/13.

Macugen, Patient Information [En ligne]

Disponible sur : <http://www.macugen.com/Portals/80/pdfs/PI.pdf>. Consulté le 04/09/13.

Medscape, DMLA : entre Avastin et Lucentis, seul le prix fait LA différence, par Aude Lecrubier, Mai 2013 [En ligne]

Disponible sur : <http://www.medscape.fr/neurologie/articles/1540297/2/>. Consulté le 26/09/13.

MITCHELL EP, Targeted Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: Role of Aflibercept, *Clinical Colorectal Cancer*, 2013, **12**(2), 73-85.

MITCHELL P, WANG JJ, SMITH W *et al.*, Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study, *Archives of Ophthalmology*, 2002, **120** (10), 1357-63.

MITCHELL P, KOROBNELNIK JF, LANZETTA P *et al.*, Ranibizumab (Lucentis) in neovascular age-related macular degeneration: evidence from clinical trials, *British Journal of Ophthalmology*, 2010, **94** (1), 2-13.

MÖBIUS D, MILLER R, FAINERMAN VB, Surfactants: Chemistry, Interfacial Properties, Applications, Elsevier Sciences BV, 2001, 661 pages.

MORDENTI J, CUTHBERTSON RA, FERRARA N *et al.*, Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration, *Toxicologic Pathology*, 1999, **27** (5), 536-44.

MULLER-GOYMANN CC, Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, **58** (2), 343.

MUSCHIOLIK G, SCHERZE I, PREISSLER P *et al.*, Multiple Emulsions - Preparation and Stability, IUFoST World Congress, 13th World Congress of Food Science & Technology, 2006.

NG EW and ADAMIS AP, Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration, *Canadian Journal of Ophthalmology*, 2005, **40** (3), 352-68.

NGUYEN QD, CAMPOCHIARO PA, SHAH SM *et al.*, Clear-It 1 Investigators. Evaluation of very high- and very low-dose intravitreal aflibercept in patients with neovascular age-related macular degeneration, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2012, **28** (6), 581-8.

oct-optovue, cliché fond d'œil, Dr Jean-Michel Muratet, 2008-2012 [En ligne]
Disponible sur : <http://www.oct-optovue.com/oct-retina/oct-retina.html>. Consulté le 12/09/13.

OPAWALE FO and BURGESS DJ, Influence of Interfacial Properties of Lipophilic Surfactants on Water-in-oil Emulsion Stability, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998, **197** (1), 142-50.

Ophthotech, laboratoire développant le produit Fovista™ [En ligne]
Disponible sur : http://www.ophthotech.com/wp-content/uploads/Fovista_Fact_Sheet.pdf. Consulté le 15/10/13.

PELTONEN L, HIRVONEN J and YLIRUUSI J, The Effect of Temperature on Sorbitan Surfactant Monolayers, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, **239** (1), 134-8.

PENG LC, LIU CH, KWAN CC, HUANG KF, Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2010, **370** (1-3), 136-42.

Pharma.novartis, Grille d'Amsler [En ligne]
Disponible sur : http://www.pharma.novartis.fr/pdf/grille_amsler_fr.pdf. Consulté le 03/09/13.

PIGUET B, WELLS JA, PALMVAN IB *et al.*, Age-related Bruch's membrane change: a clinical study of the relative role of heredity and environment, *British Journal of Ophthalmology*, 1993, **77**, 400-3.

PORRAS M, SOLANS C, GONZALEZ C and GUTIERREZ JM, Properties of water-in-oil (W/O) nano-emulsions prepared by a low-energy emulsification method, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2008, **324** (1-3), 181-8.

PRAJAPATI HN, DALRYMPLE DM, SERAJUDDIN ATM, A Comparative Evaluation of Mono-, Di- and Triglyceride of Medium Chain Fatty Acids by Lipid/Surfactant/Water Phase Diagram, Solubility Determination and Dispersion Testing for Application in Pharmaceutical Dosage Form Development, *Pharm. Res*, 2012, **29**, 285-305.

Quinze-vingts, Centre hospitalier National d'Ophthalmologie, mise à jour en Août 2012 [En ligne]
Disponible sur : http://www.quinze-vingts.fr/maladies_de_l_oeil/dmla/traitement. Consulté le 07/09/13.

REICH SJ, FOSNOT J, KUROKI A *et al.*, Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model, *Molecular Vision*, 2003, **9**, 210-6.

RIGAUDIERE F, L'épithélium pigmentaire : quelques aspects fonctionnels, Oeil et physiologie de la vision, La physiologie rétinienne, mis à jour le 18/06/2013 [En ligne]
Disponible sur : <http://odel.irevues.inist.fr/oeilephysiologiedelavision/index.php?id=220>. Consulté le 04/09/13.

ROSEN JM, Surfactants and Interfacial Phenomena, Second edition, Wiley J & Sons, Inc., New York, 1989, 431 pages.

ROSENFELD PJ, BROWN DM, HEIER JS *et al.*, MARINA Study Group, Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration, *The New England Journal of Medicine*, 2006, **355** (14), 1419-31.

SALAGER JL, ANTON R, ANDEREZ JM, AUBRY JM, Formulation des microémulsions par la method du HLD, *Techniques de l'Ingénieur*, 2001, référence J2157.

SATO T, IIDA T, HAGIMURA N *et al.*, Correlation of optical coherence tomography with angiography in retinal pigment epithelial detachment associated with age-related macular degeneration, *Retina*, 2004, **24** (6), 910-4.

SCHICK MJ, Non-ionic surfactants: physical chemistry, Marcel Dekker, Inc, New York and Basel, 1987, 1135 pages.

SCHMIDT-ERFURTH U and HASAN T, Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration, *Survey of Ophthalmology*, 2000, **45** (3), 195-214.

SCHMIDTS T, DOBLER, D, NISSING C, RUNKEL F, Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, **338** (1), 184-92.

SCHMUCKER C, LOKE YK, EHLKEN C *et al.*, Intravitreal bevacizumab (Avastin) versus ranibizumab (Lucentis) for the treatment of age-related macular degeneration: a safety review, *British Journal of Ophthalmology*, 2011, **95** (1), 308-17.

SCHOLL HP, FLECKENSTEIN M, CHARBEL ISSA P *et al.*, An update on the genetics of age-related macular degeneration, *Molecular Vision*, 2007, **13**, 196-205.

Science of AMD [En ligne]

Disponible sur : <http://www.scienceofamd.org/fr/learn/>, Consulté le 02/09/13.

SEDDON JM, SAMELSON U, PAGE WF *et al.*, Twin study of macular degeneration: methodology and application to genetic epidemiologic studies, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1996a, **38**, p676.

SEDDON JM, WILLETT WC, SPEIZER FE *et al.*, A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women, *The Journal of the American Medical Association*, 1996b, **276** (14), 1141-6.

SEDDON JM, COTE J, DAVIS N, ROSNER B, Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio, *Archives of Ophthalmology*, 2003, **121**, 785-92.

SEDDON JM, GEORGE S, ROSNER B, Cigarette smoking, fish consumption, omega-3 fatty acid intake, and associations with age-related macular degeneration: the US Twin Study of Age-Related Macular Degeneration, *Archives of Ophthalmology*, 2006, **124**, 995-1001.

SEDDON JM, Multivitamin multimineral supplements and eye disease, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2007, **85**, 304-7.

Service Universitaire d'Ophthalmologie, Centre hospitalier intercommunal de Créteil [En ligne] Disponible sur : <http://www.creteilophthalmo.fr/dmla/>. Consulté le 03/09/13.

SFO : Société Française d'Ophthalmologie, Résultats de l'Etude française GEFAL et des études internationales comparant AVASTIN vs LUCENTIS dans la DMLA exsudative, présenté par le Pr Kodjikian en mai 2013 [En ligne]

Disponible sur : <http://www.sfo.asso.fr/actualites/test-actualit%C3%A9-presse>. Consulté le 26/09/13.

SHAHAR J, AVERY RL, HEILWEIL G *et al.*, Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin), *Retina*, 2006, **26** (3), 262-9.

SINGH V and KUMAR SLH, Nanoemulsification - a novel targeted drug delivery tool, *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 2012, **2** (4), 40-5.

SISTERNA¹, Dispersion and Dissolution of Sisterna Sucroses Esters, 1996.

SISTERNA², Technical service, TDD 73006-10/14.

SMG : Syndicat de la médecine Générale, Lettre ouverte à madame la Ministre de la santé, Marisol Touraine, juin 2013, [En ligne]

Disponible sur : <http://www.smg-pratiques.info/AVASTIN-LUCENTIS-lettre-ouverte-a.html>. Consulté le 20/09/13.

SMITH W, ASSINK J, KLEIN R *et al.*, Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents, *Ophthalmology*, 2001, **108**, 697-704.

SOUBRANE G, KUHN D, OUBRAHAM H *et al.*, Photodynamic therapy, *Journal Français D'Ophthalmologie*, 2002, **25**, 753-5.

SOUBRANE G, COSCAS G, SOUIED E, Les DMLAs, Société Française d'Ophthalmologie, Elsevier Masson, 2007, 637 pages.

SOUIED EH, BENLIAN P, AMOUYEL P *et al.*, The E4 allele of apolipoprotein gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration, *American Journal of Ophthalmology*, 1998, **125** (3), 353-9.

SOUIED E, LE TIEN V, COSCAS G, SOUBRANE G, Vers la prévention de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, *Journal Français D'Ophthalmologie*, 2007, **30** (5), 449-55.

SOUIED EH, DELCOURT C, QUERQUES G *et al.*, Oral Docosahexaenoic Acid in the Prevention of Exudative Age-Related Macular Degeneration The Nutritional AMD Treatment 2 Study, *Ophthalmology*, 2013, **120** (8), 1619-31.

SPAIDE RF, LAUD K, FINE HF *et al.*, Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration, *Retina*, 2006, **26** (4), 383-90.

STEINBROOK R, The Price of Sight — Ranibizumab, Bevacizumab, and the Treatment of Macular Degeneration, *The New England Journal of Medicine*, 2006, **355**, 1409-12.

- STEWART MW, GRIPPON S, KIRKPATRICK P, Aflibercept, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012, **11** (4), 269-70.
- SUI GY, LIU GC, LIU GY *et al.*, Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis, *British Journal of Ophthalmology*, 2013, **97**, 389-94.
- TAYLOR P, Ostwald ripening in emulsions, *Advances in Colloid and Interface Science*, 1998, **75** (2), 107-63.
- The HLB system a time-saving guide to emulsifier selection*, ICI America Inc., Wilmington, DE 1976, USA.
- THOMAS M, MOUSA SS, MOUSA SA, Comparative effectiveness of aflibercept for the treatment of patients with neovascular age-related macular degeneration, *Clinical Ophthalmology*, 2013, **7**, 495-501.
- UMVF : Université médicale virtuelle francophone, cours d'ophtalmologie [En ligne]
Disponible sur : <http://umvf.univ-nantes.fr/ophtalmologie/enseignement/ophtalmo5/site/html>. Consulté le 15/09/13.
- URTTI A, Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery, *Advance Drug Delivery Review*, 2006, **58**(11), 1131-5.
- VAN KERCKOVEN W, LAFAUT B, FOLLENS I, DE LAEY JJ, Features of age-related macular degeneration on optical coherence tomography, *Bulletin de la Société Belge d'Ophtalmologie*, 2001, **281**, 75-84.
- VAN WIJNGAARDEN P, COSTER DJ et WILLIAMS KA, Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems, *The Journal of the American Medical Association*, 2005, **293** (12), 1509-13.
- Vidal¹, 2012, Monographie du Macugen, Pegaptanib de sodium, mise à jour le 23/08/12 [En ligne]
Disponible sur : <https://www-evidal-fr.docadis.ups-tlse.fr/showProduct.html?productId=74672#d35992e833>.
Consulté le 06/09/13.
- Vidal², 2012, Monographie de Eylea, Aflibercept [En ligne]
Disponible sur : <https://www-evidal-fr.docadis.ups-tlse.fr/showProduct.html?productId=124108>. Consulté le 10/09/13.
- Vidal³, 2013, Monographie du Lucentis, Ranibizumab, mise à jour le 18/07/13 [En ligne]
Disponible sur : <https://www-evidal-fr.docadis.ups-tlse.fr/showProduct.html?productId=77985#effet>. Consulté le 07/09/13.
- VIRTAMO J, PIETINEN P, HUTTUNEN JK *et al.*, ATBC Study Group. Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a post intervention follow-up, *The Journal of the American Medical Association*, 2003, **290** (4), 476-85.
- WANG J, JIANG A, JOSHI M AND CHRISTOFORIDIS J, Drug Delivery Implants in the Treatment of Vitreous Inflammation, *Mediators of Inflammation*, 2013, **2013** (2013), Article ID 780634, 8 pages.
- WHO: World Health Organization [En ligne]
Disponible sur : www.who.int/blindness/causes/priority/fr/index.html. Consulté le 24/04/13.
- WILLIAMS JM, High Internal Phase Water-in-Oil Emulsions: Influence of Surfactants and Cosurfactants on Emulsion Stability and Foam Quality, *Langmuir*, 1991, **7** (7), 1370-7.
- WILSON JMG et JUNGNER G, Principes et pratique du dépistage des maladies, *Cahier de santé publique n ° 34*, Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 1970.
- WOLF F, KOEHLER K, SCHUCHMANN HP, Stabilization of water droplets in oil with PGPR for use in oral and dermal applications, *Journal of Food Process Engineering*, 2013, **36** (3), 276-283.
- WORMALD R, EVANS J, SMEETH L, HENSHAW K, Photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration, *The Cochrane Database Systematic Reviews*, 2005, **19** (4), CD002030.
- WU H and CHEN TC, The effects of intravitreal ophthalmic medications on intraocular pressure, *Seminars in Ophthalmology*, 2009, **24** (2), 100-5.
- XU ZH, Analysis of factors related to age-related macular degeneration [MD thesis]. Changchun, Jilin, China: Ji Lin University, 2009.
- YANNUZZI LA, ROHRER KT, TINDEL LJ *et al.*, Fluorescein angiography complication survey, *Ophthalmology*, 1986, **93** (5), 611-7.
- YOUN HY, BANTSEEV V, BOLS NC *et al.*, *In vitro* assays for evaluating the ultraviolet B-induced damage in cultured human retinal pigment epithelial cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2007, **88**, 21-8.
- YOUN HY, MCCANNA DJ, SIVAK JG *et al.*, *In vitro* ultraviolet-induced damage in human corneal, lens, and retinal pigment epithelial cells, *Molecular Vision*, 2011, **17**, 237-46.

Annexes

Annexe 1

Echelle ETDRS

L'échelle ETDRS : la référence dans la mesure de l'acuité visuelle dans la DMLA

Les échelles ETDRS, au nombre de trois, ont été conçues il y a vingt ans et leur intérêt a été démontré pour la première fois au cours de l'étude « Early Treatment Diabetic Retinopathy Study », dont elles ont gardé le nom.

		
ETDRS R : réfraction	ETDRS 1 : œil droit	ETDRS 2 : œil gauche

L'échelle R sert à mesurer la réfraction du patient, l'échelle 1 à tester l'œil droit et l'échelle 2 l'œil gauche. Chaque échelle présente 14 lignes de 5 lettres chacune. Les lettres de chaque ligne sont plus hautes que celles de la ligne inférieure d'un coefficient constant (égal à 1,2589, racine cubique de 2). L'une des principales caractéristiques des échelles ETDRS découle de ce choix : une **baisse d'acuité visuelle de trois lignes** équivaut à un **doublage de l'angle visuel**, quelle que soit l'acuité visuelle d'origine.

Le côté gauche de chaque échelle indique pour chaque ligne l'acuité visuelle de Snellen correspondante. L'échelle utilisée (une seule à la fois) est installée sur une boîte lumineuse.

L'ETDRS en pratique :

- **La lumière est éteinte lors de l'utilisation des échelles ETDRS**

- **Le test démarre avec le patient situé à 4 m de l'échelle**

A cette distance, les niveaux d'acuité visuelle s'échelonnent entre 0,1 (1/10) et 2 (20/10).

L'acuité visuelle de Snellen est lue à gauche de la dernière ligne dont le patient a correctement identifié au moins 3 des 5 lettres.

On effectue une réfraction complète de la vision binoculaire avec l'échelle ETDRS R.

On affine d'abord la correction sphérique puis on la parfait grâce au cylindre croisé de Jackson.

- **Si l'acuité visuelle mesurée à 4 m est inférieure à 2/10, la mesure est effectuée de nouveau à 1 m sur les 6 premières lignes de l'échelle ETDRS.**

A 1 m, les niveaux d'acuité visuelle des 6 premières lignes s'échelonnent entre 1/40 et 1/12.

- **Chaque œil est testé séparément**

- **Le patient lit lentement, une lettre par seconde, en commençant par la première ligne en haut à gauche**

Il est activement encouragé à lire le plus de lettres possible, à ne pas hésiter à bouger la tête et à essayer de deviner lorsqu'il hésite. Lorsqu'une lettre est lue correctement, le praticien entoure cette lettre sur une feuille d'évaluation ayant une présentation identique à celle de l'échelle utilisée.

L'examineur ne corrige jamais les erreurs. Si le patient se reprend sur une lettre mal lue et donne une réponse correcte avant d'avoir lu la lettre suivante, la correction est acceptée.

- **Le score est constitué par le nombre de lettres correctement lues.**

Il est de 55 pour une acuité visuelle correspondant à 10/10 sans erreur de lecture.
Il peut également être calculé en unités LogMAR, chaque lettre correctement lue valant 0,02 et chaque ligne 0,1 unités LogMAR avec un score logMAR nul lorsque l'acuité visuelle est égale à 10/10..

• Lorsqu'on utilise à 2 m les échelles conçues pour 4 m, les résultats sont corrigés :

- on lit l'acuité visuelle Snellen à gauche, non pas de la dernière ligne correctement vue par le patient, mais de la ligne située 3 lignes plus bas
- on retire 15 (3 lignes) du score ETDRS constaté (lorsque le patient correctement lu plus de 15 lettres à 2 m)

Le principal intérêt des échelles ETDRS est la possibilité de mesurer un score d'acuité visuelle à la lettre près, particulièrement utile pour apprécier les gains ou les pertes d'acuité au cours des traitements des affections entraînant une basse vision.

Calcul du score :

A = nombre de lettres correctement lues à 4m

B = 0 si A < 20 ou =30 si A ≥ 20

C = nombre de lettres correctement lues à 1 m ou 0 si non testé.

Score ETDRS= A + B + C.

D'après les laboratoires Novartis, Dr Zanlonghi, 2002 et « Mesure d'acuité visuelle selon l'ETDRS en pratique » du Centre hospitalier des Quinze-vingt.

Annexe 2

Stratégie diagnostique

Stratégie diagnostique de la DMLA

Une pathologie maculaire et en particulier une DMLA doit être recherchée chez un sujet de plus de 50 ans devant l'apparition ou l'aggravation récente de l'un des symptômes suivants :

- baisse d'acuité visuelle ;
- métamorphopsies (grille d'Amsler) ;
- un ou plusieurs scotomes (tache sombre perçue par le patient) ;
- une diminution de la perception des contrastes ;
- une gêne en vision nocturne.

Adresser le patient à une consultation en ophtalmologie

- **Mesure de l'acuité visuelle de loin sous une semaine** réalisée avec correction d'un trouble éventuel de la réfraction, au mieux par l'échelle ETDRS ;
- Mesure de l'acuité visuelle de près par l'échelle de Parinaud.

L'examen du fond d'œil doit être effectué sous une semaine par un ophtalmologiste après dilatation pupillaire, en vision binoculaire pour orienter le diagnostic.

- Réaliser si possible des photographies du fond d'œil = documents d'archive et d'information pour les patients et les professionnels de santé.
- Préciser l'étendue des altérations et leur topographie par rapport au centre de la fovéa qui doivent être notées dans le dossier du patient.

Évoquer la DMLA exsudative en présence de l'un des éléments suivants :

- décollement séreux rétinien, épaissement rétinien ;
- lésion néovasculaire visible de couleur gris-verte ;
- décollement de l'épithélium pigmentaire ;
- hémorragie sous-rétinienne, exsudats rétinien, tissu glial.

L'OCT doit être réalisée :

- pour analyser, localiser et quantifier les phénomènes d'exsudation (œdèmes, décollement de l'épithélium pigmentaire, décollement séreux rétinien), les néovaisseaux visibles ;
- pour analyser les altérations du tissu rétinien ;
- avant d'envisager un traitement.

L'angiographie à la fluorescéine est indispensable pour :

- **confirmer le diagnostic, en affirmant la présence de néovaisseaux choroïdiens ;**
- faire le bilan des lésions :
 - type des néovaisseaux choroïdiens (occulte, visible),
 - leur topographie : leur taille et leur étendue ;
- éliminer les diagnostics différentiels.

Il est impératif de rechercher les allergies à la fluorescéine et les antécédents médicaux à l'interrogatoire (prise de bêtabloquants, antécédent cardiaque sévère par exemple).

Il est recommandé de se référer au site de l'Afssaps/ANSM pour les précautions d'emploi de la fluorescéine.

Un matériel de réanimation doit être disponible.

Le consentement éclairé du patient doit être recueilli.

L'angiographie en ICG est recommandée en cas :

- d'allergie à la fluorescéine ;
- de doute sur la présence de : néovaisseaux occultes, lésions polypoïdales, anastomoses chorio-rétiniennes.

Évoquer la DMLA atrophique en présence de :

- visibilité des gros vaisseaux choroïdiens ;
- zones pâles à bords bien définis.

L'OCT doit être réalisée en cas de suspicion de DMLA atrophique pure pour rechercher :

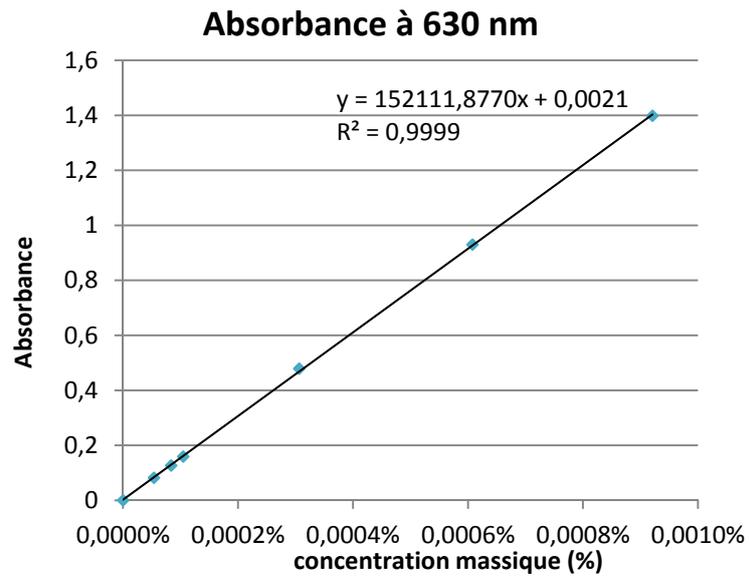
- un amincissement rétinien ;
- une disparition des photorécepteurs.

← En cas de doute sur la présence de néovaisseaux, envisager une angiographie à la fluorescéine

Informez le patient et lui proposez une stratégie thérapeutique. - **Informez le médecin traitant** (médecin généraliste, gériatre, gériatologue). Si les conditions le permettent et dans l'intérêt du patient, l'ensemble du bilan diagnostique et le traitement peuvent être réalisés le même jour.

Annexe 3

Courbe étalon de la concentration massique du colorant bleu E133 (%)
en fonction de l'absorbance à $\lambda_{\max}=630\text{nm}$.



Annexe 4

Gamme étalon du capteur pour les essais de seringabilité

Mesure n°	Masse (g)	Résistance (ohms)	Poids (N)	Pression (N/cm ²)
	0	199999,95		
1	300,5	11715,28	2,948	1,793
2	326,03	10700,51	3,198	1,945
3	368,36	10196,21	3,614	2,198
4	425,96	9649,5	4,179	2,542
5	464,89	8026,83	4,561	2,774
6	464,89	8367,78	4,561	2,774
7	603,5	7241,16	5,920	3,601
8	658,71	7068,25	6,462	3,931
9	761,6	6629,79	7,471	4,545
10	826,4	6247,6	8,107	4,931
11	850,1	6341,07	8,339	5,073
12	901,3	5937,84	8,842	5,378
13	1129,96	5185,64	11,085	6,743
14	1315,4	4853,13	12,904	7,849
15	1756	3946	17,226	10,478
16	2253,91	3419,19	22,111	13,449
17	2857,41	3302,25	28,031	17,051

Masse (en grammes) appliquée sur le capteur.

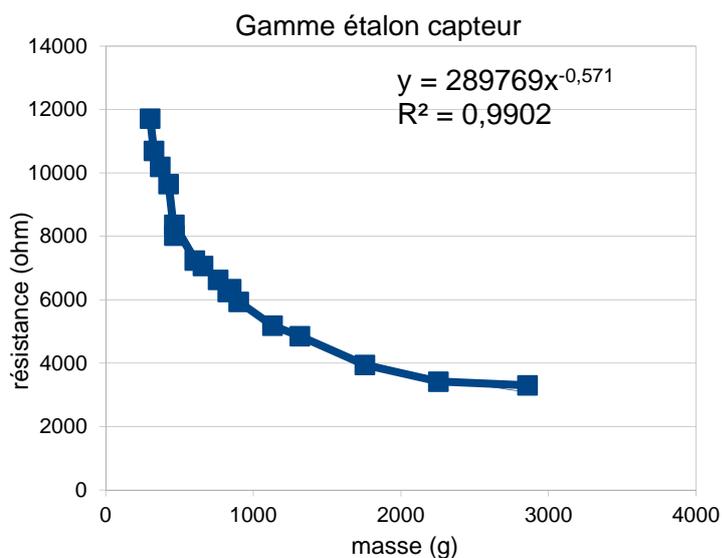
Mesure de la Résistance en Ohms.

$$Poids = \frac{masse \times g}{1000}$$

Poids en Newtons (N)

Masse en grammes/1000 → en kilogrammes

g accélération en m/s² ou en N/kg



Annexe 5

Démarche de formulation

PGPR	J022	J022	J022	J022	J024	J024	J024	J024	J024	J030	J030	J030
Emulsion	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
Phase aqueuse	50	50	50	50	10	10	10	50	50	50	50	50
Phase grasse	50	50	50	50	90	90	90	50	50	50	50	50
% TA total	1,6	1,4	1,2	1	1,08	0,45	0,27	3	1,2	2	2,5	3
Débit d'injection (mL/min)	18,2				12			18,2				
Protocole	8000 tours par minute											
Durée émulsification	8 minutes											
Température	< 20°C											

	Monooléate de sorbitan (1)			HLB 4,3									
Date	J063	J064	J065	J116	J067	J070	J071	J073	J073	J113	J114	J114	J114
Emulsion	E16	E17	E20	E44	E22	E23	E25	E27	E28	E40	E41	E42	E43
Phase aqueuse (%)	50	50	50	50	20	20	35	35	35	50	50	50	50
Phase grasse (%)	50	50	50	50	80	80	65	65	65	50	50	50	50
% TA total	10	10	10	10	2	5	8	6	6	10	5	5	5
Nature phases	NaCl/paraffine		NaCl/MCT	H ₂ O/MCT	NaCl/MCT			H ₂ O/MCT			H ₂ O/MCT	H ₂ O/Prop	H ₂ O/Myr
Protocole	9500 2min Chauffage 2 ph. À 75°C Manip à 60°C	8000 8min 20500 2min Chauffage 2 ph. À 75°C Manip à 60°C	13500 8min	13500 8min	8000 4min 13500 4min 20500 2min	8000 4min 9500 4min 13500 2min	8000 8min 5min 50°C 3min froid (40°C)	9500 8min 5min 65°C 3min froid (40°C)	9500 8min	8000 4min 13500 4min	8000 4min 13500 4min	8000 4min 13500 4min	8000 4min 13500 4min
Injection (mL/min)	bolus	16,7	15,2	15,2	6,6	6,6	8,75	8,4	8,4	15,2	14,5		
Durée (min)	2	10	8	8	10	10	16	16	8	8	8		
T°C	60	70 --> 50	63-54	68-50	45	62-46	50 --> 40	65 --> 40	19	<20	<20		
Démarche	ajout totalité phase aqueuse dans ph. grasse (Schmidts T et al, 2009)	introduction phase aqueuse dans un deuxième temps	remplacement paraffine par MCT	Comparaison NaCl/eau	influence quantité phase aqueuse	tentative amélioration stabilité /E22	test influence température	essai avec TA récent de grade pharmaceutique	test influence nature huile (diminution viscosité)				
Date	J120	J142	J143	J144	J144	J144	J151	J168	J169	J172	J172		
Emulsion	E50	E 69	E 70	E 71	E 72	E73	E74	E76	E77	E78	E79		
Phase aqueuse	50	65	65	65	70	70	50	50	50	50	50		
Phase grasse	50	35	35	35	30	30	50	50	50	50	50		
% TA total	10	13	13	8,75	6	6	5	1	2	3+3lécithine		3+3lécithine	
Nature phases	H ₂ O/MCT					H ₂ O/Myr	H ₂ O/myristate	H ₂ O/MCT	H ₂ O/MCT	H ₂ O/MCT	H ₂ O/MCT		
Protocole	procédé Emulsar	rotor-stator goutte à goutte 8000 8 min 13500 puis 20500	hélice goutte à goutte vitesse 5 à 8	goutte à goutte 8000 2min 9500 5min 13500 11 min 20500 4,30 min	8000 2min 9500 5 min 13500 10,30 min 20500 2,10 min	8000 2min 9500 5min 13500 16min 20500 1,30min	8000 12,5min 13500 gg	8000 4min 9500 gg	8000 2min 9500 gg	8000	8000		
Injection (mL/min)		1,1	1,1	1,1	1,6	1,1	1,4	1,9	1,72	1,13	1,88		
Durée (min)		28	28	22,3	19,4	25	23,5	27	15,5	24	14		
T°C	25	<20	<20	<20	<20	25	25-30	23,7	14,5	24-19	35		
Démarche	pas d'amélioration notable du point de vue de la taille de goutte par rapport au rotor-stator	comparaison rotor-stator/hélice	diminution quantité TA	augmentation quantité d'eau	changement huile pour diminuer viscosité	influence dispositif Goutte à goutte /E43	essai diminution Qtité TA	essai diminution Qtité TA	ajout lécithine pr augmenter Fluidité	chauffage lécithine 3h à 80°C (brevet 4,943,389)			

	Sorbitan Monooléate + POE Sorbitan Monooléate				Sorbitan Trioléate POE Sorb Monostéarate		Sorbitan Monostéarate POE Sorbitan Monostéarate
Emulsion	E18	E19	E21	E31	E26	E33	E34
Phase aqueuse	50	50	20	20	30	10	20
Phase grasse	50	50	80	80	70	90	80
% TA total	10	5	5	10	8	10	10
HLB mélange	11	6	6	6	2,02	2,02	6
Nature phases	NaCl/MCT			H2O/MCT	H2O/MCT	H2O	H2O/MCT
Protocole	8000 8 min	8000 8 min	9500 4min 20500 4min 35-45°C	9500 4min 68,3°C 13500 3min Froid fin 34°C	9500 4min 50°C 13500 3min froid (35°C)	9500 4min 45°C 13500 3min froid à 5min Fin 40°C	9500 3min 56°C 13500 5min Froid à 5min Fin 36°C
Débit injection (mL/min)	15,2	15,2	6,1	10	7,5	3	6
Durée (min)	8	8	8	7	7	8	8
T°C	30	20	35 --> 45	68 --> 34	49 -->35	45 --> 40	56 --> 36
Remarques	PEG Sorbitan Monooléate difficile à dissoudre dans phase aqueuse: 20 min d'agitation + bain-marie 35°C	inversion en H/E après injection d'environ 70% de la phase aqueuse totale	diminution proportion phase aqueuse /E19	amélioration stabilité / E21	PEG Sorbitan Monostéarate peu soluble dans l'eau sous agitation		Sorbitan Monostéarate sous forme de poudre se disperse très mal dans l'huile, Chauffage créé la formation d'un surnageant brun

Polystéarate/palmitate de saccharose								
	J119	J119	J119	J120	J120	J120	J122	J122
Emulsion	E 45	E 46	E 47	E 48	E 49	E 51	E 52	E 53
Phase aqueuse	65	65 (pas tout) 50?	65	65	65	65	50	50
Phase grasse	35	35 50?	35	35	35	35	50	50
% TA total	5	5	5	5	5	5	5	2,5
Nature phases	H ₂ O/MCT							
Protocole	agitation magnétique à chaud puis refroidissement à T° ambiante	rotor-stator 8000 8,30min 13500 4min puis agitation pour refroidissement à T°C ambiante	hélice sans plaque chauffante mais seulement bain-marie pendant émulsification	hélice, à chaud, à faible vitesse incorpore mal l'eau puis passage au rotor-stator et bain glacé	rotor-stator 20500	sucrose dissout à chaud puis laissé refroidi à T Amb RS 20500	dissout à chaud puis laissé refroidi à T Amb RS 8000 5min puis 20500 11min	sucrose dissout à chaud puis laissé refroidi à T Amb RS 8000 5min 20500 11min
Débit injection (mL/min)		3		4,5	4	2,2	1,6	1,6
Durée (min)		12,3		8	9	15,3	16	16
T°C	73	67	<55		63	22	24	22 --> 36
Remarques	inhomogène après refroidissement	Rotor-stator n'incorpore pas bien l'eau une fois l'émulsion épaisse, Homogène après refroidissement	T°C d'émulsification trop faible le mélange reste liquide et pas de formation d'une émulsion	eau mal incorporée si vitesse hélice faible refroidissement trop brusque qui forme un amas autour de la turbine	Comparaison 2 types de refroidissement à T °C ambiante: <i>barreau magnétique</i> vitesse 2 --> inhomogène peu visqueux <i>RS 8000</i> très liquide au début puis séparation de l'eau vers 42°C + amas visqueux	eau s'incorpore mal observation de particules de TA au microscope	petite taille de gouttes mais cristaux	diminution quantité TA

	Avec Caprylate de glycérol		et span 80							
Emulsion	E55	E56	E57	E58	E59	E60	E61	E62	E63	
Phase aqueuse	10	50	50	50	40	40	20	30	40	
Phase grasse	90	50	50	50	60	27,5 (1:1)	80	70	60	
% Sorb - Capryl.	2-10	2-10	10-10	5-10	5-10	5-27,5	2-10	4-10	8-40	
HLB du mélange	4,88		4,65		4,77		4,89	4,88	4,8	4,88
Nature phases	H2O/MCT									
Protocole	8000 5 min 13500 3min	8000 9,30min 13500 2,30min	8000 4min 13500 1min 20500 11min	8000 4min 13500 1min 20500 10min	8000 4min 13500 1min 20500 10min	8000 4min 13500 8min	9500 13min	9500 13min	8000 5min 13500 jusqu'à 14,30 min	
Débit injection (mL/m)	4,5	9,1	14,1	14,1	14	8	12	12	1,5?	
Durée totale (min)	8	12	16	15	15	12	13	13	14,3	
Température (°C)	34 --> 18	21	<20	fin à 28	<20	<20	<20	<20	<20	
Démarche	mousse	augmentation proportion phase aqueuse	augmentation quantité TA pour éviter inversion de phase	Diminution quantité Sorb. Monooléate peut -être responsable de la floculation	diminution quantité d'eau/E58	autant de MCT que de caprylate de glycérol	diminution quantité d'eau pour éviter l'inversion de phase		même rapport de proportionnalité eau:MCT(TA) que E55 en augmentant la quantité d'eau	
Remarques	Pas d'inversion	Inversion E/H	Eau s'incorpore mal très épaisse et flocule à H+1	Epais puis devient liquide: Inversion E/H	Contrôles ok à 4min,5min,1 2min puis inversion	inversion H/E finale	mousse distribution de taille large 10-15µm	soluble dans eau et dans Huile	suivi: E/H jusqu'à 13,30 min puis inversion finale	

Monooléate de sorbitane +			
Polystéarate/palmitate de saccharose			
10% du mélange	J184	J184	J184
Emulsion	E 80	E 81	E 82
Phase aqueuse	65	35	65
Phase grasse	35	35	35
%monooléate	90	10	50
%sucroester	10	90	50
% TA total	10	10	10
Nature phases	H2O+2%mannitol/MCT		
Protocole	MCT chauffé à 75°C pr dissolution SP01 puis laissé refroidi avant ajout Sp80 et émulsification 8000 7min puis 9500		
Débit injection (g/min)	2,8	1,28	2,41
Durée (min)	24	26,3	14,3
T°C	émulsification à T amb env. 30°C		
Remarques	moins épais que les 2 autres	débit lent car émulsion très visqueuse et difficulté incorporation eau	épais

	Sorbitan Tristéarate	Sorbitan monopalmitate	Polyglycéril - 3-oléate
	J052	J052	J052
Emulsion	E13	E14	E15
Phase aqueuse	10	10	10
Phase grasse	90	90	90
% TA total	5	5	5
HLB	2,1	6,7	5
Nature phases	H2O/MCT		
T°C de fusion TA	55	43 - 48	liquide à T°C ambiante
Protocole	8000 8min		
Débit injection	12 mL/min		
Durée (min)	8 min		
Température (°C)	< 20		
Remarques		dépôt jaune-orangé sur les parois après dissolution TA à chaud	

Concentrée	Diluée		Span 80			
Emulsion	E35		E36		E37	
	concentré	dilué	concentré	dilué	concentré	dilué
Phase aqueuse	50	20	40	20	33,3	20
Phase grasse	50	80	60	80	66,7	80
% TA dans ph grasse	66,7	10	36,4	10	25	10
Nature ph aqueuse	H ₂ O/MCT					
Protocole	augmentation progressive agitation magnétique 10min	ajout MCT sous agitation 4,30 min puis au rotor-stator 8000 30s puis 13500 3min	augmentation progressive agitation magnétique	8000	augmentation progressive agitation magnétique 5min RS 13500 3min	8000 4min
Débit injection (mL/min)	4,7		4,7		5	
Durée (min)	10	8	4,3	8,3	8	4
Température (°C)	<20					
	Tentative de former de petites gouttes avec un film interfacial solide avec une grande quantité de tensioactif puis ajout MCT pour diluer					

THERAPEUTIC STRATEGY AND GALENIC INNOVATION FOR THE TREATMENT OF WET AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

Abstract

Wet age-related macular degeneration is characterized by the abnormal growth of blood vessels on the macula. Without treatment after the diagnosis, severe complications emerge and evolve to a loss of central vision. The therapeutic arsenal has greatly expanded over the past three decades with laser photocoagulation and photodynamic therapy to limit the loss of visual acuity. More recently, the development of anti-angiogenic molecules allowed a gain of visual acuity. However, they must be administrated monthly by intravitreal injection resulting in adverse effects. Innovative sustained-release systems can reduce the injection frequency. Water-in-oil emulsions which gradually release active substance over several months could address this matter.

Key-words: Wet age-related macular degeneration (AMD) – anti-angiogenics – intravitreal injection – galenic innovation – sustained-release – water-in-oil emulsion.

STRATÉGIE THÉRAPEUTIQUE ET INNOVATION GALÉNIQUE DANS LE TRAITEMENT DE LA DÉGÉNÉRESCENCE MACULAIRE LIÉE À L'ÂGE EXSUDATIVE

RÉSUMÉ

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge exsudative est caractérisée par la croissance anormale de vaisseaux sanguins au niveau de la macula. Sans prise en charge rapide après diagnostic, de sévères complications apparaissent et évoluent vers une perte de la vision centrale. L'arsenal thérapeutique s'est largement développé ces trois dernières décennies avec la photocoagulation laser, puis la photothérapie dynamique permettant de limiter la perte d'acuité visuelle. Plus récemment, l'apparition de molécules anti-angiogéniques a permis un gain d'acuité visuelle. Cependant, celles-ci doivent être administrées mensuellement par injection intravitréenne entraînant des effets indésirables. Le développement de formes galéniques innovantes à libération prolongée permet de diminuer la fréquence des injections. Les émulsions inverses eau-dans-huile permettant de libérer une substance active sur plusieurs mois pourraient répondre à cette problématique.

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge exsudative (DMLA) – anti-angiogéniques – injection intravitréenne – innovation galénique – libération prolongée – émulsion eau-dans-huile.

Faculté des Sciences pharmaceutiques
35, Chemin des Maraîchers
31062 Toulouse

Directeur de thèse : Docteur QUINTYN Jean-Claude