



HAL
open science

Formulations de dérivés lipophénoliques, évaluation in vitro et in vivo de leur efficacité contre la dégénérescence maculaire

Maxime Vincent

► **To cite this version:**

Maxime Vincent. Formulations de dérivés lipophénoliques, évaluation in vitro et in vivo de leur efficacité contre la dégénérescence maculaire. Chimie thérapeutique. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONS111 . tel-04774654

HAL Id: tel-04774654

<https://theses.hal.science/tel-04774654v1>

Submitted on 8 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie et Physico-Chimie des Matériaux

École doctorale Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche Institut Charles Gerhardt Montpellier

Formulations de dérivés lipophénoliques, évaluation *in vitro* et *in vivo* de leur efficacité contre la dégénérescence maculaire

Présenté par Maxime Vincent
Le 30 novembre 2022

Sous la direction de Sylvie Begu,
Philippe Brabet et Céline Crauste

Devant le jury composé de

Amélie Bochot, Professeur, Université Paris-Saclay

Lionel Bretillon, Directeur de recherche, INRAE

David Cia, MCU, UMR Inserm 1107

Frederic Lagarce, PUPH, Université d'Angers

Philippe Legrand, professeur, ICGM

Céline Crauste, MCU, IBMM

Sylvie Begu, MCU, ICGM

Philippe Brabet, CR, INM

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examinatrice

Invitée

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

En mémoire de mon Père décédé le 10 février 2021

Merci pour tous tes sacrifices, tes valeurs transmises et tout ton amour

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr. Sylvie Begu de thèse de m'avoir donné l'opportunité de pouvoir effectuer ces travaux de thèse. Sylvie, merci pour ton encadrement et ta disponibilité. Tu as su me laisser de l'espace pour me permettre de développer mon autonomie tout en gardant toujours un œil sur moi, et en me motivant quand c'était nécessaire. Tu as toujours été compréhensive et arrangeante dans des moments difficiles pour moi et je t'en suis profondément reconnaissant. Merci Dr. Céline Crauste pour tes précieux conseils et d'avoir pris le temps de m'expliquer tout le rationnel scientifique derrière les molécules développées. Enfin, merci au Dr. Phillippe Brabet de m'avoir accueilli à l'INM pour que je puisse mener les expérimentations *in vivo*. Philippe, merci d'avoir pris le temps de m'apprendre et expliquer dans le détail les maladies rétiniennes, le tout avec toute cette passion et cette bonne humeur qui t'animent.

Merci à toute l'équipe du D1 de l'ICGM (anciennement équipe MACS), Jean-Marie, Anne, Alexis, Marie, Joël, Sophie, Quentin et aux doctorants : Jeremy, Maëlle, Maïko, Laurianne, Antonin, Baptiste pour tous les moments partagés ensemble durant ces 3 années. Merci beaucoup à Christophe pour ma formation à l'HPLC et tous les services rendus, toujours avec le sourire. Un grand merci également au Pr. Philippe Legrand pour ses conseils, son expertise et son investissement.

Un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer à l'INM et plus particulièrement à toute l'équipe « vision ». Merci aux animaliers qui ont pris grand soin des souris. Merci à Laurent Guillou de m'avoir supporté dans le même bureau pendant quelques mois. Merci au Dr. Pauline Tarot pour ton aide précieuse et nos discussions. Merci aux stagiaires : Nesrine et Claire de s'être impliqués sur ce projet. Merci à Nicolas Taveau de m'avoir formé à l'expérimentation animale et transmis son savoir-faire sur l'exploration fonctionnelle.

Remerciements

Tous mes remerciements à l'école Doctorale Sciences Chimie Balard, l'Agence Nationale de la Recherche et à la SATT AxLR pour avoir financé ce projet et de de m'avoir permis réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions.

Merci à tous les copains : Quentin, Colin, Max, Stéphane, Sarah, JM, Rémi et Rémy, Cloé, Lucas, Candie, Conor avec qui j'ai pu évacuer un peu la pression.

Je remercie mes parents pour tout leur soutien, leur amour et leurs encouragements. Merci Papa d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir aiguillé pour que je puisse travailler dans un domaine qui me passionne. Merci Maman d'être toujours à mon écoute, de prendre du temps pour moi et de me soutenir dans tout ce que j'entreprends. Merci à ma sœur Emilie pour m'avoir donné l'envie de m'intéresser au domaine de la santé et à la recherche scientifique.

Enfin, merci ne serait pas suffisant pour l'amour de ma vie. Mathilde, tu as toujours été à mes côtés durant ma thèse, tu as toujours cru en moi, encouragé et poussé dans les moments où je manquais de motivation.

Sommaire

Remerciements	4
Sommaire	6
Liste des abréviations	14
Introduction Générale	17
Partie Bibliographique	23
Chapitre 1 : Anatomie, physiologie du segment postérieur de l'œil et pathologies rétiniennes	23
I. Anatomie et physiologie du segment postérieur de l'œil.....	24
1.1 Cavité vitrée et l'humeur vitrée	25
1.2 La rétine neurale	25
1.3 L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)	28
1.4 La sclère	29
II. Le cycle visuel	29
III. La dégénérescence maculaire liée à l'âge et la maladie de Stargardt	31
3.1 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).....	31
3.1.1 Maculopathie liée à l'âge	32
3.1.2 DMLA atrophique	32
3.1.3 DMLA exsudative.....	33
3.2 La maladie de Stargardt de type 1	34
3.3 Mécanisme d'action commun de la physiopathologie de Stargardt et de la DMLA atrophique lié au stress oxydant et carbonylé.....	35
IV. Conclusion	37
Chapitre 2 : Traitements en développement clinique et molécules développées par le laboratoire	39
I. Traitements en phase clinique	40
1.1 Molécules antioxydantes	40
1.2 Molécules anti-inflammatoires.....	41
1.3 Inhibiteurs du cycle visuel.....	43
1.4 Agents neuroprotecteurs.....	43
1.5 Thérapie génique	44

1.6	Thérapie cellulaire.....	45
1.7	Autres thérapies.....	45
1.8	Conclusion sur les thérapies en développement clinique	46
II.	Molécules lipophénoliques développées par le laboratoire.....	47
2.1	Phloroglucinol- <i>O</i> isopropyl- <i>ODHA</i> (IP-DHA).....	48
2.1.1	Impact du greffage du DHA et de l'isopropyle sur l'efficacité de protection de l'IP-DHA contre le stress carbonylé.	50
2.1.2	Evaluation <i>in vitro</i> de l'efficacité de l'IP-DHA contre le stress carbonylé : effet dose -réponse.....	52
2.1.3	Evaluation <i>in vitro</i> de l'efficacité de l'IP-DHA contre le stress oxydant.....	53
2.1.4	Evaluation <i>in vivo</i> de l'efficacité de l'IP-DHA contre la dégénérescence induite par la lumière sur modèle souris ABCA4KO	54
2.2	Quercétine-7- <i>O</i> isopropyl-3- <i>ODHA</i> (Q-IP-DHA)	56
2.2.1	Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti-stress carbonylé et antioxydante de la Q-IP-DHA.....	58
2.2.2	Comparaison de l'effet protecteur de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA sur le stress carbonylé et oxydant.....	59
2.2.3	Comparaison de l'effet protecteur de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA contre la toxicité induite par la photo-oxydation de l'A2E en cellule ARPE19	60
2.3	Conclusion sur les molécules lipophénoliques développées pour lutter contre le double stress oxydant et carbonylé	61
Chapitre 3 : Voies d'administration et formulations pour atteindre le segment postérieur de l'œil		63
I.	Instillation topique	66
1.1	Influence des caractéristiques physico-chimiques des SA sur le passage des barrières physiologiques après une administration topique	66
1.1.1	Le film lacrymal	67
1.1.2	Absorption par la voie cornéenne.....	68
1.1.3	Absorption par la voie conjonctivale.....	70
1.1.4	Conclusion sur l'absorption des molécules jusqu'au segment postérieur de l'œil après administration topique.....	71
1.2	Nanoformulations innovantes pour augmenter la biodisponibilité des SA dans le segment postérieur de l'œil après administration topique.....	71
1.2.1	Liposomes.....	71

1.2.2 Nano-micelles.....	72
1.2.3 Nano-particules (NPs).....	73
1.2.4 Nanoémulsions (NE).....	75
II. Voie intraveineuse (IV)	76
2.1 Influence de la barrière hémato-rétinienne (BHR) sur le passage des SA de la circulation générale jusqu'au segment postérieur de l'œil	77
2.2 Stratégies développées pour traiter des pathologies du segment postérieur de l'œil par voie IV.....	78
2.2.1 Ajustement du pH	78
2.2.2 Utilisation de co-solvants et de surfactants (formation de micelles)	79
2.2.3 Cyclodextrines	79
2.2.4 Nanoformulations	79
2.2.5 Exemples de formulations développées pour la voie IV ciblant le segment postérieur de l'œil	80
III. Voie Orale.....	81
3.1 Problématique des SA faiblement soluble dans l'eau.....	81
3.2 Devenir des formulations lipidiques après administration <i>per os</i>	82
3.2.1 Digestion et solubilisation des lipides	83
3.2.2 Absorption.....	85
3.2.3 Passage dans la circulation générale.....	85
3.3 Formulation LBDDS : amélioration de la biodisponibilité des SA lipophiles.....	86
3.3.1 Les émulsions	88
3.3.2 Nanoparticules lipidiques solides (SLN)	89
3.3.3 Système lipidiques nanostructurés (NLC)	89
3.3.4 Liposomes.....	89
3.3.5 Système auto-émulsifiant (SEDDS).....	89
3.3.6 Nanocapsules lipidiques (LNC)	90
IV. Conclusion	90
Références partie bibliographique.....	92
Travaux de thèse	109
Chapitre 4 : Caractérisation physico-chimique et biopharmaceutique de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA.....	109

I.	Introduction.....	110
II.	Matériels & Méthodes	111
	2.1 Matériel	111
	2.2 Détermination du Log P de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA.....	111
	2.3 Analyse par μ HPLC-MS/MS	111
	2.4 Solubilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA	111
	2.5 Perméabilité des SA sur cellules Caco-2.....	112
	2.6 Stabilité des SA sur les microsomes humains	113
III.	Résultats et discussion	113
	3.1 Détermination de la solubilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA.....	114
	3.2 Détermination de la perméabilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA sur modèle Caco-2	115
	3.3 Détermination de la stabilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA sur microsomes humains	116
IV.	Conclusion	117
	Références.....	118
Chapitre 5 : Développement et caractérisation de formulations IV et orales pour l'IP-DHA et la Q-IP-DHA		
121		
I.	Développement et caractérisation d'une formulation IV pour la Q-IP-DHA et l'IP-DHA	122
	1.1 Introduction.....	122
	1.2 Matériel & Méthodes	123
	1.2.1 Matériel	123
	1.2.2 Solubilité de la Q-IP-DHA dans différents excipients	123
	1.2.3 Préparation des micelles vides (M-V) et des micelles chargées en Q-IP-DHA (M-Q-IP-DHA)	123
	1.2.4 Détermination du ratio Kolliphor® HS 15/eau	123
	1.2.5 Stabilité de la formulation M-Q-IP-DHA en milieu physiologique	124
	1.2.6 Taux de chargement et pourcentage d'encapsulation en Q-IP-DHA.....	124
	1.2.7 Détermination de taille et potentiel zêta des M-V et M-Q-IP-DHA.....	124
	1.2.8 Adaptation de la formulation à l'IP-DHA.....	125
	1.3 Résultats et discussion	125
	1.3.1 Choix de la formulation	125

1.3.2 Influence de la concentration en Kolliphor® HS 15 sur le taux de chargement en Q-IP-DHA	126
1.3.3 Taille et potentiel zêta des micelles vides (M-V) et des M-Q-IP-DHA.....	127
1.3.4 Test de précipitation en milieu physiologique et % d'encapsulation	128
1.3.5 Adaptation de la formulation à l'IP-DHA.....	128
1.4 Conclusion	129
II. Développement et caractérisation de la formulation orale pour l'IP-DHA et la Q-IP-DHA	130
2.1 Introduction.....	130
2.2 Matériel & Méthodes	133
2.2.1 Matériel	133
2.2.2 SNEDDS-IP-DHA	133
2.2.2.1 Solubilité de l'IP-DHA dans différents excipients.....	133
2.2.2.2 Diagramme ternaire : plan expérimental et formulation des SNEDDS.....	133
2.2.2.3 Préparation et caractérisation des SNEDDS-IP-DHA.....	134
2.2.2.4 Détermination de la distribution de taille et du potentiel zêta des NE.....	134
2.2.2.5 Étude morphologique des NE	134
2.2.2.6 Taux de chargement et pourcentage d'IP-DHA dans les NE	135
2.2.2.7 Robustesse à la dilution	135
2.2.2.8 Influence de la formulation SNEDDS sur la stabilité de l'IP-DHA dans les fluides simulés gastrique (SGF) et intestinal (ISF).....	135
2.2.3 LNC-Q-IP-DHA.....	136
2.2.3.1 Préparation des LNC-Q-IP-DHA	136
2.2.3.2 Optimisation de la composition des LNC	136
2.2.3.3 Taux de chargement et pourcentage d'encapsulation	137
2.2.3.4 Détermination de la taille et du potentiel zêta de LNC-V et LNC-Q-IP-DHA..	137
2.3 Résultats et discussion	137
2.3.1 SNEDDS-IP-DHA	137
2.3.1.1 Choix des SNEDDS et de leur composition.....	137
2.3.1.2 Effet de la composition des SNEDDS sur la taille des NE	139
2.3.1.3 Détermination de la charge maximale de l'IP-DHA dans les SNEDDS.....	140
2.3.1.4 Taux de chargement et pourcentage d'IP-DHA dans les NE	141

2.3.1.5	Caractérisation des NE	141
2.3.1.5.1	Taille, potentiel zêta et étude morphologique des NE	141
2.3.1.5.2	Robustesse des NE à la dilution	143
2.3.1.5.3	Influence des SNEDDS sur la solubilité et la stabilité de l'IP-DHA dans les fluides gastriques et intestinaux simulés	144
2.3.2.1	Optimisation de la formulation des LNC vides et chargées : choix du ratio Kolliphor® HS 15/Labrafac®/ phase aqueuse	146
2.3.2.2	Optimisation et caractérisation de la formulation LNC-Q-IP-DHA	147
2.4	Conclusion	148
III.	Conclusion sur les formulations développées	149
	Références	150
Chapitre 6 : Pharmacocinétique, métabolisation et évaluation de l'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA.....		157
I.	Introduction.....	158
II.	Etude pharmacocinétique de l'IP-DHA en IV vs <i>per os</i> . Recherche des métabolites de l'IP-DHA chez la souris	159
2.1	Matériel & Méthodes	159
2.1.1	Animaux.....	159
2.1.2	Dosage HPLC/MS de l'IP-DHA.....	160
2.1.3	Administration de l'IP-DHA	160
2.1.4	Prélèvement de sang.....	161
2.1.5	Traitement de l'échantillon avant dosage	161
2.1.6	Recherche des métabolites de l'IP-DHA.....	161
2.2	Résultats et discussion	161
2.2.1	Pharmacocinétique de l'IP-DHA par voie IV	162
2.2.2	Pharmacocinétique de l'IP-DHA par voie orale.....	163
2.2.3	identification et quantification des métabolites dans le sang	163
	Conclusion	165
III.	Evaluation de l'efficacité des solutions micellaires d'IP-DHA et de Q-IP-DHA par voie IV.....	166
3.1	Matériel & Méthodes.....	166
3.1.1	Animaux.....	166
3.1.2	Administration de la formulation IV.....	166

3.1.3 Induction de la dégénérescence des photorécepteurs par un stress lumineux aigu sur des souris Abca4KO	166
3.1.4 Tomographie par cohérence optique dans le domaine spectral (SD-OCT)	167
3.1.5 Electrorétinographie (ERG)	167
3.1.6 Calcul du pourcentage de l'intégrité et de la fonction des photorécepteurs chez les souris.....	168
3.1.7 statistiques	168
3.2 Résultats et discussion	168
3.2.1 Evaluation de l'efficacité des M-Q-IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse SD-OCT	169
3.2.2 Evaluation de l'efficacité des M-Q-IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse ERG.....	171
3.2.3 Comparaison de l'efficacité de l'IP-DHA sous solution micellaire et complexé à la BSA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse ERG	173
Conclusion	175
IV. Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA par voie orale avec un modèle aigu de dégénérescence des photorécepteurs	176
4.1 Matériel & Méthodes.....	176
4.1.1 Animaux.....	176
4.1.2 Administration par voie orale	176
4.1.3 Induction de la dégénérescence des photorécepteurs par un stress lumineux aigu sur des souris BALB/c et ABCA4KO	176
4.1.4 Analyse histologique	177
4.1.5 Electrorétinographie (ERG)	177
4.1.6 Calcul du pourcentage de l'intégrité et de la fonction des photorécepteurs restant chez les souris.....	177
4.1.7 Statistiques	177
4.2 Résultats et discussion	177
4.2.1 Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse ERG	178
4.2.2 Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse histologique.....	180
4.2.3 Evaluation de l'efficacité de la Q-IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse ERG	183

4.2.4 Evaluation de l'efficacité de la Q-IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse histologique.....	184
Conclusion	186
V. Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA sur un modèle de dégénérescence rétinienne chronique induit par un stress lumineux	187
5.1 Introduction.....	187
5.2 Matériel & Méthodes	187
5.2.1 Mise en place d'un modèle de dégénérescence des photorécepteurs de façon chronique	187
5.2.2 Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA, sur modèle de dégénérescence chronique	188
5.2.3 Analyse de la rétine	188
5.2.4 Calcul du pourcentage de l'intégrité et de la des photorécepteurs restant chez les souris	189
5.2.5 Statistiques	189
5.3 Résultats et discussion	189
5.3.1 Mise en place d'un modèle de dégénérescence des photorécepteurs de façon chronique	189
5.3.2 Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA sur modèle de dégénérescence chronique par analyse ERG.....	191
5.3.3 Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA, sur modèle de dégénérescence chronique, par analyse histologique	193
Conclusion	195
VI. Conclusion sur l'évaluation de l'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA.....	196
Références.....	197
Conclusion générale.....	199
Références.....	206

Liste des abréviations

A2E : N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine

AG : Acides Gras

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AtR : All-trans Rétinal (Tout-*trans* rétinol)

ARPE-19 : Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19

BSC : Biopharmaceutics Classification System (Système de Classification Biopharmaceutique)

BHR : Barrière Hémato-Rétinienne

BSA : Bovine Serum Albumin (Albumine de Sérum Bovin)

Ch : Cholestérol

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute performance)

C_{max} : Concentration maximale

CMC : Concentration Micellaire Critique

COX : Cyclooxygénase

Cryo-TEM : Cryo-Transmission Electron Microscopy (Cryo-Microscopie électronique à transmission)

DA : Dark Adapted (Adaptation à l'obscurité)

DFP : DiisopropylFluoroPhosphate

DG : Diglycérides

DHA : Acide Docosahexaénoïque

DCFDA : Diacétate de dichlorodihydrofluorescéine

DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

DRX : Diffraction des Rayons X

DSC : Differential Scanning Calorimetry (Calorimétrie Différentielle à Balayage)

DSPC : Distearoylphosphatidylcholine

EPR : Epithélium Pigmentaire Rétinien

ERG : Electrorétinographie

GI : Gastro-Intestinal

Liste des abréviations

HES : Hématoxyline/Eosine/Saffron

IBMM : Institut des Biomolécules Max Mousseron

ICGM : Institut Charles Gerhardt Montpellier

INL : Inner nuclear layer (Couche Nucléaire Interne)

INM : Institut des Neurosciences de Montpellier

IP-DHA : Phloroglucinol-*O*isopropyl-*ODHA*

IV : Intraveineuse

IVT : Intra-vitréen

LBBDS : Lipid based drug delivery system (Systèmes Lipidiques de Délivrance de Médicaments)

LNC : Lipid nanocapsules (Nanocapsules Lipidiques)

LNC-V : Nanocapsules Lipidiques Vides

LNC-Q-IP-DHA : Nanocapsules Lipidiques chargées en Quercétine-7*O*isopropyl-3-*ODHA*

MAC : Membrane Attack Complex (Complexe d'Attaque Membranaire)

MG : Monoglycérides

M-Q-IP-DHA : Micelles chargées en Quercétine-7*O*isopropyl-3-*ODHA*

MRP1 : Multidrug Resistance Proteins

MS : Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse)

M-V: Micelle Vides

NE : Nanoémulsions

NLC : Nanostructured Lipid Carriers (Système Lipidiques Nanostructurés)

Nps : NanoParticules

OCT : Optical Coherence Tomographie (Tomographie à Cohérence Optique)

ONL : Outer Nuclear Layer (Couche Nucléaire Externe)

PC : Phosphatidylcholine

PCS : Photon Correlation Spectroscopy (Spectrométrie à Corrélation de Photons)

PDI : Polydispersity Index (Indice de Polydispersité)

PE : Phosphatidyléthanolamine

PEG : Polyéthylène Glycol

P-gP : P-Glycoprotéine

PL : Phospholipides

Liste des abréviations

PS : Phosphatidylsérine

Q-IP-DHA : Quercétine-7-Oisopropyl-3-ODHA

RCPG : Récepteur Couplé à la Protéine G

ROS : Reactive Oxygen Species (Espèces Réactives à l'Oxygène)

SA : Substance Active

SB : Sels biliaires

SEDDS : Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (Système autoémulsifiant pour la Délivrance de Médicament)

SGF : Simulated Gastric Fluid (Fluide Gastrique Simulé)

SIF : Simulated Intestinal Fluid (Fluide Instestinal Simulé)

SLB : Synthèse de Lipide Bioactifs

SLN : Solid Lipid Nanoparticles (Nanoparticules Lipidiques Solides)

SMEDDS : Self-Microemulsifying Drug Delivery System (Système Auto-microémulsifiant pour la Délivrance de Médicament)

SNEDDS : Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (Système Auto-Nanoémulsifiant pour la Délivrance de Médicament)

TG : Triglycerides

TGA : Thermogravimetric Analysis (Analyse Thermogravimétrique)

TGI : Tractus Gastro-Intestinal

UV : Ultraviolet

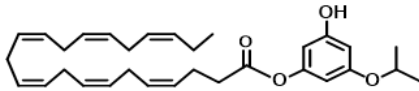
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor (Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire)

Introduction Générale

L'œil est l'organe permettant la vue, c'est le sens le plus sollicité parmi nos 5 sens. L'œil est un organe complexe qui nous permet de capter la lumière. Ce signal lumineux sera ensuite transformé en signal électrique qui sera interprété par notre cerveau pour nous permettre de distinguer des formes et des couleurs. Il existe différentes pathologies pouvant altérer le bon fonctionnement de l'œil et de la vision (cataracte, glaucome, rétinopathie diabétique, ...). Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons spécifiquement à des maladies de la rétine centrale : la dégénérescence maculaire et plus particulièrement à deux pathologies induisant cette dégénérescence : **la dégénérescence maculaire liée à l'âge de forme atrophique** (DMLA atrophique ou de forme sèche) et la **maladie de Stargardt**, dégénérescence maculaire d'ordre génétique. La DMLA atrophique, pathologie multifactorielle (âge, tabac, facteurs environnementaux, ...) est la première cause de malvoyance chez l'adulte de plus de 50 ans dans les pays industrialisés. La maladie de Stargardt est une maladie autosomique récessive qui implique la mutation du gène *Abca4*, cette maladie peut être détectée chez l'enfant entre l'âge de 7 à 12 ans. Ces deux pathologies sont des pathologies progressives qui vont provoquer une perte de la vision centrale et à terme qui peuvent conduire à la cécité. L'un des principaux mécanismes impliqués dans la physiopathologie de ces maladies est le double stress oxydant et carbonylé. Il va provoquer l'aggravation et la progression de ces pathologies via un mécanisme cytotoxique commun. Actuellement il n'existe **aucun traitement** préventif ou curatif pour lutter contre ces pathologies.

Pour répondre à cette problématique de santé publique, l'équipe « Synthèse de lipides bioactifs » (SLB) de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier a synthétisé de nouvelles molécules lipophénoliques, potentiels candidats pour agir contre le stress oxydant et carbonylé afin de limiter le mécanisme cytotoxique qui intervient dans ces pathologies. Le **phloroglucinol-Oisopropyl-ODHA** (IP-DHA) et la **quercétine-7-Oisopropyl-3-ODHA** (Q-IP-DHA) (**figure 1**) ont ainsi été sélectionnés à la suite d'un projet de chimie médicinale.

Phloroglucinol-Oisopropyl-ODHA
(IP-DHA)



Quercétine-7-Oisopropyl-3-ODHA
(Q-IP-DHA)

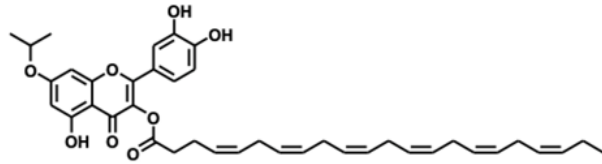


Figure 1 : Structure chimique de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA

L'**efficacité** de ces molécules pour limiter le stress oxydant et carbonylé a été évaluée (dans une étude précédente) *in vitro* sur un modèle de cellules rétinienne (modèle ARPE-19). Une preuve de concept de l'efficacité *in vivo* a été effectuée seulement avec l'**IP-DHA** lors d'une étude précédente après une administration par voie intraveineuse (IV) sur souris ABCA4KO (modèle de la maladie de Stargardt) en mettant en évidence la protection des photorécepteurs des souris après induction de la dégénérescence des photorécepteurs par un stress lumineux aigu. C'est dans ce contexte que j'ai débuté mes travaux de recherche au sein de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier (ICGM) en collaboration avec l'Institut des Neurosciences de Montpellier (INM) et l'IBMM. Ainsi, le premier objectif de mon étude sera de **développer et d'optimiser une formulation pour la voie orale** adaptée aux caractéristiques physico-chimiques de l'IP-DHA (molécule LEAD) et de caractériser cette formulation (taille, charge de surface, stabilité, ...). Le second objectif de l'étude sera **d'évaluer l'efficacité de cette formulation d'IP-DHA** par administration orale **chez l'animal**, avec un modèle induisant une dégénérescence des photorécepteurs par la lumière de manière aigu (intensité lumineuse forte sur un temps court) et chronique (intensité lumineuse faible sur un temps long). La voie orale est la voie d'administration privilégiée pour soigner des pathologies chroniques telle que la DMLA atrophique et maladie de Stargardt, car c'est une voie non invasive permettant la meilleure compliance pour le patient. Enfin, la **Q-IP-DHA** ayant montré des propriétés antioxydantes supérieures à l'IP-DHA lors des premières études *in vitro*, le troisième objectif sera de développer tout d'abord une **formulation IV pour évaluer son efficacité et obtenir une preuve de concept in vivo**. Dans un second temps, les résultats par voie IV étant concluants, nous développerons une **formulation pour la voie orale pour évaluer son efficacité in vivo** de la même façon que pour la molécule LEAD (IP-DHA).

Ce manuscrit est divisé en 6 chapitres : les chapitres 1 à 3 présentent la partie bibliographique et les chapitres 4 à 6 concernent les travaux réalisés au cours de cette thèse.

Le chapitre 1 présentera l'anatomie et la physiologie du segment postérieur de l'œil avec une description du fonctionnement du cycle visuel. Les physiopathologies de la DMLA précoce, atrophique et exsudative ainsi que la maladie de Stargardt seront décrites. Pour finir, le mécanisme d'action commun qui régit ces pathologies sera détaillé.

Le chapitre 2 présentera les avancées de la recherche sur les différentes thérapies (géniques, pharmacologiques et cellulaires) actuellement en phase clinique. Les travaux ayant conduit à la découverte des deux molécules lipophénoliques : IP-DHA et Q-IP-DHA développées par l'équipe SLB de l'IBMM contre le stress oxydant et carbonylé seront présentés avec les résultats des tests *in vitro* d'efficacité et de toxicité de ces molécules sur les cellules ARPE-19 (cellules rétinienne). Nous porterons une attention particulière aux tests d'efficacité *in vivo* sur des modèles de souris utilisés dans la recherche contre la dégénérescence maculaire avec une description de l'analyse fonctionnelle et morphologique de la rétine pour évaluer l'état de la rétine.

Le chapitre 3 portera sur la problématique de la délivrance de substances actives (SA) jusqu'à la rétine qui se situe dans le segment postérieur de l'œil. Les différentes barrières physiologiques rencontrées pour pouvoir délivrer des SA dans cette partie de l'œil seront détaillées. Nous porterons une attention particulière aux différentes formulations décrites dans la littérature en fonction des voies d'administration (topique, orale et parentérale) pour améliorer la biodisponibilité des actifs dans le segment postérieur de l'œil.

Le chapitre 4 présentera l'analyse des deux actifs d'intérêt : l'IP-DHA et la Q-IP-DHA afin de déterminer les verrous à lever grâce à la formulation. Ainsi, l'étude commencera par les caractéristiques physico chimiques tels que solubilité, Log P puis les études biopharmaceutiques avec une étude de leur stabilité en milieu gastrique et intestinal et une

étude *in vitro* sur modèle Caco-2 pour évaluer leur passage de la barrière intestinale. L'impact des caractéristiques des SA sur le choix de la formulation sera également discuté.

Le chapitre 5 présentera le développement et la caractérisation de formulations IV et orale. Pour la voie IV, nous présenterons le développement d'une formulation micellaire pour pouvoir administrée la Q-IP-DHA chez l'animal. Pour la voie orale, nous présenterons le développement d'un système auto-nanoémulsifiant pour la délivrance de médicaments (SNEDDS) développé pour l'IP-DHA et le développement de nanocapsules lipidiques (LNC) pour la Q-IP-DHA qui ont ensuite été caractérisé (taille, de taux de chargement, de pourcentage d'encapsulation, ...).

Le dernier chapitre (chapitre 6) exposera les différentes évaluations réalisées *in vivo* afin de démontrer l'intérêt des formulations développées. Une analyse pharmacocinétique de l'IP-DHA et la quantification des molécules issus de sa dégradation seront présentées. Ensuite, l'efficacité de la Q-IP-DHA formulée avec des micelles sera déterminée par administration IV chez la souris ABCA4KO après induction de la dégénérescence des photorécepteurs grâce à un stress lumineux aigu. Pour la voie orale, une étude dose réponse de l'efficacité de l'IP-DHA formulé avec les SNEDDS et de la Q-IP-DHA formulée avec les LNC sur des souris ABCA4KO et BALB/c sur leur capacité à protéger les photorécepteurs sera exposée. Enfin, le développement d'un nouveau modèle de dégénérescence des photorécepteurs grâce à un stress lumineux chronique sur ses souris BALB/c sera présenté ainsi que l'évaluation de l'efficacité de l'IP-DHA formulé avec les SNEDDS administré à différentes fréquences journalières.

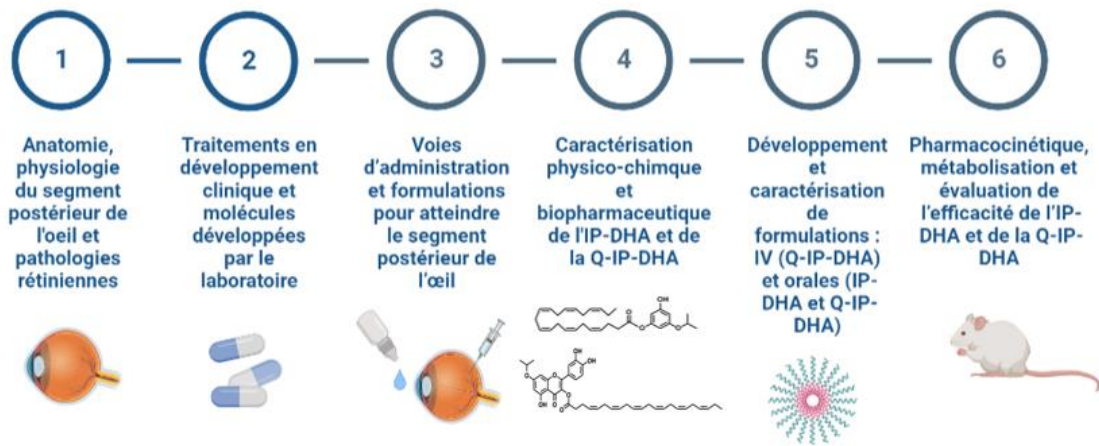


Figure 2 : Présentation générale de la thèse

Ces travaux de recherche regroupent l'ensemble du développement de deux molécules lipophénoliques développées pour la prise en charge de pathologies rétinienne induites par un stress oxydant et carbonylé : la dégénérescence maculaire lié à l'âge et la maladie génétique de Stargardt (**figure 2**). Ce manuscrit présente à la fois le rationnel de synthèse des molécules, leur caractérisation physico-chimique et biopharmaceutique, le choix et le développement de formulations pour la voie intraveineuse et orale, et enfin la caractérisation de ces nouvelles formulations et leur efficacité sur deux modèles animaux.

Partie Bibliographique

Chapitre 1 : Anatomie, physiologie du segment postérieur de l'œil et pathologies rétiniennes

Ce chapitre a pour objectif de décrire l'anatomie, la physiologie et la fonction des principales couches du segment postérieur de l'œil humain. La rétine et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), étant les cibles des futures formulations développées, seront plus détaillées. Ensuite, un focus sera fait sur la physiopathologie de la DMLA et de la maladie génétique de Stargardt car la connaissance de la physiopathologie de ces maladies est indispensable pour en comprendre l'origine et ainsi pouvoir proposer un traitement approprié.

I. Anatomie et physiologie du segment postérieur de l'œil

L'œil est l'organe principal qui permet la fonction visuelle ; il capte les informations lumineuses et les transforme en signal électrique jusqu'à notre cerveau via le nerf optique. Chez l'homme, la vue représente 70% des sources d'informations perçues du monde extérieur et traitées par notre cerveau. Notre champ visuel s'étend en moyenne de 140° à la verticale et de 220° à l'horizontal.

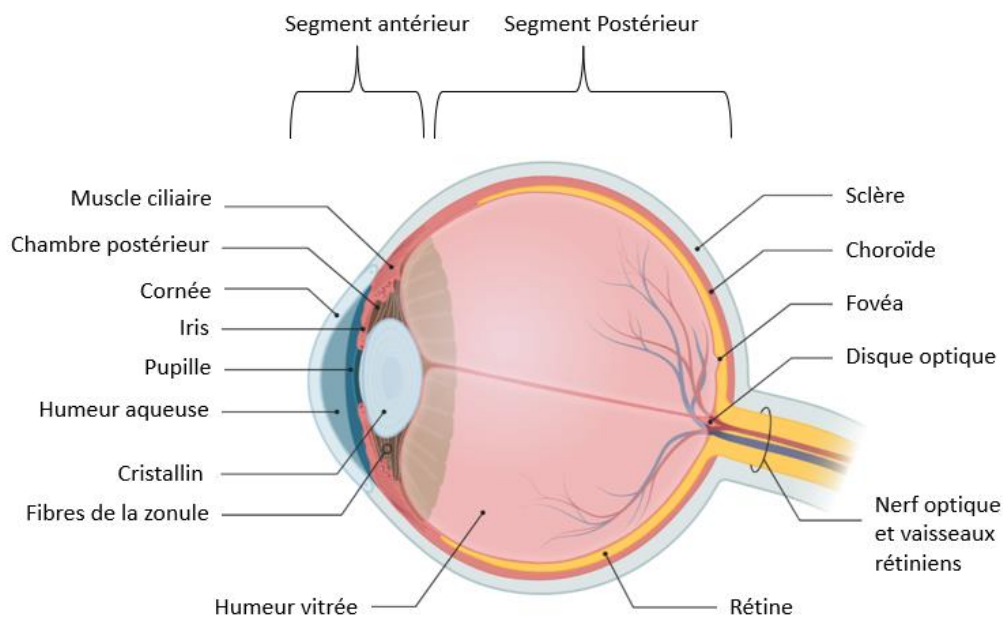


Figure 3: Figure schématique de l'œil humain

L'œil humain (**figure 3**) est un globe de 2,2 à 2,5cm de diamètre en moyenne et pèse entre 7 et 8 grammes. Il est divisé en deux parties : le segment antérieur qui s'étend de la cornée jusqu'au cristallin et le segment postérieur qui se situe à l'arrière du cristallin.

1.1 Cavité vitrénne et l'humeur vitrée

La cavité vitrénne représente la plus grande cavité de l'œil (2/3 du volume de l'œil) et contient l'humeur vitrée (**figure 3**). Elle est délimitée dans sa partie antérieure par le cristallin et le corps ciliaire et, dans sa partie postérieure, par la rétine. L'humeur vitrée est un liquide visqueux transparent constitué majoritairement d'eau mais également d'acide hyaluronique, de fibronectine, de fibrilline, d'opticine et de collagène de type II à IX (indice de réfraction de 1,33). L'humeur vitrée est majoritairement acellulaire ; seules quelques cellules hyalocytes peuvent parfois être détectées. La présence d'un grand nombre de cellules peut être le signe d'un processus pathologique dans les tissus adjacents.

1.2 La rétine neurale

La rétine est une membrane mince (0,25mm) sensible à la lumière qui se trouve dans le plan focal du système optique de l'œil et dont le rôle est la phototransduction (**figures 3 et 4**). Elle est délimitée à l'intérieur par la membrane limitante interne et à l'extérieur par la membrane de Bruch. La rétine est constituée de plusieurs couches de cellules différentes (**figure 4**) : une couche de cellules ganglionnaires qui transmet les signaux électriques au système nerveux central par le nerf optique (lieu de sortie des axones), la couche nucléaire externe (ONL) qui comprend les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) et la couche nucléaire interne (INL) constituée de cellules amacrines, bipolaires, horizontales et des cellules de Müller [1]. Les photorécepteurs, les cellules ganglionnaires et les cellules amacrines permettent le relai des impulsions générées par la lumière alors que les cellules amacrines, horizontales et de Müller permettent de moduler leur activité.

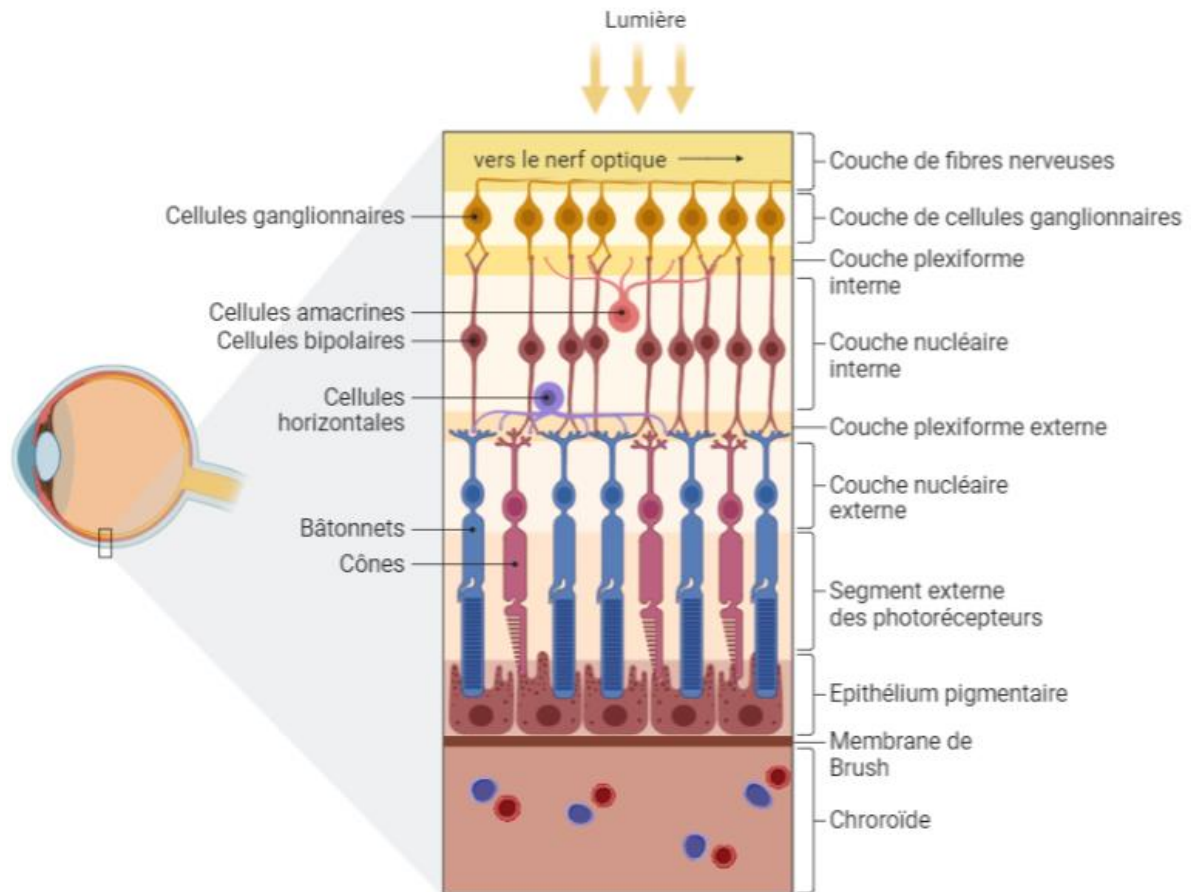


Figure 4 : Représentation schématique de la structure de la rétine

Les photorécepteurs sont constitués de deux types de cellules (**figure 4**) :

- Les cônes (≈ 6 à 7 millions) principalement situés dans la rétine centrale (macula), sont responsables de la vision des couleurs, des formes des détails, et sont associés à la vision de jour (vision photopique) [2],
- Les bâtonnets (≈ 115 millions) principalement situés dans la rétine périphérique, sont beaucoup plus sensibles à la lumière. Ils sont responsables de la vision des contours et des mouvements, et sont associés à la vision en basse luminosité (vision scotopique) [3].

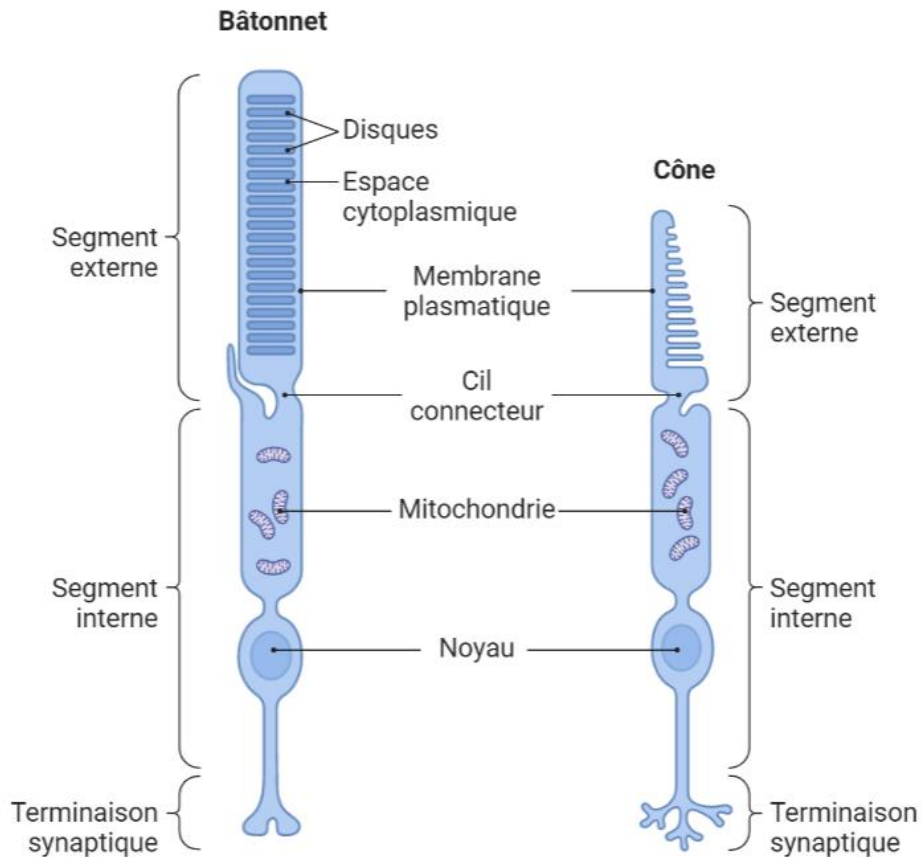


Figure 5 : Représentation schématique des cônes et bâtonnets

La structure des cônes et des bâtonnets (**figure 5**) est assez similaire (présence de noyau, segment interne et externe) mais ils se distinguent par leur segment externe. Le segment externe des cônes est caractérisé par le repliement de la membrane plasmique alors que le segment externe des bâtonnets contient un empilement de disques entourés d'une membrane plasmique. Les disques présents dans le segment externe des bâtonnets contiennent un pigment visuel appelé rhodopsine (sensible à la lumière bleue-verte, max absorption $\approx 496\text{nm}$), famille des récepteurs couplés à la protéine G (RCPG), possédant une fonction clef dans le cycle visuel (**figure 6**) [4]. Les disques des bâtonnets sont entourés par les microvillosités de l'EPR qui va permettre leurs phagocytoses de manière circadienne. Ils sont renouvelés dans le segment externe [5]. En fonction du pigment visuel qu'ils contiennent, nous retrouvons chez l'homme trois types de cônes (la rétine est dite trichromatique). Ils sont désignés par le bleu, le rouge et le vert (les opsines). Les disques présents dans les segments externes des cônes ne subissent pas la phagocytose circadienne et ont une durée de vie plus

longue que les bâtonnets et leurs pigments visuels se situent dans l'empilement de la membrane plasmique.

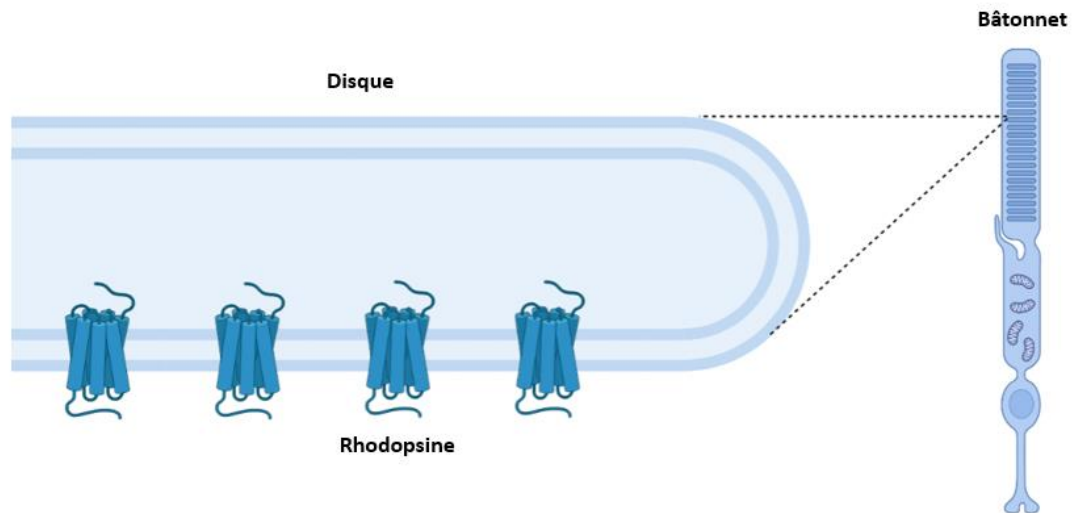


Figure 6 : Représentation schématique d'un disque contenant la protéine transmembranaire rhodopsine

1.3 L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (**figure 7**) est une monocouche de cellules épithéliales qui joue un rôle crucial dans le maintien du bon fonctionnement de la fonction visuelle [6]. Il constitue la partie externe de la barrière hémato-rétinienne (BHR) qui possède des jonctions serrées afin de contrôler de manière sélective des nutriments, de l'oxygène et de l'eau apporté par la choroïde jusqu'à la rétine ou inversement de la rétine jusqu'à la choroïde [7]. Le maintien de l'adhésion de la rétine se fait grâce à l'EPR. Il a également des fonctions physiques : sa composition en mélanine lui confère une capacité à absorber la lumière et ainsi à diminuer la diffusion de la lumière dans l'œil. Ses fonctions métaboliques et biochimiques permettent la phagocytose de la portion apicale des segments extérieurs des bâtonnets [8]. Enfin, le transport des métabolites formés et des vitamines (principalement la vitamine A) se fait à travers l'EPR [9].

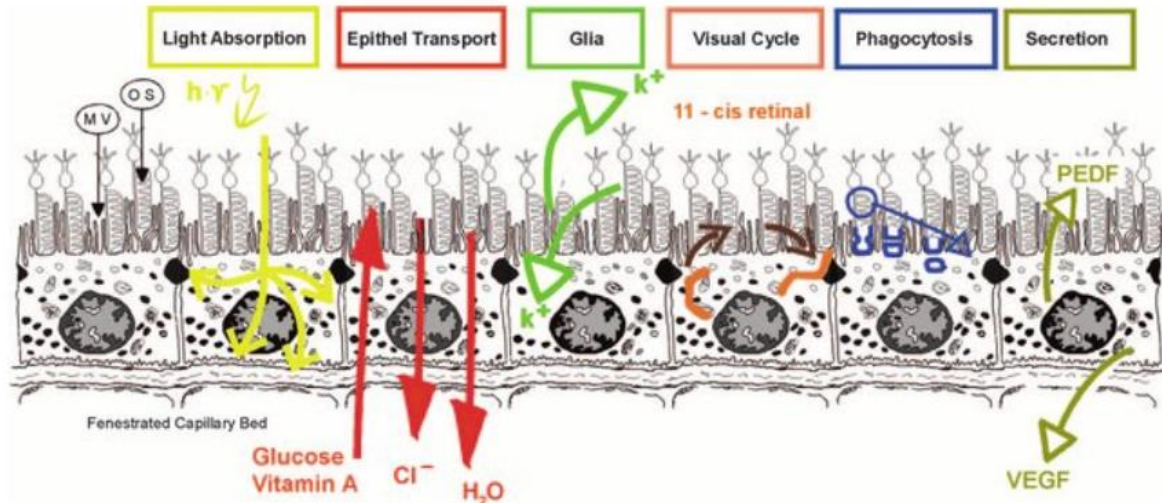


Figure 7 : Représentation de l'EPR et ses différentes fonctions [7]

1.4 La sclère

La sclère recouvre la majeure partie du globe oculaire (**figure 3**) ; il s'agit d'une zone opaque composée de fibrilles ramifiées et de faisceaux de collagène [10]. La sclère joue un rôle important dans la protection du contenu intraoculaire contre les chocs mécaniques et permet la convergence des rayons lumineux vers la rétine. Elle est vascularisée par les artères ciliaires antérieures et supérieures ainsi que par la choroïde [11].

II. Le cycle visuel

Le mécanisme du cycle visuel de régénération du chromophore visuel, aussi appelé cycle de rétinoïdes, qui s'opère dans les bâtonnets est représenté sur la **figure 8**. Il implique plusieurs enzymes et protéines clés qui se situent à la fois au niveau des photorécepteurs et de l'EPR [12], dont la rhodopsine (pigment visuel), localisée dans la membrane des disques des bâtonnets. La rhodopsine est composée de l'isomère de l'aldéhyde de la vitamine A : le 11-*cis* rétinol, chromophore qui se situe au centre de ce pigment visuel [13], protéine à 7 domaines transmembranaires. Au cours du cycle visuel, l'absorption de la lumière se fait par la rhodopsine (11 *cis*-rétinal + opsine), ce qui provoque à la fois l'isomérisation du 11 *cis*-rétinal en tout-*trans* rétinol et sa dissociation de l'opsine.

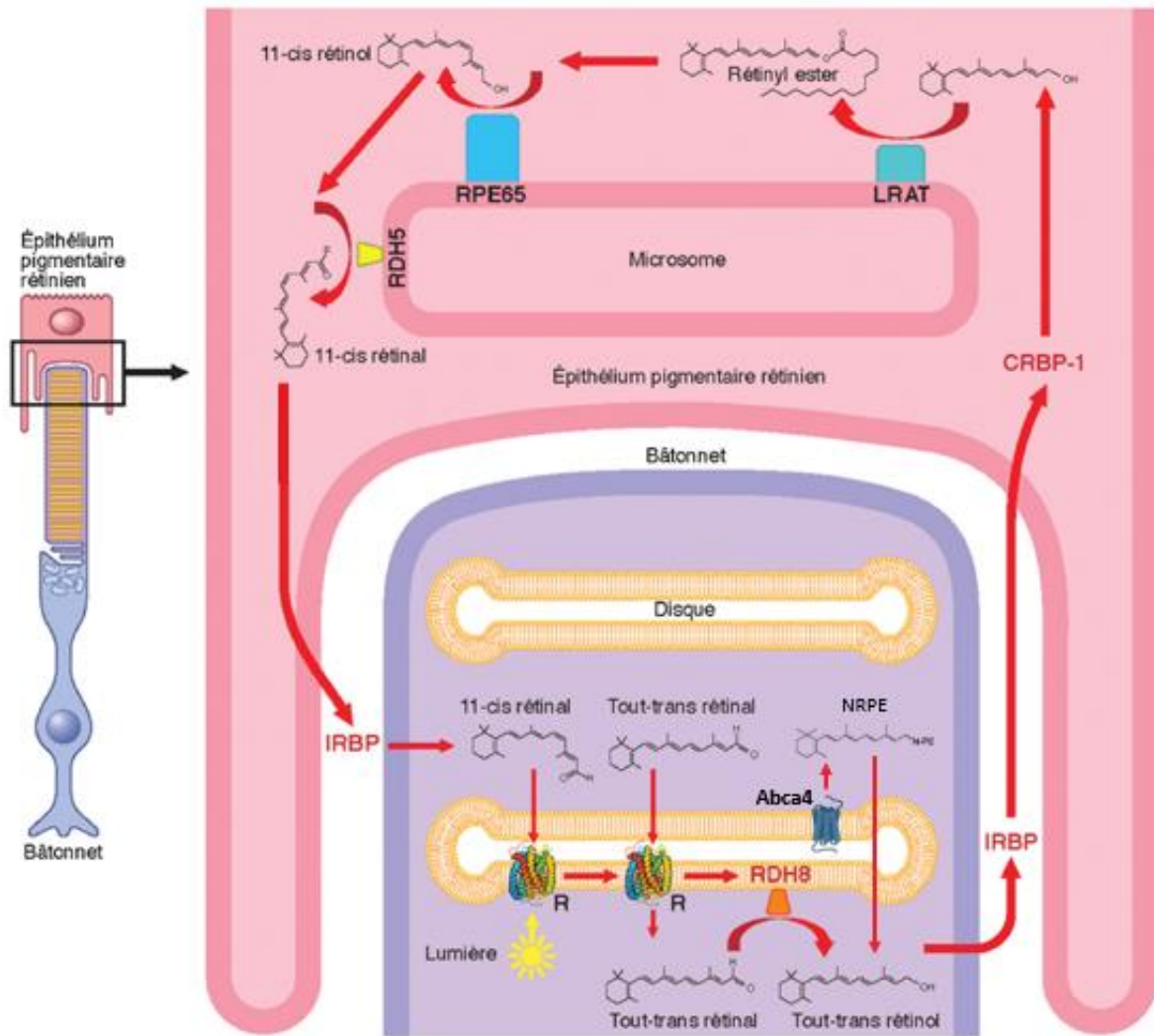


Figure 8 : Figure schématique du cycle visuel, (R : Rhodopsine) [1]

Dans le segment externe, le tout-*trans* rétinol peut aussi être réduit par le rétinol déshydrogénase 8 (RDH8) [14] (et par le rétinol déshydrogénase 12 (RDH12) dans le segment interne [15]) en tout-*trans* rétinol. Le tout-*trans* rétinol peut également réagir avec la phosphatidyléthanolamine (PE) et former le N-rétinylidène-phosphatidyléthanolamine (NRPE). Ce dernier est pris en charge par le transporteur ABCA4 ce qui permet de limiter l'accumulation du tout-*trans* rétinol dans l'espace intra-discal des photorécepteurs. Dans la physiopathologie de la maladie de Stargardt, le transporteur ABCA4 est muté, induisant une accumulation rapide de NRPE qui se transforme par une cascade de réactions, en bis-rétinoïdes cytotoxiques qui seront décrites dans la partie suivante (Chapitre 1, partie 3.3). Dans un cycle normal, le rétinol tout-*trans* est logiquement transporté par la protéine *interphotoreceptor retinol binding protein* (IRBP) jusqu'à l'EPR puis jusqu'aux microsomes par

la *cellular retinol bindingprotein-I* (CRBP-I). Au niveau des microsomes, le tout-*trans* rétinol est esterifié en tout-*trans* rétinyl ester sous l'action de la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT) [16]. Le tout-*trans* rétinyl ester va ensuite être hydrolysé et isomérisé par un complexe protéique incluant la RPE65, afin de donner le 11-*cis* rétinol [17]. Dans l'EPR, deux enzymes : majoritairement le RDH5 et minoritairement le RDH11 vont finalement oxyder le 11-*cis* rétinol pour produire à nouveau le 11-*cis* rétinol. Pour finir le 11-*cis* rétinol retourne dans le segment externe des photorécepteurs grâce aux enzymes CRALBP et IRBP afin de régénérer le pigment visuel.

Il existe des différences importantes entre le cycle visuel des cônes et celui des bâtonnets liés à la différence de leurs photoréponses. Les bâtonnets sont saturés lorsque 500 rhodopsines sont photoisomérisées par seconde [18] alors que les cônes ont besoin de 1 million de photoisomérisation par seconde pour saturer leur réponse [19]. Pour les cônes, la régénération du 11-*cis* rétinol se fait par l'EPR mais également par les cellules de Muller, alors que seul l'EPR est impliqué dans le cycle des bâtonnets [20]. Le mécanisme des cônes n'est à ce jour pas encore entièrement établi et ne sera donc pas plus développé.

III. La dégénérescence maculaire liée à l'âge et la maladie de Stargardt

3.1 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la cause principale de cécité dans le monde chez l'adulte [21] et représente un enjeu de santé mondiale grandissant face à l'augmentation croissante du nombre de personnes âgées [22]. Actuellement, sa prévalence dans le monde est d'environ 170 millions de personnes [23]. La DMLA est une maladie dégénérative chronique de la rétine qui apparaît à partir de l'âge de 50 ans et qui touche principalement la macula, partie centrale de la rétine, responsable de la vision précise. L'étiologie de la maladie est multifactorielle. Le facteur de risque principal est l'âge [24] car en vieillissant les espèces prooxydantes augmentent et les défenses antioxydantes sont moins actives ce qui contribue en partie au vieillissement rétinien. Des facteurs génétiques [25], des

phénomènes inflammatoires [26] et l'hypertension artérielle peuvent aussi intervenir dans l'apparition et l'évolution de la maladie . Enfin, des facteurs environnementaux exogènes tels que l'alimentation, l'alcool et le tabagisme [27] jouent un rôle important dans la progression de la maladie.

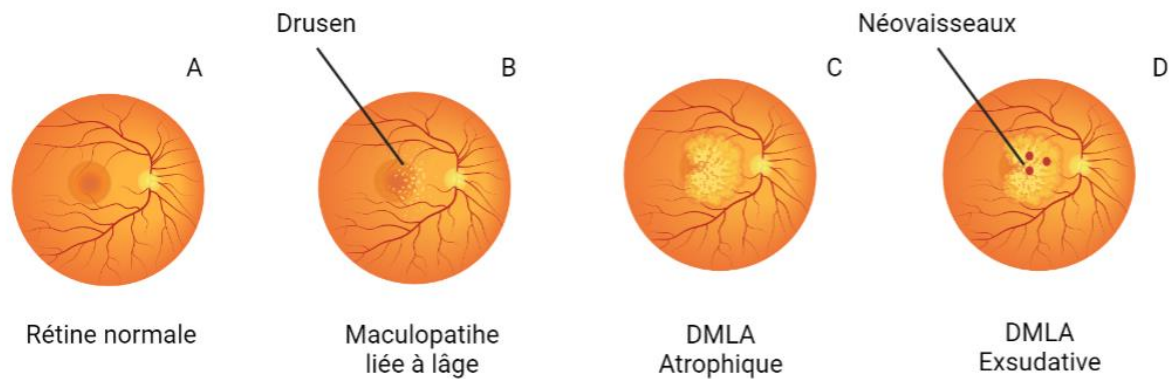


Figure 9 : Cliché de fond d'œil : une rétine saine (A), une maculopathie liée à l'âge (B), une DMLA atrophique (C) et une DMLA exsudative (D)

3.1.1 Maculopathie liée à l'âge

La maculopathie liée à l'âge est la forme la plus précoce de la maladie. Elle se manifeste par l'apparition de dépôts blanchâtres (**figure 9B**) autour de la macula et de modifications pigmentaires [28]. La plupart du temps, cette phase est asymptomatique ou peut être accompagnée par une baisse de la vision et/ou une moins bonne sensibilité aux contrastes. Cette maladie est évolutive et peut conduire à une DMLA atrophique et exsudative. Elle peut être détectée en effectuant un fond d'œil.

3.1.2 DMLA atrophique

La forme atrophique ou forme sèche (**figure 9C**) de la maladie est caractérisée par une dégénérescence des cellules de l'EPR et par une perte progressive des photorécepteurs induisant un amincissement de la macula [29]. Les patients présentent en général une grande difficulté pour la lecture ainsi qu'un début d'apparition d'un scotome central (tache noire au centre de la vision). Le diagnostic se fait par fond d'œil et par angiographie à la fluorescéine. A ce jour, il n'existe toujours pas de traitement préventif ou curatif pour traiter la forme

atrophique de la DMLA qui représente 85% des formes. Certaines études (AREDS) montrent qu'avec une alimentation riche en anti-oxydants, oméga-3 et caroténoïdes, les risques de progression de la maladie peuvent diminuer (chapitre 2, partie 1).

3.1.3 DMLA exsudative

La forme exsudative ou forme humide se manifeste avec la formation de néovaisseaux [30] (**figure 9D**) au niveau de l'EPR et/ou de la rétine qui vont provoquer une accumulation de sang et de liquide et induire un décollement de l'EPR et des cellules rétinienne. Les symptômes vont de l'aggravation du scotome (**figure 10**) associée à une baisse brutale de la vision. La détection de l'apparition de ces vaisseaux se fait par angiographie au vert d'infra-rouge pour observer le réseau vasculaire de la rétine associée à un examen de tomographie à cohérence optique (OCT) pour un diagnostic précis.

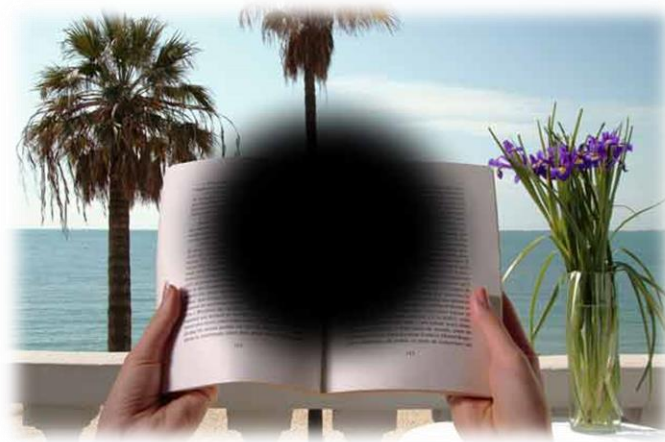


Figure 10 : Symptôme du scotome central chez un patient atteint de DMLA

La DMLA de forme exsudative a fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques ces dernières années. Des essais cliniques ont permis de développer des traitements qui pour ralentir la progression de la maladie tels que :

- le laser thermique pour limiter la taille du scotome [31],
- l'injection intravitréenne d'anti-angiogéniques (anti-VEGF) tel que le ranibizumab Lucentis[®] [32] ou le bevacizumab Avastin[®][33] pour limiter la formation de néovaisseaux choroïdiens,

- la photothérapie dynamique (PDT) pour réaliser une occlusion des néovaisseaux choroïdiens de façon très sélective [34].

3.2 La maladie de Stargardt de type 1

La maladie génétique de Stargardt est une maladie autosomique récessive impliquant une mutation du gène ABCA4 [35]. Sa prévalence est d'environ 1/10 000 [36], la maculopathie héréditaire est la forme la plus fréquente qui intervient chez l'enfant entre 7 et 12 ans [37].

Le transporteur ABCR, produit par le gène ABCA4, fait partie de la famille des transporteurs ABC qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des substrats [38], il est situé sur la membrane des disques des segments externes des photorécepteurs et joue un rôle prépondérant dans le cycle visuel. Lors de la mutation du gène ABCA4, le transporteur n'est plus actif et cela va induire une accumulation de composés cytotoxiques (A2E) précoce et rapide provoquant une perte de la vision.

La maladie se caractérise alors par une atrophie maculaire avec l'apparition de dépôts de lipofuscine « flecks » [40] au niveau de l'EPR (**figure 13**). Les symptômes sont proches de ceux de la DMLA : une baisse de l'acuité visuelle incluant un scotome central [41] avec une diminution de la vision des couleurs associée à une sensibilité exacerbée à la lumière.



Figure 11 : Flecks chez un patient atteint de la maladie de Stargardt [39]

3.3 Mécanisme d'action commun de la physiopathologie de Stargardt et de la DMLA atrophique lié au stress oxydant et carbonylé

Le stress oxydant et carbonylé (COS) intervient dans le mécanisme d'action physiopathologique de ces maladies. D'un point de vue général, le stress oxydant et carbonylé apparaît quand les mécanismes de détoxification cellulaire endogènes sont saturés par la surproduction de radicaux libres. En condition physiologique normale, la rétine est fortement exposée à des conditions de stress oxydant du fait de sa consommation en oxygène (tissu le plus consommateur du corps humain), de sa richesse en acide gras polyinsaturés qui vont s'oxyder et produiront des dérivés carbonylés, de son exposition aux rayons UV et de son important métabolisme lié au renouvellement continu des disques des segments externes des photorécepteurs [42].

Comme décrit précédemment (chapitre 1, partie 2), chez une personne saine la production du tout-*trans* rétinol se fait par photoisomérisation du 11-*cis* rétinol. Il est ensuite transformé en NRPE pour être utilisé pour la régénération du pigment visuel. L'accumulation du tout-*trans* rétinol est le point de départ de ces maladies. En effet le tout-*trans* rétinol est considéré comme un stresseur carbonylé et présente une certaine cytotoxicité [43] pouvant agir sur les mitochondries et provoquer l'apoptose des cellules [44].

En condition « normale » une partie du NRPE est transporté dans le cytosol par le transporteur lipidique ABCA4 (chapitre 1, partie 2) pour être réduit en rétinol tout-*trans* [45] alors que dans la maladie de Stargardt, le transporteur n'est pas actif et va induire l'accumulation précoce et rapide du NRPE et du tout-*trans* rétinol [46].

Avec l'âge le tout-*trans* rétinol va également s'accumuler anormalement. Dans les 2 cas, il va réagir de par la forte réactivité que lui confère sa fonction aldéhyde avec la phosphatidyléthanolamine (PE), par une réaction de **stress carbonylé** pour former l'adduit N-rétinylidène-phosphatidyléthanolamine (NRPE) [47] (**figure 12**). Toujours par une réaction impliquant un **stress carbonylé**, une partie du NRPE va réagir avec une 2nd molécule de tout-*trans* rétinol et subir un réarrangement et une oxydation pour former de manière irréversible un bis rétinoïde appelé di-rétinoïde-pyridinium-phosphatidyléthanolamine (A2-PE), qui par

hydrolyse va former le di-rétinoïde-pyridinium (A2E) [48]. L'A2E va venir s'accumuler dans l'EPR, il constitue le principal composant de la lipofuscine (**figure 12**) [49]. A une certaine concentration l'A2E provoque une augmentation de la production de ROS [50], une inflammation [51], altère l'intégrité des membranes cellulaires [52] et va diminuer le métabolisme de phagocytose des segments externes. De plus l'A2E peut lui-même s'oxyder par photooxydation et former de nouveaux métabolites (époxydes, peroxydes, ...) également toxiques pour l'EPR [53].

En résumé, ces 2 maladies résultent de l'accumulation de lipofuscine, composée par différents bis-rétinoïdes cytotoxiques (dont l'A2E) qui vont induire la dégénérescence de l'EPR et des photorécepteurs [54]. Ces bis-rétinoïdes proviennent des segments externes des photorécepteurs via un double stress oxydant et carbonylé [55] et sont transportés vers l'EPR par phagocytose de la membrane du segment externe du photorécepteur [56]. Ces bis-rétinoïdes vont fusionner avec les lysosomes pour former des phagolysosomes [57]. Dans le cas de la DMLA, avec l'âge les bis-rétinoïdes vont s'accumuler de manière progressive et former des agrégats de lipofuscine [58]. Cette accumulation est bien plus rapide dans le cas des patients atteints de Stargardt.

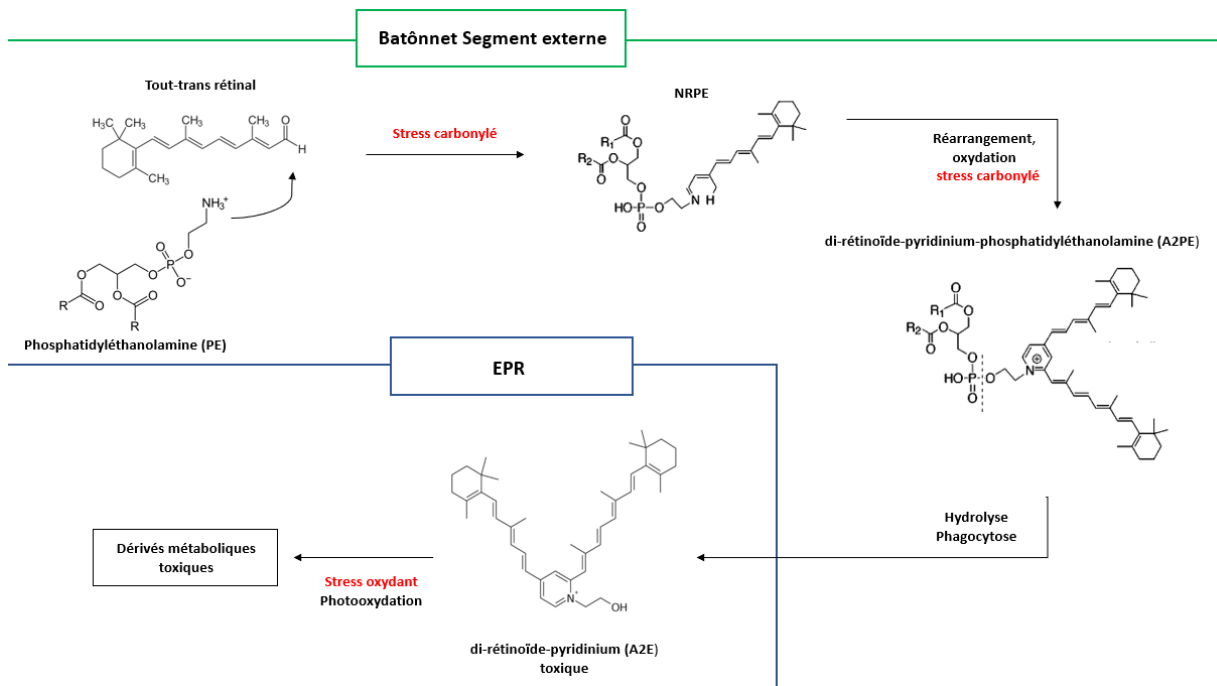


Figure 12 : Schéma de la formation du bis-rétinoïde toxique A2E

Aujourd'hui il n'existe aucun traitement sur le marché pour soigner ou prévenir la DMLA atrophique et la maladie génétique de Stargardt. Trouver un traitement préventif ou curatif est un enjeu de santé publique majeur qui va s'accroître avec le vieillissement de la population. Il est donc urgent de proposer des solutions thérapeutiques nouvelles et innovantes.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons décrit l'anatomie et la physiologie du segment postérieur de l'œil ainsi que le mécanisme du cycle visuel des rétinoïdes. Les origines, les symptômes et les diagnostics de ces pathologies ont été décrits et le mécanisme d'action commun de double stress carbonyle et oxydant à ses 2 pathologies et leurs conséquences expliqués. La connaissance des mécanismes physiopathologiques est indispensable pour comprendre et analyser la maladie et sa progression. Cette connaissance a été le point de départ de cette recherche pour pouvoir réfléchir, développer et proposer de nouvelles molécules d'intérêt capables d'agir sur les mécanismes en question. La compréhension de l'anatomie et de la physiologie de l'œil est également très importante pour comprendre la composition des différentes barrières physiologiques et ainsi améliorer la biodisponibilité des molécules administrées. Le prochain chapitre mettra en lumière les cibles et les traitements en cours de développement clinique et s'attardera sur les molécules développées par le laboratoire pour réduire à la fois le stress oxydant et carbonyle impliqués dans ces pathologies.

Chapitre 2 : Traitements en développement clinique et molécules développées par le laboratoire

Afin de pallier l'absence de traitement, de nouvelles thérapies ont été envisagées pour le traitement de la DMLA atrophique et la maladie génétique de Stargardt. Dans cette partie, nous allons présenter les traitements en phase clinique puis nous nous concentrerons sur les deux dérivés lipophénoliques développés dans notre laboratoire en présentant les résultats ayant permis de mettre en évidence leurs potentiels effets thérapeutiques.

I. Traitements en phase clinique

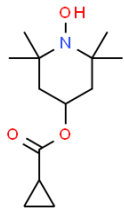
La DMLA atrophique étant une maladie multifactorielle impliquant stress oxydant et carbonylé, inflammation, génétique et facteurs environnementaux (Chapitre 1, partie 3.1), les axes de recherche sont variés et peuvent aller de la formulation d'antioxydants, d'anti-inflammatoires, d'agents neuroprotecteurs, mais aussi à la thérapie cellulaire, la thérapie génique et la thérapie par laser ou la réduction de la production de bis-rétinoïdes.

1.1 Molécules antioxydantes

La progression de la DMLA et de la maladie de Stargardt est fortement liée aux dommages induits par le stress oxydant, les facteurs environnementaux, les rayons UV. Le stress oxydant va entraîner des dommages et la dégénérescence des cellules de l'EPR. Les thérapies en développement clinique pour diminuer ce stress ont été reportées dans le **tableau 1**.

L'étude AREDS correspond à une prise journalière de compléments alimentaires antioxydants composés de vitamine C et E, de bêta-carotène, de cuivre et de zinc. Cette étude a montré une diminution du risque de progression de la maladie de 25%. L'étude AREDS 2 ajoute aux compléments alimentaires de l'étude AREDS de la lutéine, de la zéaxanthine, de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et diminue les doses de zinc et de bêta-carotène.

Tableau 1 : Molécules antioxydantes en phase clinique

Molécule/Etude	Action thérapeutique	Voie d'administration	Phase de développement	Efficacité
Compléments alimentaires (AREDS)	Protection contre le stress oxydant et photo-oxydant	Orale	Phase III	Diminution de 25% de la progression [59]
Compléments alimentaires (AREDS 2)	Protection contre le stress oxydant et photo-oxydant	Orale	Phase II	Diminution de 25% de la progression [60]
OT-551 	Protection contre le stress oxydant et photo-oxydant	Instillation locale	Phase II	Non prouvée [61]
MC-1101	Vasodilatateur avec propriétés antioxydantes	Instillation locale	Phase II/III	<i>En cours d'évaluation</i> (NCT02127463)

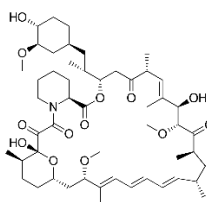
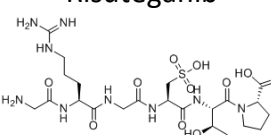
La formule AREDS 2 a montré une efficacité similaire à l'étude AREDS dans la prévention du risque de développer la maladie chez les patients à risque. La molécule OT-551 possède une activité antioxydante et a prouvé son efficacité dans les études précliniques réalisées chez le rat. Cependant, lors du passage en phase clinique, l'étude de phase 2 n'a pas permis de prouver son efficacité après instillation topique. MC-1101 est toujours en cours d'évaluation.

1.2 Molécules anti-inflammatoires

Le processus inflammatoire intervient dans la DMLA notamment par le système du complément [62] qui joue un rôle très important dans le système de défense de l'organisme lors d'une infection par des agents pathogènes. La voie du complément produit notamment la molécule C5 qui forme le complexe d'attaque membranaire (MAC). L'activation chronique de MAC engendrant la mort cellulaire de cellules de l'EPR (une des causes de la DMLA), un des

axes de recherche porte sur l'inhibition du système du complément (**tableau 2**). Cependant, ces traitements sont limités pour une administration par une voie non invasive car il s'agit souvent de molécules de haut poids moléculaire (PM) qui diffusent difficilement au travers des différentes barrières physiologiques [60].

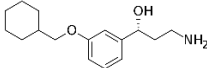
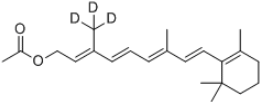
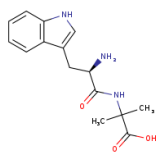
Tableau 2 : Molécules anti-inflammatoires en phase clinique

Traitement	Action thérapeutique	Voie d'administration	Phase de développement	Efficacité
Pegcetacoplan (APL-2)	Inhibition de complément C3	Intravitréen	Phase III	Diminution de 29% de la progression en phase 2 [63]
Rapamicyn 	Immunosuppresseur	Sub conjonctivale	Phase I/II	Non prouvée [64]
Eculizumab (anticorps IgG)	Inhibition de complément C5	IV	Phase II	Non prouvée [65]
Risuteganib 	Inhibition de l'intégrine	Intravitréen	Phase II	Amélioration de l'acuité visuelle [66]
Lampalizumab (fragment d'anticorps monoclonal)	Inhibition du facteur D du complément	Intravitréen	Phase III	Non prouvée [67]
Zimura (aptamère)	Inhibition de complément C5	Intravitréen	Phase II/III	Diminution de 27% de la progression [68]
Tedisolumab	Inhibition de complément C5	Intravitréen	Phase II	Non prouvée [69]

1.3 Inhibiteurs du cycle visuel

Le cycle visuel est essentiel pour renouveler le pigment visuel (rhodopsine) mais il est également responsable de la production de molécules cytotoxiques (A2E et ses dérivés métaboliques) et de l'accumulation de lipofuscine. Un des axes de recherche est de prévenir l'accumulation de ces molécules en limitant des réactions de ce cycle (**tableau 3**).

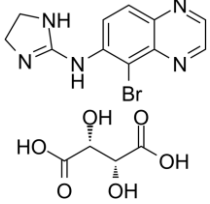
Tableau 3 : Molécules ciblant le cycle visuel en phase clinique

Traitement	Action thérapeutique	Voie d'administration	Phase de développement	Efficacité
Emixustat hydrochloride (EMX) 	Ciblage RPE65 et réduction du tout- <i>trans</i> rétinol	Orale	Phase III	Non prouvée [70]
ALK-001 (C20-D3-vitamine A) 	Réduction de l'accumulation de lipofuscine [71]	Orale	Phase II/III	<i>En cours d'évaluation</i>
GSK933776 (anticorps monoclonal)	Inhibiteur de β -amyloïde (activateur de la cascade du complément)	IV	Phase II	Non prouvée [72]
MRZ-99030 	Empêche la formation d'espèces β -amyloïdes [73]	Instillation locale	Phase II	<i>En cours d'évaluation</i>

1.4 Agents neuroprotecteurs

Les agents neuroprotecteurs agissent sur la réduction de l'apoptose par l'intermédiaire de molécules anti-apoptotiques tels que les facteurs de croissance (**tableau 4**).

Tableau 4 : Molécules neuroprotectrices en phase clinique

Traitement	Action thérapeutique	Voie d'administration	Phase de développement	Efficacité
Tartrate de brimonidine 	Augmente la survie cellulaire	Implant intravitréen	Phase II terminée. Phase III en cours	Diminution de la progression de l'atrophie géographique [74]
Facteur neurotrophique ciliaire (CNTF)	Action sur la survie et la différenciation cellulaire	Implant intra-oculaire	Phase II	Non prouvée [75]

1.5 Thérapie génique

Les thérapies géniques présentées ici agissent soit sur le gène *Abca4* pour la maladie de Stargardt soit sur les gènes codant pour le système du complément (**tableau 5**). La thérapie génétique permet l'administration du traitement en une seule fois [74]. Toutefois, l'American Academy of Ophthalmology recommande d'éviter la thérapie génique du fait de la connaissance incomplète de la pathogénèse génétique de la DMLA.

Tableau 5 : Traitements par thérapie génique en phase clinique

Traitement	Action thérapeutique	Voie d'administration	Phase de développement	Efficacité
SAR422459	Virus recombinant exprimant ABCA4	Sub-rétinien	Phase I/II	Non prouvée [76]
GT005	Vecteur viral adéno-associé codant pour un facteur du complément	Sub-rétinien	Phase II	En cours d'évaluation (NCT03846193)
AAVCAGsCD59	Inhibiteur de la formation de MAC (Membrane Attack complex)	Intravitréen	Phase II	En cours d'évaluation (NCT04358471)

1.6 Thérapie cellulaire

Les cellules de l'EPR permettent le bon fonctionnement des cellules photoréceptrices. Lorsque ces cellules dégènèrent, les cellules photoréceptrices dégènèrent à leur tour entraînant la perte de la fonction visuelle. La thérapie cellulaire (**tableau 6**) permettrait de remplacer les cellules de l'EPR endommagées et essentielles pour le maintien de la fonction visuelle. Les cellules souches qui se différencient en cellules de l'EPR semblent efficaces mais très coûteuses à produire. Pour limiter les risques de rejet des cellules souches, des immunosuppresseurs sont souvent prescrits en même temps. Il existe également un risque de multiplication incontrôlée des cellules qui peut entraîner une croissance tumorale [77].

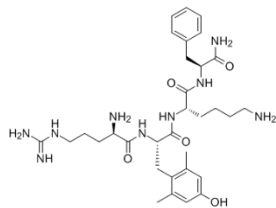
Tableau 6 : Thérapie cellulaire en phase clinique

Traitement	Action thérapeutique	Voie d'administration	Phase de développement	Efficacité
MA09-hRPE	Transplantation de cellules de l'EPR	Transplantation sub-rétinienne	Phase I/II	Augmentation de l'acuité visuelle [78]
Cellules souches embryonnaires humaines (hESC)	/	Transplantation sub-rétinienne	Phase I	Augmentation de l'acuité visuelle [79]
Palucorel	Cellules souches dérivées du tissu ombilical humain	Délivrance sub-rétinienne	Phase II	Non prouvée [80]

1.7 Autres thérapies

D'autres thérapies peuvent permettre la diminution de la progression de ces maladies telles que des traitements au laser ou une nouvelle thérapie ciblant le système mitochondrial (**tableau 7**).

Tableau 7 : Autres thérapies (thérapies au laser ou ciblant la mitochondrie en phase clinique)

Traitement	Action thérapeutique	Voie d'administration	Phase de développement	Efficacité
Laser à micro-impulsions à seuil bas	Diminution du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (anti-VEGF), augmentation du facteur dérivé de l'EPR	/	Phase I	Diminution de la progression de l'atrophie géographique [81]
Laser nanoseconde à seuil bas	Diminution de l'épaisseur de la membrane de Brush	/	Phase III	Non prouvée [82]
Elamipretide 	Augmentation de la production d'ATP et protège la structure mitochondriale	Sous-cutanée	Phase I	Effets positifs sur la fonction visuelle particulièrement en condition de basse luminosité [83]

1.8 Conclusion sur les thérapies en développement clinique

Actuellement, la détection de la DMLA atrophique et de la maladie de Stargardt se fait en grande partie par le suivi des facteurs de risque chez le patient et grâce à la détection précoce de la détérioration visuelle [84]. Une fois le diagnostic posé, le patient est suivi régulièrement pour contrôler l'évolution de la maladie et il lui est fortement suggéré de diminuer son exposition aux facteurs de risques environnementaux tels que le tabac et les UV. Les essais cliniques en cours sur tous les axes présentés sont prometteurs et leurs avancées sont à suivre de près. La plupart des molécules qui ont été stoppées lors des essais cliniques présentaient une faible efficacité ou un ratio bénéfice/risque défavorable. Compte tenu du nombre croissant de patients atteints par ces pathologies, il est important de travailler sur le développement de nouveaux traitements aussi bien curatifs que préventifs.

II. Molécules lipophénoliques développées par le laboratoire

Comme décrit précédemment (chapitre 1, partie 3.3), le tout *trans*-rétinal s'accumule dans le temps et réagit avec la PE via un double mécanisme de stress oxydant et carbonylé. A terme, il se transforme en A2E et en d'autres dérivés métaboliques de l'A2E également cytotoxiques. Le tout-*trans* rétinol présentant lui aussi un effet toxique pour les cellules rétiniennes, il contribue ainsi au mécanisme de dégénérescence. Les actifs ont été développés afin de limiter la formation de l'A2E en diminuant l'étape de stress oxydant et carbonylé à l'origine de sa formation.

Dans l'objectif de proposer un traitement pour la DMLA atrophie et la maladie de Stargardt avec un mécanisme original, des molécules lipophénoliques ont été synthétisées par l'équipe SLB de l'IBMM spécialisée dans la Synthèse de Lipides Bioactis. Le rationnel de ces molécules repose sur une molécule hybride avec, une **partie polyphénolique** pour son **action piègeuse de trans rétinol** et **réductrice d'espèces réactives à l'oxygène (ROS)**, et une **partie lipidique** visant à augmenter la biodisponibilité au sein du tissu rétinien. Une molécule « Lead » : le **phloroglucinol-Oisopropyl-ODHA** (IP-DHA) a été découvert suite à un 1^{er} screening de molécules pour **limiter le stress oxydant et carbonylé** impliqués dans ces deux pathologies induisant la formation d'entités telle que l'A2E (**figure 13**). Dans un 2^{eme} temps, une molécule « back-up Lead » : la **quercétine-7-Oisopropyl-3-ODHA** (Q-IP-DHA) a été synthétisé dans le but d'augmenter le caractère anti-oxydant de la molécule Lead.

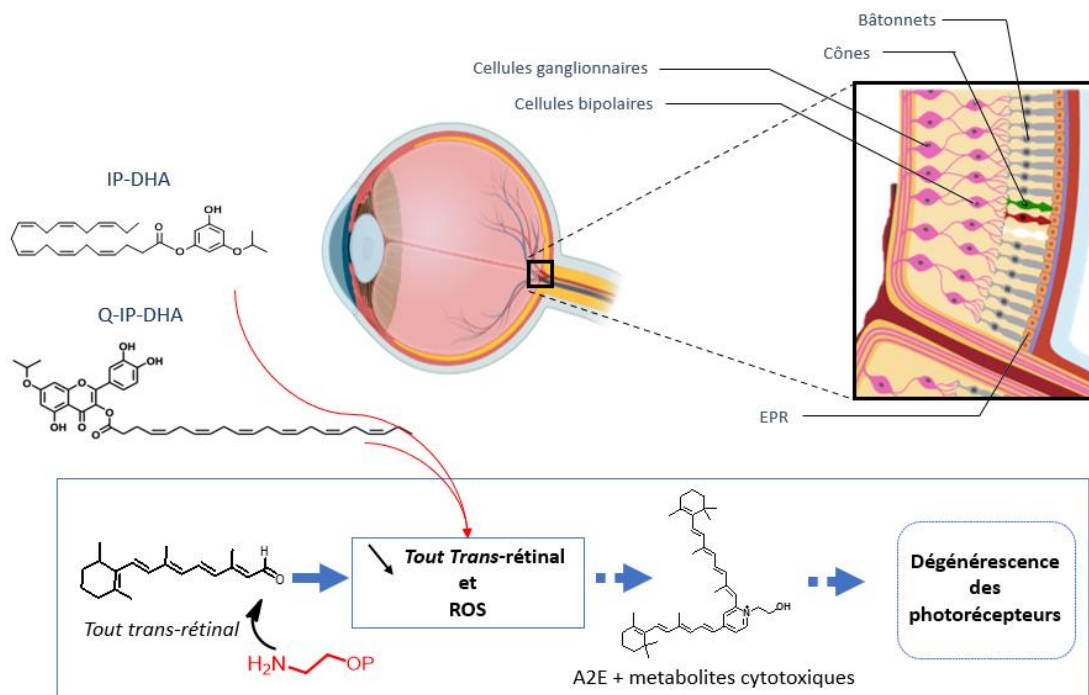


Figure 13 : Mécanisme de la molécule Lead (IP-DHA) et de la molécule backup Lead (Q-IP-DHA) pour limiter le stress oxydant et carbonylé

2.1 Phloroglucinol-Oisopropyl-ODHA (IP-DHA)

Le premier composé développé est le phloroglucinol-Oisopropyl-ODHA (IP -DHA) qui peut être décomposé en 2 parties : une partie phénolique avec le phloroglucinol et une partie lipidique avec le DHA (acide docosahexaénoïque) liées entre elles de manière covalente par une liaison ester. Pour finir, une fonction isopropyle a été ajoutée sur le phloroglucinol (**figure 14**) pour augmenter la nucléophilie de la molécule vis-à-vis de la fonction aldéhyde du tout trans-rétinal et ainsi augmenter potentiellement son action de piégeage directe visant à réduire la concentration en tout *trans*-rétinal.

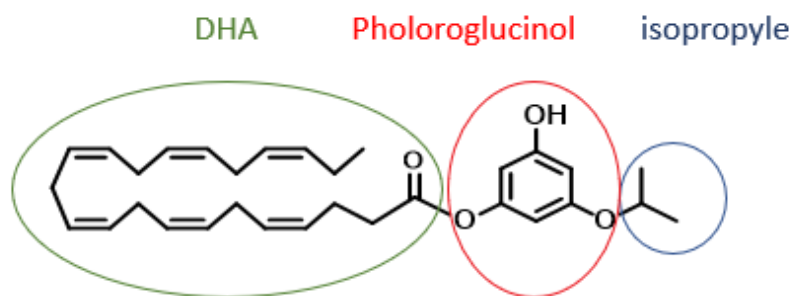


Figure 14 : Structure chimique du phloroglucinol-Oisopropyl-ODHA (IP-DHA)

Cette molécule est issue de l'étude de la bibliographie et de nombreuses expériences. Dans la littérature, les phénols et polyphénols sont bien connus pour leur capacité antioxydante [85] et leur capacité à piéger des entités carbonylées électrophiles (leur permettant de présenter des propriétés anti-stress carbonylé). Le phloroglucinol connu sous la spécialité Spasfon®, a déjà démontré des propriétés antioxydantes sur cellules [86] et une activité de neuroprotection sur des modèles animaux contre la maladie d'Alzheimer [87]. Enfin, des études *in vitro* récentes sur des cellules d'EPR et de photorécepteurs issus de cultures primaires de rat ont démontré l'effet de protection du phloroglucinol sur les cellules rétiniennes contre le stress oxydant et carbonylé (induit par H₂O₂ et le tout-*trans* rétinale) en piégeant le tout *trans*-rétinale et les ROS, diminuant ainsi la formation d'A2E [88].

Pour augmenter le caractère lipophile de la molécule et ainsi sa biodisponibilité et son accès au tissu rétinien, une partie lipidique a été greffée sur le phloroglucinol. Le choix du greffage de la partie lipidique a été fait par rapport à la composition des cellules photoréceptrices. La membrane des disques des photorécepteurs où se concentre le tout-*trans* rétinale est composée à plus de 50% de DHA [89], acide gras polyinsaturé (Oméga 3, C22:6) synthétisé en faible quantité par le foie à partir de l'acide α -linoléique (C18:3). Cet acide gras doit donc être majoritairement apporté par l'alimentation pour subvenir à nos besoins journaliers. De plus, la quantité de DHA retrouvée dans le cerveau et la rétine augmente chez l'animal nouveau-né après des prises régulières de DHA sous la forme de complément alimentaire [90]. Ainsi, en greffant le DHA au phloroglucinol, la lipophilie de la molécule sera augmentée pour faciliter sa pénétration au travers des membranes physiologiques et son accès au tissu rétinien. Le DHA étant indispensable au bon fonctionnement de la rétine, des

supplémentations à forte dose en DHA peuvent réduire la progression de la DMLA [91] et ainsi permettre :

- de renouveler les segments externes par la resynthèse d'une nouvelle membrane [92],
- le maintien de l'activité mitochondriale [93],
- d'apporter des propriétés anti-inflammatoires [94],
- d'apporter des propriétés anti-apoptotiques [95],
- d'apporter des propriétés antioxydantes [96],
- de fluidifier la membrane des disques et favoriser la phototransduction.

Enfin, l'oxydation enzymatique du DHA dans l'EPR permet la formation d'un médiateur spécifique du DHA et plus efficace : la neuroprotectine D1 (NPD1) [97]. La NPD1 induit la survie cellulaire des cellules de l'EPR par régulation positive des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2) [98], inhibition de l'activation de la caspase-3 lors d'un stress oxydant [99], inhibition de l'apoptose induit par l'A2E [100] et inhibition de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) [101]. Face aux potentiels bénéfiques des polyphénols et du DHA, une synergie d'action est également envisageable en utilisant ce type de molécule hybride.

Le phloroglucinol a donc été isopropylylé puis couplé au DHA par une fonction ester pour former l'IP-DHA. L'importance du greffage de la chaîne DHA et de la fonction isopropyle sur l'efficacité de l'IP-DHA a été démontrée *in vitro*, contre le stress oxydant et carbonylé, et elle sera présentée dans les parties suivantes.

2.1.1 Impact du greffage du DHA et de l'isopropyle sur l'efficacité de protection de l'IP-DHA contre le stress carbonylé.

Pour mesurer l'impact du greffage de l'isopropyle et du DHA, une étude de viabilité cellulaire a été réalisée sur cellules ARPE-19, lignée cellulaire de l'EPR avec ces différentes molécules (**figure 15**).

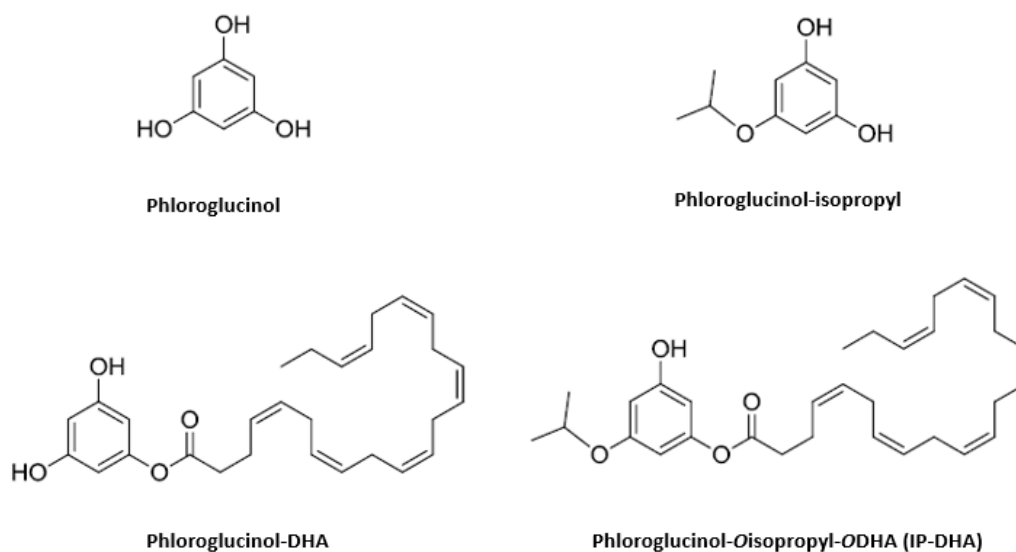


Figure 15 : Molécules testées pour déterminer l'impact de l'isopropyle et du DHA sur la viabilité cellulaire

Les composés : phloroglucinol, phloroglucinol-isopropyl, phloroglucinol-DHA et l'IP-DHA ont été incubés avec les cellules d'EPR à 10 et 40 μ M pendant 1h puis les cellules ont été soumises à un stress carbonylé par l'introduction du tout-*trans* rétinol (noté AtR) à 25 μ M pendant 4h. La viabilité cellulaire a ensuite été mesurée avec un test MTT après 16 à 20h d'incubation. Les cellules non traitées correspondent à 100% de survie cellulaire (contrôle positif) alors que les cellules traitées uniquement avec le tout-*trans* rétinol correspondent au contrôle négatif.

Tableau 8 : Résultats de l'étude de viabilité cellulaire après incubation de différentes molécules [102]

Composés	Survie cellulaire à 10 μ M (%)	Survie cellulaire à 40 μ M (%)
Non traitées (contrôle +)	100	
Tout- <i>trans</i> rétinol (contrôle -)	29,1 \pm 5,4	
Phloroglucinol	35,5 \pm 3,3	41,6 \pm 9,2
Phloroglucinol-isopropyl	30,6 \pm 1,2	32,7 \pm 1,8
Phloroglucinol-DHA	25,8 \pm 3,7	21,9 \pm 3,8
Phloroglucinol-Oisopropyl-ODHA	43,2 \pm 7,5	66,8 \pm 8,6

L'incubation de tout-*trans* rétinol seul induit une mort cellulaire d'environ 70% par rapport aux cellules non traitées (contrôle positif) (**tableau 8**). Le phloroglucinol à 40 μ M permet une amélioration de la survie cellulaire de 10% environ. Le greffage de l'isopropyle ou du DHA sur le phloroglucinol ne permet pas d'augmenter la survie cellulaire de manière significative par rapport au contrôle négatif. Cependant, le phloroglucinol avec les deux greffages isopropyle et DHA à 40 μ M entraîne une augmentation d'environ 36% de la survie cellulaire par rapport au contrôle négatif. Cette évaluation a permis de mettre en évidence l'importance de la présence de ces deux fonctions pour augmenter la survie cellulaire face à un stress carbonyle de type *trans*-rétinal.

2.1.2 Evaluation *in vitro* de l'efficacité de l'IP-DHA contre le stress carbonyle : effet dose -réponse

L'évaluation de l'efficacité de protection de l'IP-DHA a été effectuée sur la lignée cellulaire ARPE-19 de la même façon que le test précédent. Dans cette étude, l'IP-DHA a été incubé sur les cellules ARPE-19 entre 10 et 40 μ M pendant 1h. Le tout-*trans* rétinol a été incubé à la même concentration et pendant le même intervalle de temps.

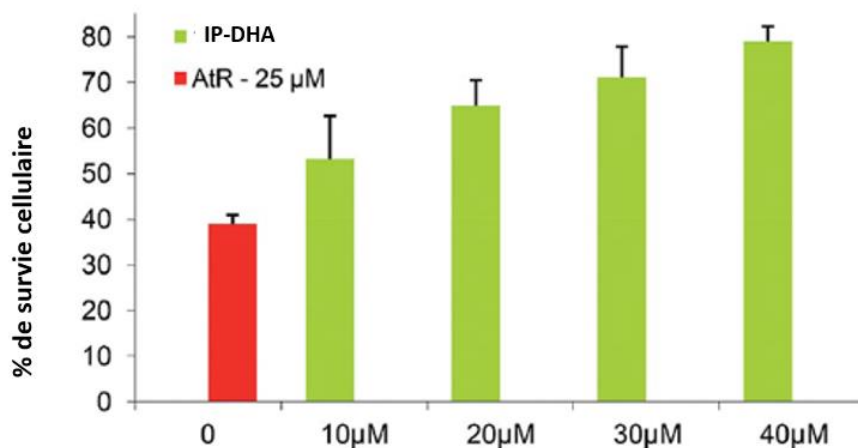


Figure 16 : Résultats de survie cellulaire après incubation de l'IP-DHA (10 à 40 μ M) et de tout-*trans* rétinol à 25 μ M [102]

L'IP-DHA permet une protection des cellules de façon dose dépendante (**figure 16**). Le tout-*trans* rétinol entraîne la mort des cellules de l'EPR, la survie cellulaire observée après son

incubation est de 39%. Avec l'IP-DHA à 40 μ M, la survie cellulaire est d'environ 75% soit une augmentation de 36%.

L'IP-DHA permet donc d'augmenter la survie cellulaire d'une lignée d'EPR de manière significative après l'introduction d'un stress carbonylé produit par excès de *trans*-rétinal retrouvé dans les physiopathologies de la DMLA et de la maladie de Stargardt. Cependant le test ne nous permet pas de savoir si la protection est due à un piégeage direct du tout-*trans* rétinol par l'IP-DHA ou par détoxification enzymatique [102].

2.1.3 Evaluation *in vitro* de l'efficacité de l'IP-DHA contre le stress oxydant

L'activité antioxydante de l'IP-DHA a été évaluée également sur cellules ARPE-19 en mesurant la quantité de ROS produite grâce au greffage d'une sonde fluorescente de diacétate de dichlorodihydrofluorescéine (DCFDA). L'induction du stress oxydant a été réalisée en incubant de l'H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) à 600 μ M sur les cellules pendant 4h. En amont, l'IP-DHA a été introduit dans le milieu cellulaire pendant 1h à différentes concentrations : 10, 40 et 80 μ M (figure 17).

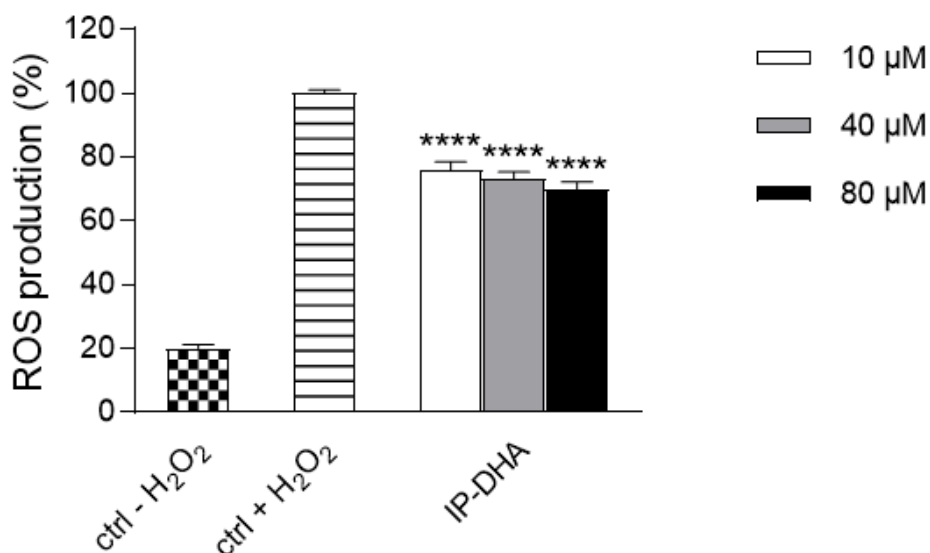


Figure 17 : Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'IP-DHA à différentes concentrations après induction de la production de ROS par de H₂O₂ [103]

L' H_2O_2 permet d'induire la production de ROS, le contrôle positif correspond donc aux cellules traitées uniquement avec H_2O_2 (100% de ROS). Un prétraitement des cellules avec l'IP-DHA permet d'observer une diminution significative de la production des ROS à partir de $10\mu M$ de lipophénol et ce jusqu'à 30% avec $80\mu M$ [103] mais la différence entre un prétraitement à 10 et $80\mu M$ n'est pas significative (efficacité non dose dépendante). Suite à ces premiers résultats *in vitro*, l'IP-DHA a démontré son efficacité contre le stress oxydant et carbonylé sur culture primaire (photorécepteurs et rétine neurale), sa capacité d'activer les systèmes enzymatiques antioxydants de la voie Keap1-Nrf2, d'augmenter l'activité de la catalase et de restaurer l'activité mitochondriale, perturbée par les concentrations toxiques en *trans*-rétinal [104].

Pour conclure, les tests *in vitro* réalisés avec l'IP-DHA permettent de mettre en avant qu'il possède des propriétés d'anti-stress carbonylé intéressantes mais des propriétés d'anti-stress oxydant limitées qui pourraient être améliorées.

2.1.4 Evaluation *in vivo* de l'efficacité de l'IP-DHA contre la dégénérescence induite par la lumière sur modèle souris ABCA4KO

L'évaluation de l'efficacité *in vivo* a été réalisée sur la souris Abca4KO, modèle de la maladie de Stargardt. Dans ce modèle le gène *Abca4* est muté et le transporteur n'intervient pas dans la clairance du NRPE. Son accumulation induit donc une toxicité pour la rétine qui s'observe par une dégénérescence des photorécepteurs. Pour ces études l'IP-DHA a été complexé avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) qui possède des sites de fixations aux acides gras polyinsaturés pour pouvoir l'administrer par voie IV sous forme soluble.

Pour réaliser l'évaluation de l'efficacité, les souris ont été placées dans le noir pendant 24h afin de régénérer le pigment visuel (opsine + 11 *cis* rétinol) puis le lendemain l'IP-DHA a été administré par voie IV à différentes doses (de 5 à 30mg/kg). 15 min après l'administration, les souris ont été exposées à un stress lumineux aigu induit par une lumière blanche (20 000 lux) pendant 2h afin de provoquer la dégénérescence des photorécepteurs. Les souris ont été ensuite placées dans le noir pendant 5 jours avant une double analyse fonctionnelle et morphologique de leurs rétines par électrorétinographie (ERG) et par tomographie à cohérence optique (OCT) (**figure 18**).

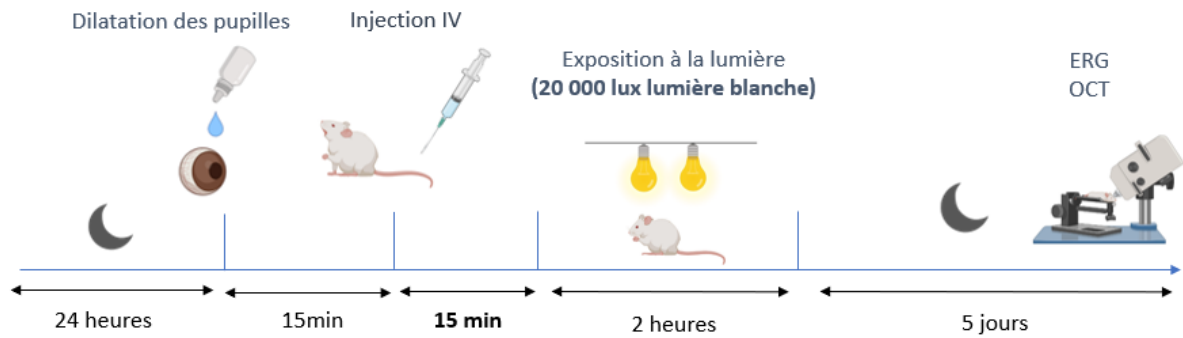


Figure 18 : Protocole d'évaluation de l'efficacité de l'IP-DHA

L'ERG permet de mesurer l'activité électrique de la rétine. Pour cela, 2 ondes sont analysées : l'onde « a » qui correspond à la réponse des photorécepteurs et l'onde « b » qui correspond à la réponse des interneurones. Les maximas d'amplitude de ces ondes sont analysés et une diminution de l'amplitude de l'onde « a » est interprétée comme une perte de l'activité des photorécepteurs.

L'OCT permet de photographier les différentes couches qui composent la rétine, ainsi on analyse l'épaisseur des couches INL et ONL. La couche ONL contenant les photorécepteurs, une diminution de son épaisseur est interprétée comme une perte de l'intégrité des photorécepteurs.

Les souris « Dark adapted (DA) » ne sont pas exposées à la lumière et correspondent à une rétine « saine » (100% de photorécepteurs actifs). L'exposition à la lumière pendant 2h sur des souris non traitées ou traitées uniquement avec le véhicule (BSA) provoque une perte de l'activité des photorécepteurs d'environ 58%. Ainsi, il a été mis en évidence que le traitement par l'IP-DHA permet de préserver l'intégrité et l'activité des photorécepteurs jusqu'à 85% avec une dose de 30mg/kg (**figure 19**). L'effet de l'IP-DHA est dose dépendant.

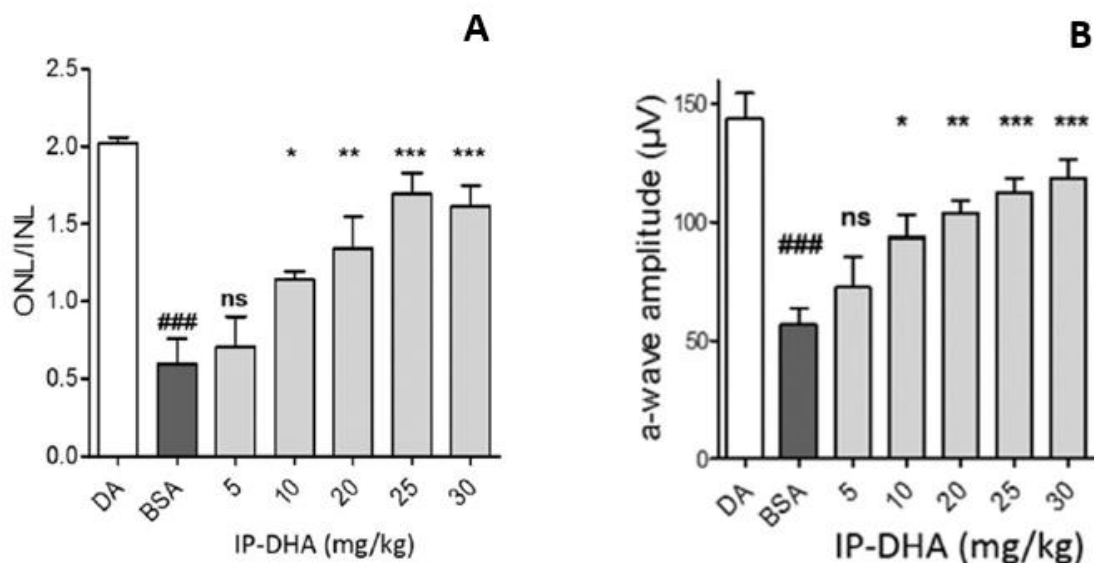


Figure 19 : Résultats OCT (A) et ERG de l'onde a (B) obtenus avec administration d'IP-DHA chez la souris *Abca4KO* après induction d'un stress lumineux aigu [105]

Ces résultats constituent la première preuve de concept d'efficacité *in vivo* d'alkyliphénol et permettent de confirmer le potentiel de l'IP-DHA pour limiter la dégénérescence des photorécepteurs induite par la lumière, chez la souris, modèle de la maladie de Stargardt. L'effet protecteur permet de prévenir la mort cellulaire des photorécepteurs et la photosensibilité de ces derniers [105].

2.2 Quercétine-7-Oisopropyl-3-ODHA (Q-IP-DHA)

Afin d'optimiser l'efficacité, une autre molécule a été développée par le laboratoire. En effet, l'activité antioxydante de l'IP-DHA pourrait être améliorée. Dans cet objectif, l'équipe a évalué le potentiel d'autres polyphénols, dont la quercétine (**figure 20**) qui possède cinq fonctions phénoliques permettant d'augmenter les propriétés antioxydantes [106]. La quercétine est un polyphénol de la famille des flavonoïdes présent principalement dans les fruits et les légumes [107]. Cette molécule suscite beaucoup d'intérêt de par ses propriétés antioxydantes, grâce à sa capacité à limiter les radicaux libres, par chélation des métaux de transition comme le fer ou le cuivre, par l'inhibition d'enzymes génératrices de radicaux libres [108] ou par l'activation d'enzymes antioxydantes par la voie Keap1-Nrf2.

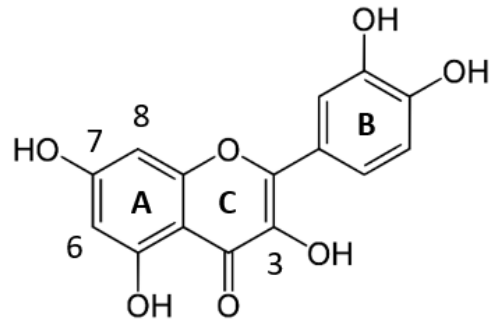


Figure 20 : Structure chimique de la quercétine

La quercétine possède également des propriétés antiinflammatoires par sa capacité à inhiber certaines cyclo-oxygénases [109]. Elle peut comme le phloroglucinol, piéger les aldéhydes réactifs en position 6 et 8 du cycle A et possède donc une action contre le stress carbonylé.

Une nouvelle stratégie synthèse a donc été développée pour la quercétine-7-Oisopropyl-3-ODHA (Q-IP-DHA) (**figure 21**).

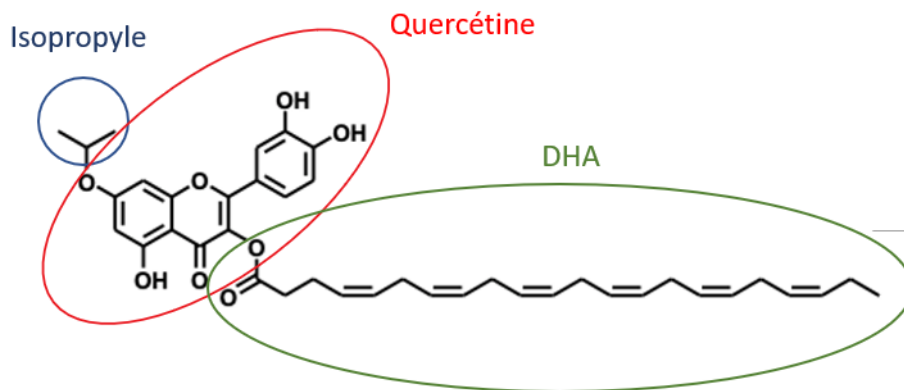


Figure 21 : Structure chimique de la quercétine-7-Oisopropyl-3-ODHA (Q-IP-DHA)

De la même façon que pour l'IP-DHA, la Q-IP-DHA a été étudiée *in vitro* pour évaluer ses propriétés antioxydantes et contre le stress carbonylé. L'intérêt de la partie lipidique et de la position de la fonction isopropyle a été mis en évidence et ses deux fonctions sont apparues,

comme pour la série phloroglucinol, indispensables pour le maintien d'une protection efficace contre le stress carbonylé induit par le *trans*-rétinal (résultats non montrés). Un résumé des résultats de l'évaluation de la Q-IP-DHA est présenté ci-dessous.

2.2.1 Evaluation *in vitro* de l'activité anti-stress carbonylé et antioxydante de la Q-IP-DHA

L'évaluation de l'activité de la Q-IP-DHA a été adaptée à partir du protocole de l'IP-DHA avec incubation de la Q-IP-DHA avec les cellules ARPE-19 pendant 1h à 10, 40 ou 80µM puis ajout du tout-*trans* rétinol à 15µM ou d'H₂O₂ à 600µM pendant 4h. Ensuite, l'évaluation de la viabilité cellulaire ou de la production de ROS a été effectuée pour mesurer l'activité de la Q-IP-DHA contre le stress carbonylé et son action antioxydante.

La Q-IP-DHA permet d'augmenter la survie cellulaire après administration du tout-*trans* rétinol avec un effet dose-réponse. L'effet est significatif à partir de 40µM, la survie cellulaire est de 24% à 80µM (**figure 22A**). Elle permet aussi de réduire la production des ROS de manière dose dépendante ; on observe une diminution de cette production de 38% à 80µM (**figure 22B**).

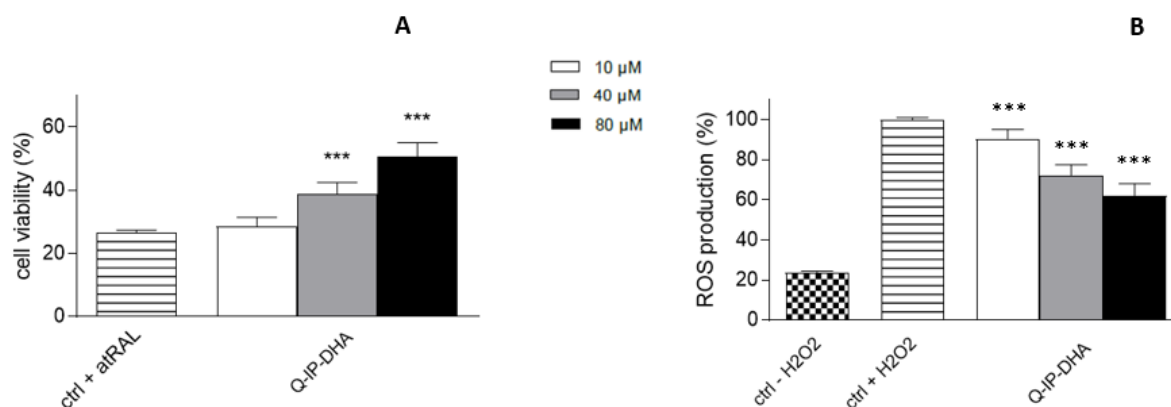


Figure 22 : Activité de la Q-IP-DHA contre le stress carbonylé (A) et contre le stress oxydant (B) sur des cellules ARPE-19 [103]

La Q-IP-DHA présente donc bien comme l'IP-DHA un effet contre le stress carbonylé et antioxydant sur des lignées cellulaires d'EPR ce qui pourrait en faire une molécule candidate

intéressante pour prévenir la maladie de Stargardt et la DMLA atrophique. Une comparaison des deux molécules a donc été réalisée.

2.2.2 Comparaison de l'effet protecteur de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA sur le stress carbonylé et oxydant

Afin de comparer l'efficacité de ces deux composés de manière rigoureuse en s'affranchissant des variations observées d'une manipulation à l'autre (différence de production de ROS, différence de toxicité cellulaire, ...), une seconde étude a été réalisée en incubant la Q-IP-DHA et l'IP-DHA à la même dose (80 μ M) sur une même plaque de culture de cellules ARPE-19 avec une dose identique de tout-*trans* rétinol (15 μ M) ou de H₂O₂ (600 μ M). La survie cellulaire et la production de ROS ont été mesurées de la même manière que les tests précédents.

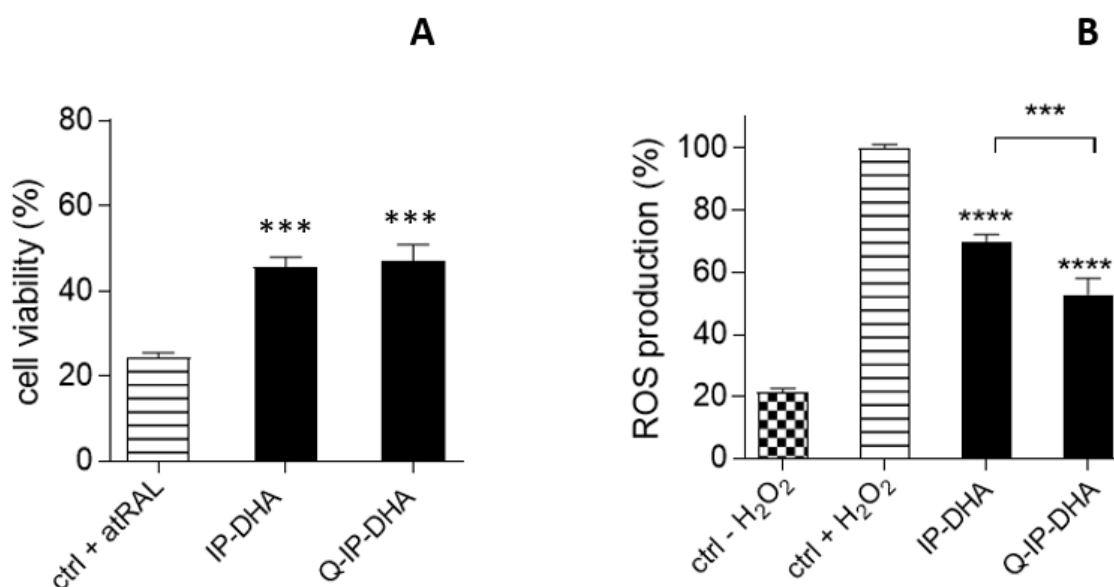


Figure 23 : Comparaison de l'activité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA contre le stress carbonylé (A) et oxydant (B) sur cellules ARPE-19 à 80 μ M [103]

Les activités anti-stress carbonylé de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA dans ces conditions sont similaires et ne montrent pas de différence significative entre les 2 composés (**figure 23A**). Pour l'activité antioxydante (**figure 23B**), on note une diminution de la production des ROS de 30% avec l'IP-DHA et de 47% pour la Q-IP-DHA en présence d'H₂O₂. La Q-IP-DHA montre donc

une meilleure efficacité contre le stress oxydant que l'IP-DHA dans les mêmes conditions d'analyse [103].

2.2.3 Comparaison de l'effet protecteur de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA contre la toxicité induite par la photo-oxydation de l'A2E en cellule ARPE19

L'A2E est un bis-rétinoïde associé à la physiopathologie de la DMLA. L'A2E et ses métabolites formés par photo-oxydation sont cytotoxiques et leur accumulation provoque la mort des cellules de l'EPR, ce qui en fait l'une des causes principales de la dégénérescence maculaire.

Cette étude vise donc à savoir si les 2 molécules d'intérêt peuvent limiter la mort cellulaire induite par la photo-oxydation de l'A2E. Pour cela l'A2E a été incubé à 20 μ M avec les cellules ARPE-19 soumis à une lumière bleue intense pendant 30min afin d'induire une toxicité cellulaire. En amont, l'IP-DHA ou la Q-IP-DHA ont été incubés à 80 μ M sur les mêmes cellules pour évaluer leurs effets protecteurs. La survie cellulaire a été mesurée via un test MTT.

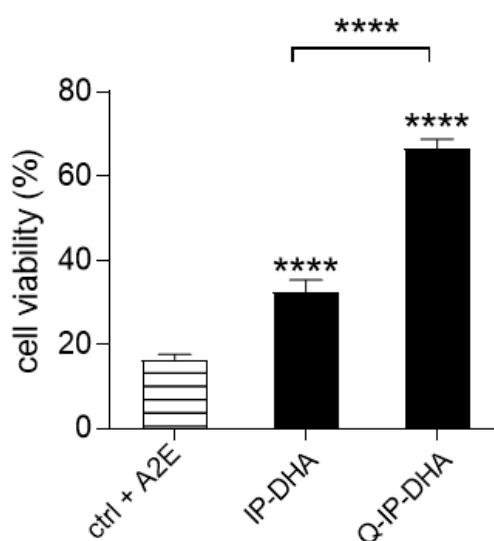


Figure 24 : Effet protecteur de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA contre la photo-oxydation de l'A2E sur cellules ARPE-19 à 80 μ M [103]

La survie cellulaire avec l'IP-DHA à 80 μ M est de 16% et de à 50% avec la Q-IP-DHA (**figure 24**). Les concentrations efficaces 50 (CE50) ont également été déterminées grâce à une étude dose

réponse de l'activité de ces deux molécules (chiffres non présentés). Cette étude confirme les résultats présentés ci-dessus ; la concentration permettant d'induire une survie cellulaire de 50% est de $144.60 \pm 28.1\mu\text{M}$ pour l'IP-DHA et de $15.38 \pm 2.53\mu\text{M}$ pour la Q-IP-DHA. Ce test montre donc bien que la Q-IP-DHA permet de lutter de manière plus efficace contre la toxicité induite par la photo-oxydation de l'A2E que l'IP-DHA, et en fait donc une molécule LEAD intéressante à étudier *in vivo*.

2.3 Conclusion sur les molécules lipophénoliques développées pour lutter contre le double stress oxydant et carbonylé

L'IP-DHA et la Q-IP-DHA ont été développées pour répondre aux besoins des patients atteints de DMLA atrophique et de la maladie génétique de Stargardt qui n'ont actuellement pas de traitement à disposition. Compte tenu du mécanisme commun de ces pathologies incluant un double stress carbonylé et oxydant, plusieurs molécules présentant des propriétés contre ces stress ont été synthétisées afin de réduire la progression de la maladie.

Les phénols et polyphénols possédant des propriétés pour piéger les espèces carbonylées, des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, ont été choisis comme base pour inhiber le mécanisme d'action physiopathologiques de ces maladies. Pour augmenter la lipophilie de la molécule une partie lipidique a été greffée. Le DHA a été choisi car il est naturellement présent en grande quantité dans l'œil et possède également des vertus pour le bon fonctionnement du système visuel.

Ces 2 molécules ont prouvé leur efficacité *in vitro* pour combattre le stress carbonylé et oxydant sur des modèles cellulaires de l'EPR humain : cellules ARPE-19. Les deux molécules présentent une efficacité similaire contre le stress carbonylé et la Q-IP-DHA présente une meilleure efficacité que l'IP-DHA contre le stress oxydant et contre la toxicité induite par la photo-oxydation de l'A2E (**tableau 9**). A ce jour, seul l'IP-DHA a également prouvé son efficacité pour protéger la rétine de la dégénérescence rétinienne induite par un stress lumineux aigu sur un modèle animal de la maladie Stargardt. Il est donc nécessaire d'aller plus loin dans l'évaluation *in vivo* de ces molécules et dans l'exploration de différentes voies d'administration.

Tableau 9 : Comparaison des résultats obtenus avec la molécule Lead (IP-DHA) et backup Lead (Q-IP-DHA)

Tests	IP-DHA	Q-IP-DHA
Activité antioxydante <i>in vitro</i>	+	++
Activité anti-stress carbonylé <i>in vitro</i>	+	+
Protection contre la toxicité induite par l'A2E	+	++
Efficacité par voie iv <i>in vivo</i> (preuve de concept)	+	Non évaluée

Ces études *in vitro* et *in vivo* sont encourageantes et démontrent le potentiel de ces molécules dans le but de prévenir et ralentir la progression de la DMLA et de la maladie de Stargardt. Cependant, pour pouvoir être efficaces, les molécules doivent être formulées pour pouvoir être administrées par voie IV, orale ou topique. Les différentes avancées sur les formulations capables d'optimiser la biodisponibilité des molécules d'intérêt dans le segment postérieur de l'œil seront développées dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 : Voies d'administration et formulations pour atteindre le segment postérieur de l'œil

L'administration de médicaments dans l'œil pour atteindre les tissus intraoculaires est un véritable défi en raison des caractéristiques anatomo-physiologiques de l'œil qui le rend difficile d'accès. En effet l'œil est un organe complexe avec un grand nombre de barrières à contourner ou à pénétrer via différentes formulations pour pouvoir délivrer des molécules d'intérêts thérapeutiques en concentration suffisante.

Les principales voies d'administration utilisées pour atteindre le segment postérieur sont la voie topique (instillation de collyre sur la couche cornéenne), la voie intra-vitréenne (IVT), la voie intraveineuse, la voie orale, la voie péri-oculaire et la voie sous-rétinienne (**figure 25**).

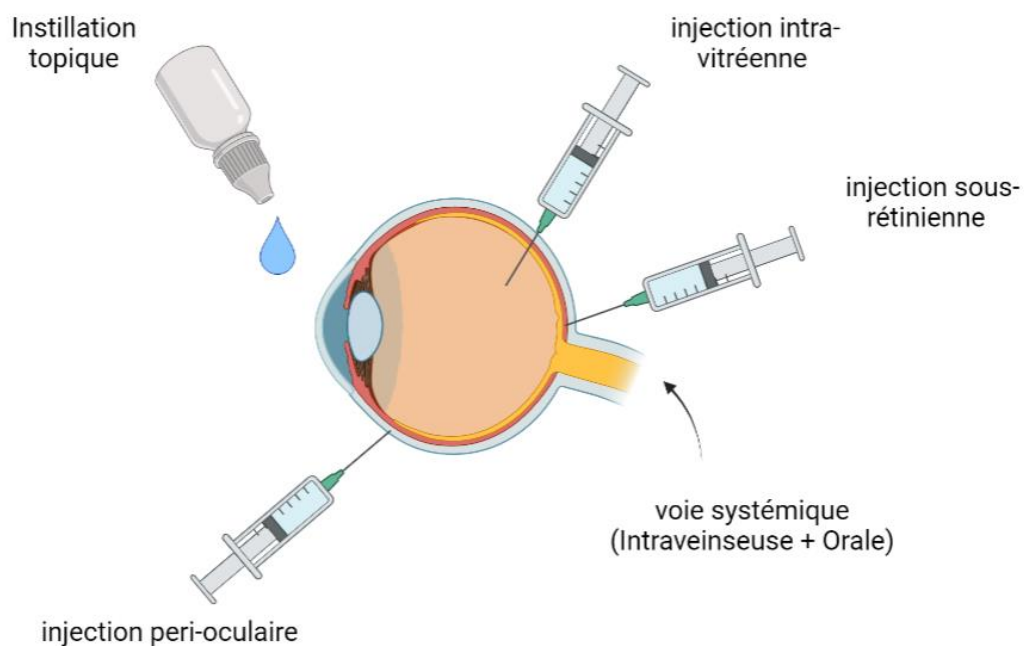


Figure 25 : Les différentes voies d'administrations de SA pour atteindre le segment postérieur de l'œil

Chaque voie d'administration possède des avantages et des inconvénients (**tableau 10**) qui peuvent être exploités ou contournés par des formulations adaptées.

A ce jour, seuls les anti-VEGF administrés par voie IVT (injection dans la vitrée) pour inhiber la néovascularisation choroïdienne dans la DMLA de forme exsudative ont eu l'AMM. Ce traitement permet de limiter considérablement la progression de la maladie avant que le patient ne perde totalement la vue. Il apporte suffisamment de bénéfices pour permettre une

bonne observance du traitement mais peut néanmoins causer des effets secondaires tels que des infections liées à l'injection.

Tableau 10 : Avantages et inconvénients des différentes voies d'administration

Voie d'administration	Avantages	Inconvénients
Topique	Non invasif	Administration fréquente, effets secondaires, faible biodisponibilité [110]
Intra-vitréenne (IVT)	Fréquence d'administration moins élevée, effet local direct et durable administration de doses élevées	Invasif, troubles de la vision au long terme [111]
Péri-oculaire	Moins invasif que l'IVT, moins d'effets secondaires que l'IVT, administration de grands volumes, perméabilité plus élevée que par voie topique	Invasif, biodisponibilité limitée par rapport à l'IVT [112]
Intraveineuse	Doit traverser uniquement la barrière hémato-rétinienne pour atteindre le site d'action	Invasif, faible biodisponibilité, exposition a des tissus non ciblés, effets secondaires [113]
Orale	Non invasif, administration de doses élevées, administration aisée.	Effet de 1 ^{er} passage, faible biodisponibilité, exposition à des tissus non ciblés, effets secondaires [114]

La DMLA de forme atrophique étant une pathologie chronique plus précoce et moins invalidante que la forme exsudative, une administration par une voie invasive (IVT, péri-oculaire, sous-rétinienne ou intraveineuse) ne semble pas être une bonne stratégie pour l'administration de l'IP-DHA ou de la Q-IP-DHA. Il faudra donc privilégier une stratégie d'administration par une voie non invasive. Ce chapitre présentera donc les formes pharmaceutiques pour la voie topique et orale et aussi pour la voie intraveineuse (utilisée afin de valider une preuve de concept de l'efficacité de la molécule active).

I. Instillation topique

La grande majorité des formes pharmaceutiques ophtalmiques actuellement sur le marché est administrée par instillation topique. Il s'agit de la voie la plus pratique pour la prise en charge des pathologies oculaires. Les formes pharmaceutiques administrées par voie topique peuvent être des collyres ou des pommades mais aussi des lentilles de contacts ou des inserts. Ces formes sont majoritairement utilisées pour soigner des maladies du segment antérieur de l'œil mais seulement 5% de la dose administrée y parvient [115] car une grande partie peut être directement éliminée par les larmes ou bien métabolisée ou atteindre d'autres tissus induisant des effets secondaires [116]. La quantité d'actif pouvant atteindre le segment postérieur diminuera lors du passage au travers des tissus rétinien.

1.1 Influence des caractéristiques physico-chimiques des SA sur le passage des barrières physiologiques après une administration topique

Après une administration topique, l'absorption de la SA jusqu'au segment postérieur peut se faire par deux voies en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'actif (**figure 26**) [117]:

- La voie cornéenne : absorption de la SA par la cornée puis passage par la chambre antérieure, le cristallin, la chambre postérieure et la vitrée pour arriver jusqu'au tissu postérieur de l'œil,
- La voie conjonctivale : absorption de la SA par la conjonctive, puis passage par la sclère ou la choroïde avant d'atteindre le segment postérieur.

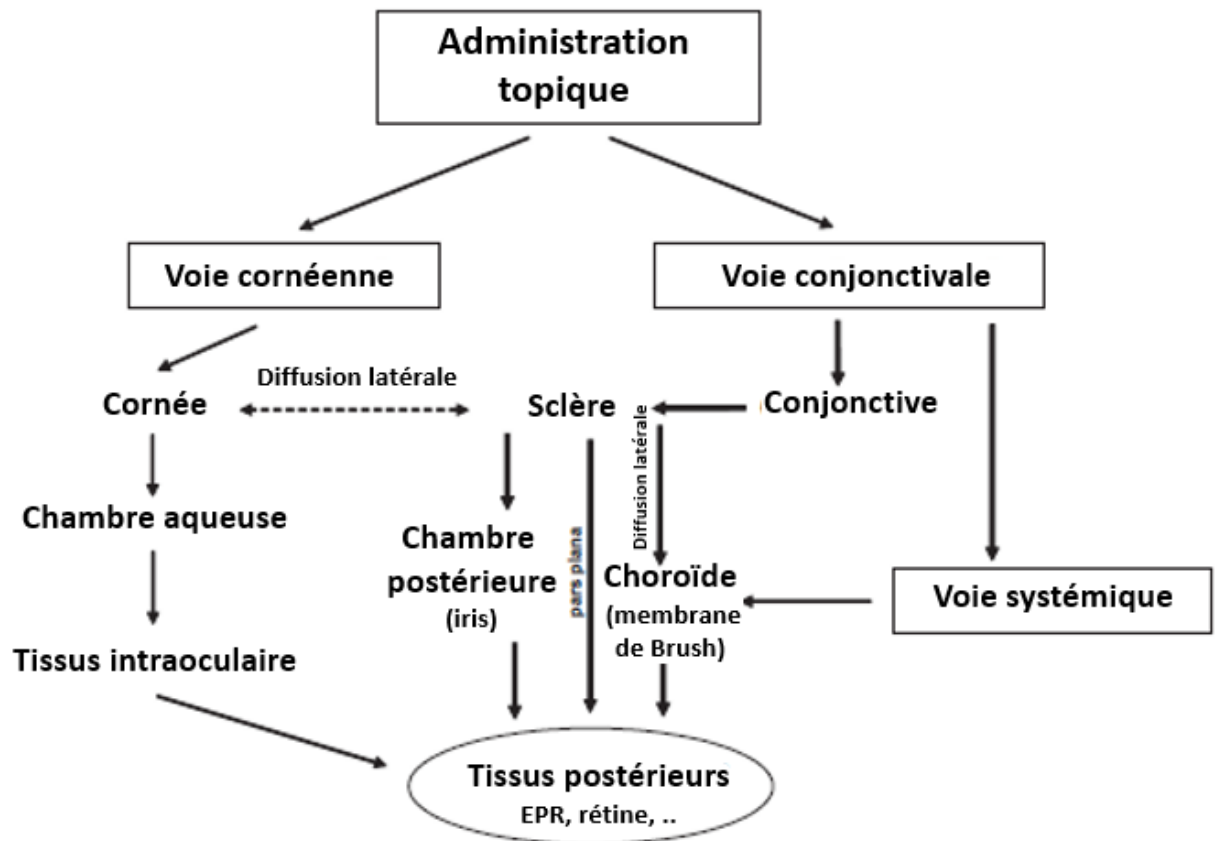


Figure 26 : Voies de distribution d'une SA après une administration topique au niveau de l'œil [118]

L'impact des caractéristiques physico-chimiques des SA pour traverser le film lacrymal (partie 1.1.1), et permettre leur absorption par la voie cornéenne (partie 1.1.2) et par la voie conjonctivale (partie 1.1.3) est décrit ci-dessous.

1.1.1 Le film lacrymal

Le film lacrymal est la première barrière que la SA administrée par instillation topique va rencontrer. Il est constitué d'une couche lipidique, d'une couche aqueuse et d'une couche de mucines (**figure 27**). La couche lipidique va empêcher les molécules hydrophiles de traverser et vice-versa pour la couche hydrophile. La pénétration des molécules très hydrophiles ou très lipophiles sera donc extrêmement limitée contrairement aux molécules amphiphiles. Le volume administrable par instillation topique est généralement faible, de l'ordre de 20 à 50µL. A ce faible volume, il faut aussi prendre en compte la liaison de la SA aux protéines contenues

dans les larmes et le clignement des paupières qui induisent rapidement l'élimination d'environ 95% des SA administrées [119]. Ainsi, seul un faible pourcentage de la dose administrée sera susceptible d'arriver sur le tissu cible.

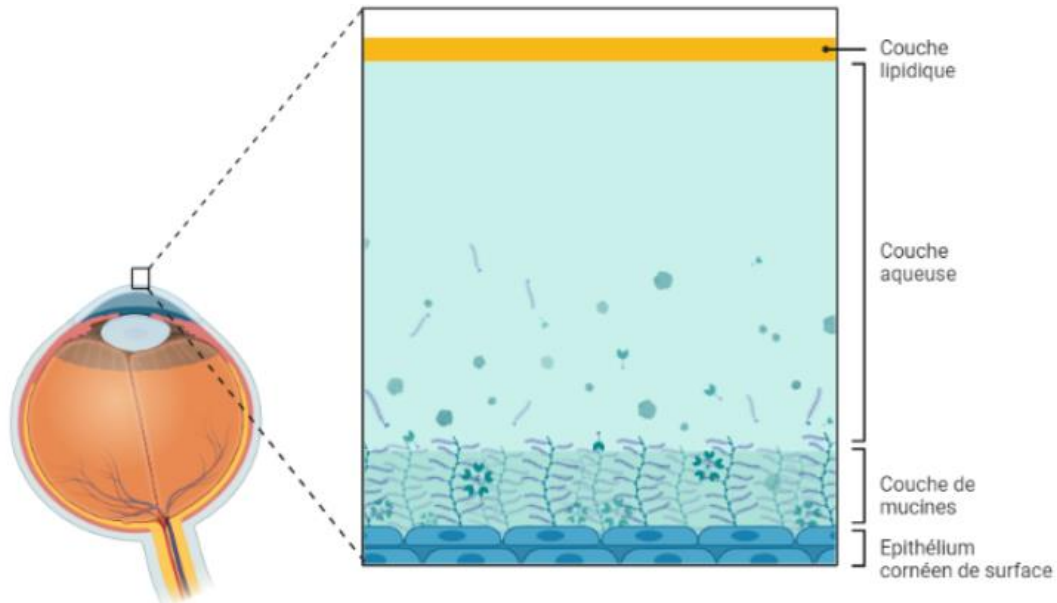


Figure 27 : Représentation schématique de la composition du film lacrymal

1.1.2 Absorption par la voie cornéenne

La cornée est une membrane composée de 5 couches (**figure 28**) : l'épithélium cornéen de surface qui possède des jonctions serrées, il fait office de barrière contre les agressions extérieures [120], La membrane de Bowman qui est formée principalement d'un réseau dense de fibres de collagène de type I, Le stroma qui représente 90% de l'épaisseur de la cornée et qui est constitué d'une substance fondamentale amorphe, de fibres de collagène de type 1, de kératocytes et de fibrocytes [121], La membrane de Descemet, membrane basale transparente, amorphe et élastique constituée de collagène de type IV [122] et l'endothélium qui est une monocouche de cellules squameuses.

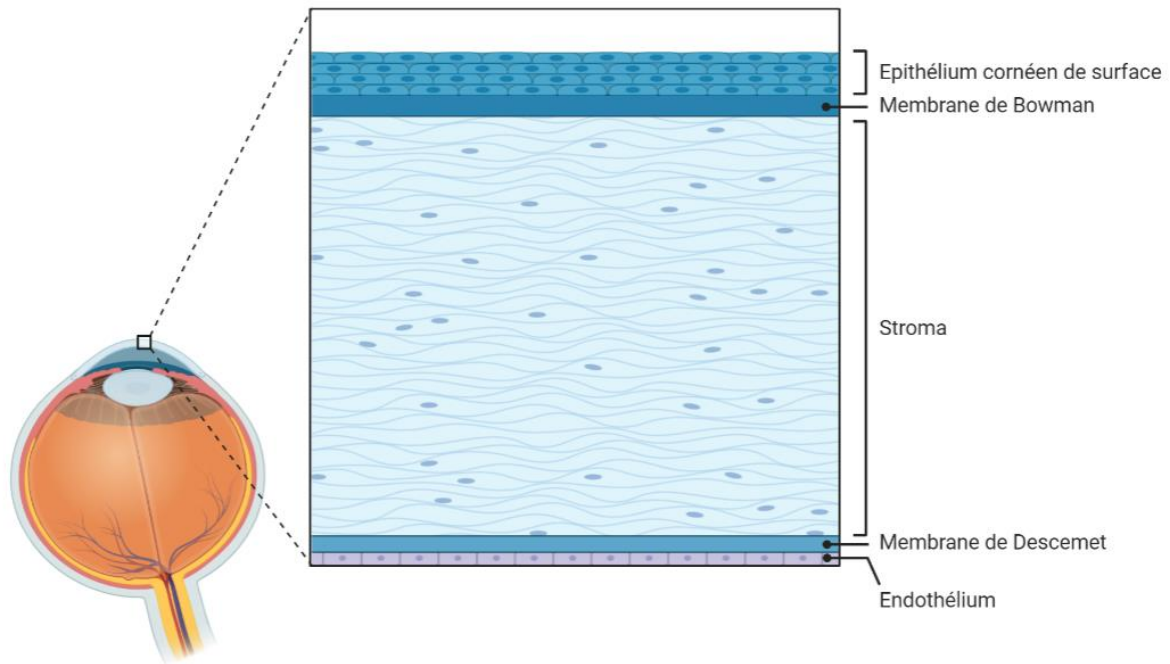


Figure 28 : Représentation schématique de la cornée

Le passage de SA à travers la cornée va dépendre principalement de trois propriétés de la molécule : sa charge, sa masse molaire et son coefficient de partage lipide/eau. La couche épithéliale ainsi que la couche endothéliale représentent des environnements lipophiles alors que le stroma est lui plus hydrophile. Les molécules lipophiles vont donc préférentiellement pénétrer via un passage transcellulaire à travers l'épithélium cornéen alors que les molécules hydrophiles vont pénétrer par passage paracellulaire. Il est admis que les molécules qui pénètrent le mieux à travers la cornée sont des composés ayant un Log P compris entre 2 et 3 [123]. La pénétration paracellulaire est limitée aux molécules hydrophiles de petites tailles < 500 Da en raison du faible diamètre des pores [124]. Pour les molécules chargées, plusieurs études ont montré qu'une molécule chargée positivement pénètre plus facilement à travers la cornée qu'une molécule chargée négativement en raison d'interactions électrostatiques avec les mucines et les glycoprotéines chargées négativement dans l'épithélium [125].

Après passage au travers la cornée, les SA se retrouvent dans l'humeur aqueuse où elles peuvent être métabolisées par différentes enzymes [126]. La SA va pouvoir ensuite diffuser vers l'humeur vitrée. La charge de la SA joue aussi un rôle important dans cette nouvelle étape de diffusion à travers l'humeur vitrée car il a été démontré que les SA chargées

négativement diffusaient mieux que celles chargées positivement [127]. Pour arriver jusqu'à la rétine, les SA doivent ensuite diffuser au travers de la membrane interne de la barrière hémato-rétinienne (BHR) représentée par l'endothélium des capillaires rétiens qui est constitué de jonctions serrées limitant la pénétration par pénétration paracellulaire. Ainsi, les SA lipophiles de petite taille diffuseront plus facilement que les SA hydrophiles pour atteindre la rétine. Les SA peuvent aussi se lier avec la mélanine dans l'iris et le corps ciliaire, réduisant encore leur biodisponibilité

1.1.3 Absorption par la voie conjonctivale

La conjonctive est une fine membrane translucide qui comprend une grande population de lymphocytes [128]. Elle est composée d'une couche superficielle stratifiée non kératinisée et d'un tissu conjonctif lâche sous-jacent [129]. La conjonctive possède des pores de plus large diamètre que ceux de la cornée permettant ainsi à des molécules de plus grande taille de pénétrer (5 -10 kDa). Elle semble être un tissu plus perméable que la cornée [130] mais la présence de nombreux transporteurs d'efflux limite le passage des SA par cette voie [131]. Toutefois, il existe aussi des transporteurs à la surface de la conjonctive qui peuvent permettre un passage actif des SA. Il sera donc intéressant de développer des médicaments ciblant ces transporteurs pour augmenter la biodisponibilité des SA. Enfin, la conjonctive est un tissu vascularisé, permettant ainsi aux PA de rejoindre la circulation systémique par la choroïde.

Après passage des SA au travers de la conjonctive, elles vont pouvoir diffuser dans la sclère. Les molécules hydrophiles pénètrent facilement dans la sclère car elle est composée d'un réseau de fibres de collagène hydrophile, cependant le passage vers le segment postérieur est limité par l'EPR pour les molécules hydrophiles. La diffusion des SA dans la sclère est contrôlée majoritairement par le PM de la molécule [132]. Les petites molécules lipophiles peuvent profiter d'une diffusion préférentielle à travers la membrane de Bruch et l'EPR pour rejoindre les tissus du segment postérieur ; cependant leur passage reste limité à cause des jonctions serrées de l'EPR [133].

1.1.4 Conclusion sur l'absorption des molécules jusqu'au segment postérieur de l'œil après administration topique

Pour pouvoir pénétrer jusqu'au segment postérieur de l'œil, les SA administrées par instillation topique doivent donc diffuser au travers de nombreuses barrières. Les formes pharmaceutiques classiques ne permettent pas d'obtenir une concentration efficace. Depuis quelques années, de nouvelles formulations pharmaceutiques innovantes sont développées pour améliorer la biodisponibilité de SA dans le segment postérieur de l'œil.

1.2 Nanoformulations innovantes pour augmenter la biodisponibilité des SA dans le segment postérieur de l'œil après administration topique

Plusieurs formulations pharmaceutiques ont été étudiées pour augmenter la concentration en SA dans le segment postérieur de l'œil. Parmi elles, les nanoformulations telles que les liposomes, les nano-particules (Nps), les nanoémulsions (NE), et les nano-micelles. Ces formes présentent de nombreux avantages car elles peuvent permettre un effet prolongé de la SA, un meilleur ciblage et une augmentation de la biodisponibilité afin de diminuer la dose administrée ainsi que la fréquence d'administration.

1.2.1 Liposomes

Les liposomes sont des formulations composées de bicouches concentriques de phospholipides naturels ou semi-synthétiques et de cholestérol permettant d'encapsuler des SA hydrophiles ou lipophiles (**figure 29**). Ces formulations sont biocompatibles mais permettent un faible taux de chargement. Une modification de surface des liposomes est possible pour changer leurs propriétés de surface et augmenter encore leur biodisponibilité.

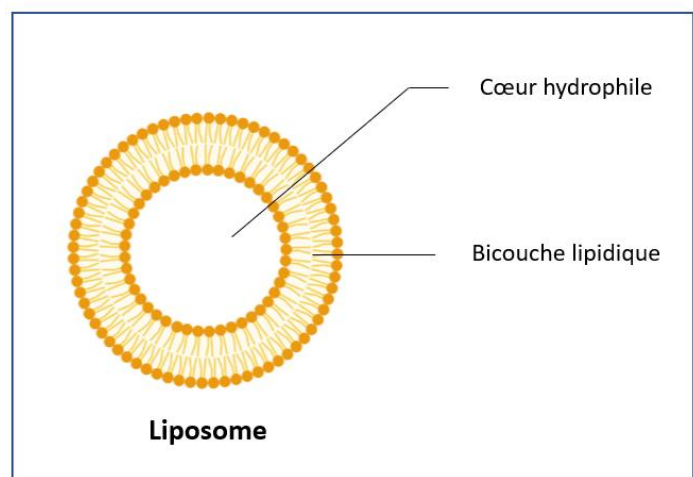
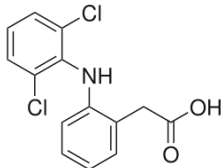
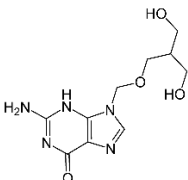


Figure 29 : Schéma d'un liposome

Tableau 11 : Formulations de liposomes pour une instillation topique en étude pré-clinique

SA	Formulation	Observations
<p>Diclofénac</p>  <p>Log P : 4,51</p>	<p>Distearoylphosphatidylcholine (DSPC) et cholestérol (Ch) (8 :1) avec modification de surface PVA</p>	<p>Délivrance dans la rétine et choroïdes 1,8 fois plus importante qu'en solution [134]</p>
<p>Ganciclovir</p>  <p>Log P : -1,66</p>	<p>Phosphatidylcholine (PC), Ch et désoxycholate de sodium (12 :1,7 :1)</p>	<p>Distribution 2 à 10 fois plus élevée dans la sclère, la cornée, l'iris, le cristallin et l'humeur vitrée qu'en solution [135]</p>
<p>Bevacizumab (Anticorps monoclonal)</p>	<p>PC, phosphatidylsérine (PS), Ch et α-Tocopherol (4,5 :1,5 :3 :1)</p>	<p>Augmentation significative de la concentration dans la rétine en comparaison avec l'administration d'une solution [136]</p>

1.2.2 Nano-micelles

Les nano-micelles (10 à 100 nm) sont constituées de surfactants ou de copolymères amphiphiles auto-assemblés au-dessus de la CMC (concentration micellaire critique). Elles sont composées d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile permettant de formuler les SA lipophiles ou amphiphiles (**figure 30**). On retrouve

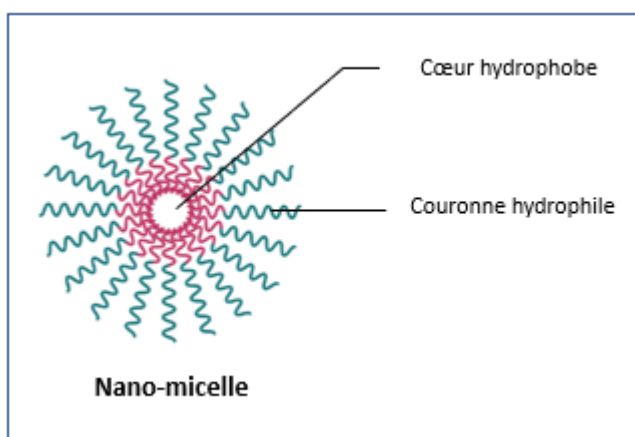
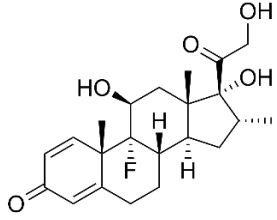


Figure 30 : Schéma d'une nano-micelle

également dans leur composition des polyéthylènes glycols (PEG), polymères hydrophiles inhibiteurs des pompes à efflux P-Gp qui permettent de solubiliser des SA lipophiles. D'autres polymères peuvent également être utilisés tels que des tensioactifs chargés (anioniques ou cationiques) mais sont plus irritants que les polymères non ioniques.

Tableau 12 : Formulations de nano-micelles pour instillation topique en phase pré-clinique

SA	Formulation	Observations
ADN plasmatique	Micelles polymériques de poly(éthylène oxide)-poly(propylène oxide)- poly(éthylène oxide) (PEO-PPO-PEO)	Administration chez la souris en gouttes oculaires : transfert efficace d'un gène fonctionnel aux tissus intraoculaires (épithélium pigmentaire de la rétine et le corps vitré) sur 48 h [137]
Dexaméthasone  Log p : 1,83	Micelles composées de polyoxyl 40 stéarate (P40S) and polysorbate 80 (P80) (7:3)	Mesure de concentrations thérapeutiques de dexaméthasone dans la rétine et la choroïde après administration topique unique et multiple chez le lapin [138]

1.2.3 Nano-particules (NPs)

Les nano-particules (Nps) ont été très étudiées pour leur capacité à traverser les différentes barrières oculaires. Elles peuvent être de plusieurs types :

- Les Nps polymériques : Particules colloïdales polymériques qui adsorbent, fixent ou encapsulent des SA (**figure 31A**). Les polymères synthétiques les plus utilisés sont le polylactide (PLA) et le poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) ; ce sont des polymères biocompatibles et biodégradables qui se dégradent *in vivo* en métabolites naturels (acide lactique et glycolique). La dégradation des polymères peut être modulée en jouant sur leur composition et leur poids moléculaire afin de contrôler la libération des SA encapsulées.
- Les Nps lipidiques nommées « Nanoparticules Lipidiques Solides » (SLN) sont composées de lipides solides à température corporelle (acides gras, esters de glycérol) et de surfactants permettant de stabiliser la structure (**figure 31B**). Elles permettent d'encapsuler des SA lipophiles mais elles sont souvent instables physiquement pendant la conservation. Ce problème a été résolu avec le développement des Nps lipidiques de deuxième génération : « Système Lipidique Nanostructuré » (NLC) (**figure 31C**). Les NLC sont composées de lipides solides et de lipides liquides permettant d'augmenter le taux de chargement en SA et la stabilité. Les SLN et LNC sont biodégradables.

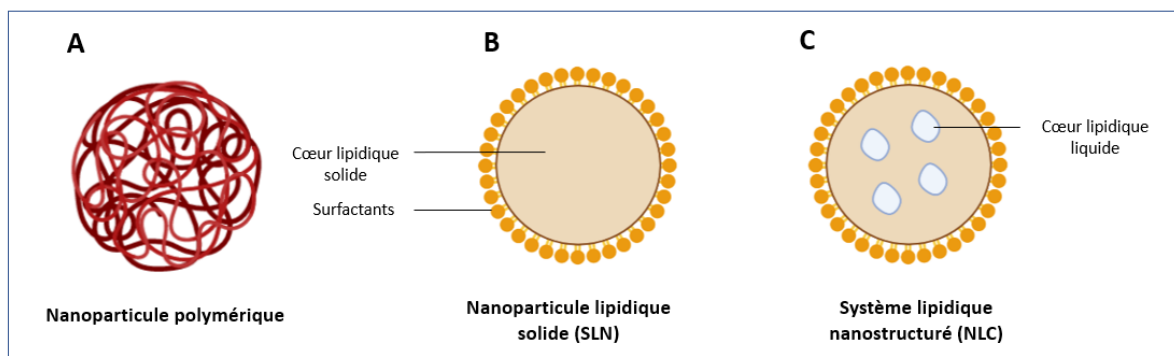
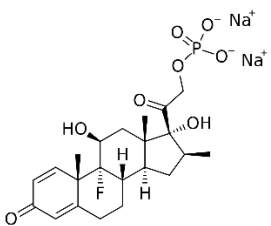
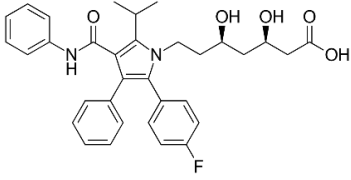
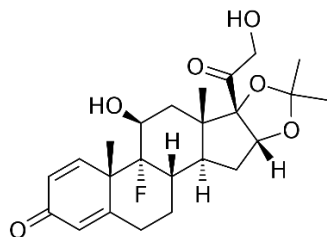


Figure 31 : Schéma des Nanoparticules polymériques, des SLN et des NLC

Tableau 13 : Formulations de NPs administrées par instillation topique en phase pré-clinique

SA	Formulation	Observations
<p>Phosphate de bétaméthasone</p>  <p>Log P : 1,83</p>	<p>Chitosan et alginate de sodium (NPs mucoadhésifs)</p>	<p>Augmentation de la concentration en SA dans l'humeur vitrée (68% à 6h, puis 59,5% à 12h et 34,1% à 24h) par rapport à la SA administrée sans formulation (14,6% après 1h et 0% après 2h) [139]</p>
<p>Atorvastatine</p>  <p>Log P : 6,36</p>	<p>Compritol® 888 ATO, PEG 400, P 188, P 90H (SLN)</p>	<p>Augmentation de biodisponibilité dans l'humeur vitrée d'un facteur 12 après administration de LNC (vs SA en suspension) [140]</p>
<p>Acétonide de triamcinolone</p>  <p>Log P : 2,53</p>	<p>Precirol® ATO5, Lutrol® F68, Squalene®, rac.-1-oleoylglycerol et marqueur fluorescent (NLC)</p>	<p>Pic de fluorescence dans la plexiforme interne 40mins après administration sur souris (fluorescence jusqu'à 3h après instillation) Rétention prolongée suivie d'un passage par voie cornéenne et non cornéenne [141]</p>

1.2.4 Nanoémulsions (NE)

Les nanoémulsions sont constituées de deux liquides non miscibles ; un liquide est dispersé sous forme de gouttelettes stabilisées par des tensioactifs (TA) dans l'autre liquide (**figure 32**). Les tensioactifs peuvent aussi augmenter la perméabilité cellulaire ; attention à sélectionner des tensioactifs non irritants pour l'œil. Comme pour les

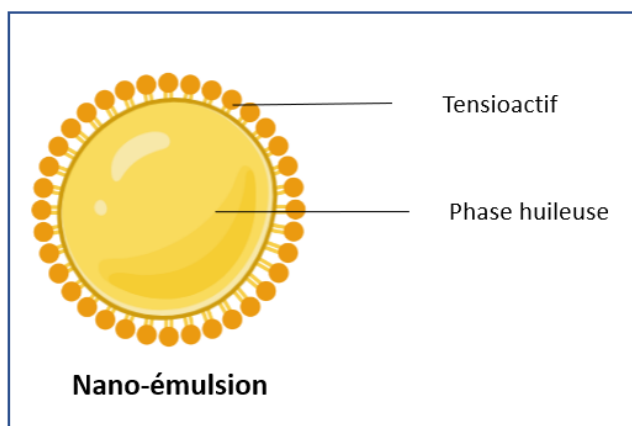
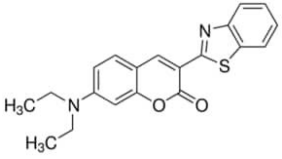


Figure 32 : Schéma d'une nanoémulsion

liposomes, la surface des nanoémulsions peut être modifiée pour augmenter la biodisponibilité des SA.

Tableau 14 : Formulations de NE administrées par instillation topique en phase pré-clinique

SA	Formulation	Observations
<p>Coumarin-6</p>  <p>Log P : 4,9</p>	<p>NE de 100nm avec modification de surface : chitosan et poloxamer-407 (propriétés muco-adhésives et charge positive)</p>	<p>Fluorescence plus importante dans la rétine (souris) pour les NE avec modification de surface comparée aux NE non modifiées [142]</p>
<p>RUNX1 (inhibiteur de facteur de transcription)</p>	<p>NE de lécithine et de myristate d'isopropyle</p>	<p>Freine la progression de la maladie dans un nouveau modèle de la vitréorétinopathie proliférative (lapin) [143]</p>

1.2.5 Conclusion sur les nanoformulations en phase pré-clinique pour une administration topique

L'œil est protégé par des barrières anatomiques et physiologiques qui lui permettent de résister aux agressions extérieures mais qui sont des obstacles majeurs à la pénétration des PA dans les tissus du segment postérieur de l'œil. Par conséquent, la majorité des formes pharmaceutiques conventionnelles présentes sur le marché, administrées par instillation

topique ne permettent pas d'obtenir des concentrations efficaces en SA pour le traitement des maladies du segment postérieur de l'œil.

Les voies IVT et péri-oculaires permettent d'atteindre les tissus du segment postérieur cependant elles peuvent entraîner des effets secondaires importants et ne sont pas adaptées pour des maladies chroniques nécessitant des injections fréquentes. Au cours des dernières décennies, de nombreuses formulations topiques ont été développées pour augmenter la biodisponibilité de SA hydrophiles et lipophiles dans le segment postérieur de l'œil. Ces formulations doivent être composées d'excipients biocompatibles non irritants pour une bonne tolérance oculaire et ainsi une bonne observance du traitement. Ces formes pharmaceutiques présentent un grand potentiel compte tenu des données pré-cliniques disponibles.

II. Voie intraveineuse (IV)

La voie intraveineuse (IV) permet d'administrer les SA directement dans la circulation systémique et donc d'être immédiatement biodisponible. Toutefois, dans le cas du ciblage des tissus rétiniens, il a été déterminé que seulement 2% de la dose administrée va pouvoir rejoindre la choroïde [144] nécessitant l'administration de doses élevées et répétées. Administrés à fortes doses, les SA peuvent diffuser dans de nombreux tissus (absorption non spécifique) et induire des effets secondaires [145].

Bien que cette voie soit très invasive et non adaptée pour le traitement des maladies oculaires chroniques telles que la DMLA et la maladie de Stargardt, il est intéressant de l'utiliser en phase pré-clinique afin de déterminer si les SA en cours d'étude peuvent diffuser à travers la barrière hémato-rétinienne (BHR) et avoir un effet afin de valider la preuve de concept de notre étude. L'administration par voie orale restera la voie la plus adaptée pour le traitement des pathologies chroniques.

L'IP-DHA et la Q-IP-DHA étant des SA lipophiles quasiment insolubles dans l'eau (Chapitre 4, partie 3), nous nous sommes donc intéressés dans ce chapitre aux formulations de la voie IV capables de solubiliser des SA lipophiles. Dans le paragraphe suivant, nous allons donc décrire le rôle de la BHR dans la biodisponibilité des SA pour pouvoir ensuite analyser les avantages

et inconvénients des formulations utilisées pour le traitement des pathologies oculaires du segment postérieur.

2.1 Influence de la barrière hémato-rétinienne (BHR) sur le passage des SA de la circulation générale jusqu'au segment postérieur de l'œil

La barrière hémato-rétinienne (BHR) (**figure 33**) est une barrière physiologique très restrictive qui régule les flux d'ions, de protéines et d'eau présents dans le sang et qui pénètrent et sortent de la rétine [146] pour maintenir l'homéostasie de la rétine neurale. Parallèlement, elle limite grandement la pénétration des SA jusqu'à la rétine après une administration IV.

La BHR est divisée en 2 parties [147]:

- l'EPR : partie extérieure de la BHR
- la partie interne de la BHR composée de l'endothélium des capillaires rétiniens

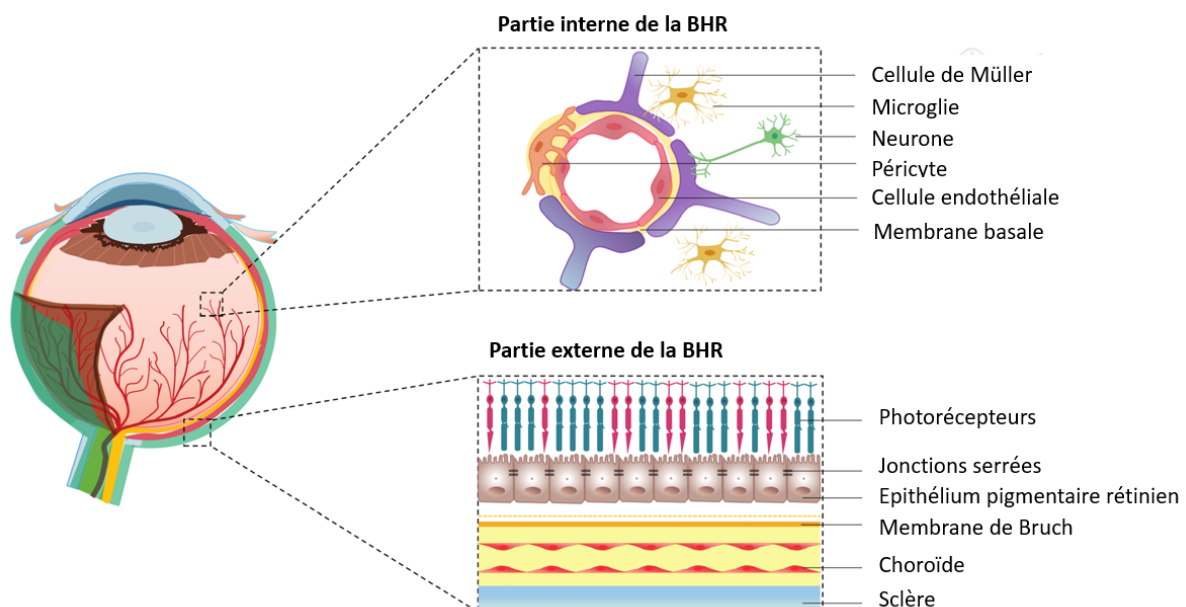


Figure 33 : Structure de la BHR [146]

L'endothélium des capillaires rétiniens constitué de jonctions serrées, est situé entre la rétine et l'humeur vitrée qui limite donc le passage des SA présentes dans l'humeur vitrée vers la rétine. Ici nous parlerons principalement de l'EPR qui régule l'absorption des SA de la choroïde jusqu'à la rétine neurale.

L'EPR (Chapitre 1, partie 2) est situé entre la membrane de Bruch vascularisée par la choroïde et la rétine neurale. Il possède des jonctions serrées ce qui le rend très peu perméable aux molécules polaires et aux ions [148], et limite l'absorption paracellulaire. Il sépare la rétine neurale des choriocapillaires fenêtrés. La perméabilité des SA à travers l'EPR se fait principalement par voie passive et est déterminée par des facteurs physicochimiques (PM, lipophilie, charge). Elle dépend aussi de l'affinité de la SA pour les transporteurs présents à la surface de l'EPR, comme Na⁺/K⁺-ATPase, P-glycoprotéine (P-gP), la Multidrug Resistance Proteins (MRP1) et les transporteurs à cassette liant l'ATP (ABC) [149]. Il a été démontré que seules les petites molécules lipophiles peuvent facilement pénétrer à travers l'EPR par passage transcellulaire [150].

2.2 Stratégies développées pour traiter des pathologies du segment postérieur de l'œil par voie IV

Les SA étudiées dans ce travail de thèse sont des molécules lipidiques de faible PM qui devraient donc pouvoir diffuser à travers l'EPR contrairement aux molécules hydrophiles. Cependant, les SA lipophiles doivent être solubilisés dans des excipients compatibles pour la voie IV afin de pouvoir être administrés. Les formulations développées doivent être homogènes, stériles et elles ne doivent pas reprécipiter dans le sang après administration.

De nombreuses formulations et techniques ont été développées pour pouvoir administrer des SA faiblement solubles dans l'eau par voie IV. Nous allons détailler dans la suite de ce chapitre les techniques par ajustement de pH [151], l'utilisation de co-solvants et de surfactants [152], et des formulations telles que les micelles [153], les cyclodextrines [154], les émulsions [155] ou les liposomes [156].

2.2.1 Ajustement du pH

Les molécules ionisées sont plus solubles dans l'eau que les molécules non ionisées du fait de leur plus grande polarité. Ainsi en ajustant le pH de la solution on peut favoriser la formation de la forme ionisée d'une molécule possédant dans sa structure des groupements ionisables. En ajustant le pH du milieu à ± 2 unités de pH du pKa de la molécule, nous assurons une ionisation complète. Pour cela, nous utilisons des tampons basiques pour les molécules acides

et inversement pour les molécules basiques [157]. Ainsi, la ciprofloxacine est solubilisée dans un tampon d'acide lactique [158] et la phénytoïne après addition d'hydroxyde de sodium pour pouvoir être administrée par voie IV [159].

2.2.2 Utilisation de co-solvants et de surfactants (formation de micelles)

Les co-solvants et surfactants sont des solvants miscibles dans l'eau qui peuvent solubiliser les SA hydrophobes. Ainsi, ils permettent de diminuer la tension interfaciale entre les SA hydrophobes et l'eau, augmentant ainsi la solubilité des SA [160]. Les formes commercialisées utilisent le plus souvent du propylène glycol, des PEG 400 et de l'éthanol. L'utilisation de certains surfactants seuls permet d'augmenter la solubilité des SA par leur capacité à former des micelles lorsqu'ils sont utilisés au-dessus de leur concentration micellaire critique (CMC), d'augmenter la stabilité lorsque les SA sont solubilisées dans ces micelles et permet d'éviter la précipitation de la SA après dilution [161].

2.2.3 Cyclodextrines

Ce sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités de D-glucopyranose. Elles possèdent une cavité interne lipophile et une surface externe hydrophile ce qui permet de solubiliser des SA lipophiles en formant des complexes d'inclusions [162]. Elles possèdent un poids moléculaire élevé entre 1000 et 2000Da [163]. Les plus utilisés sont les β -cyclodextrines. Leur complexation avec des molécules lipophiles est dépendante de la structure de la molécule ce qui constitue une limitation à leur utilisation.

2.2.4 Nanoformulations

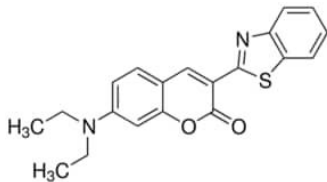
Les nanoformulations décrites pour la voie topique (chapitre 3, partie 1.2) sont également utilisées pour la voie IV. Les liposomes décrits pour la voie topique (chapitre 3, partie 1.2) sont également utilisés pour la voie IV pour des applications en oncologie mais aussi pour la délivrance de vaccin ou en imagerie médicale par exemple. Les liposomes ne permettent pas un taux de chargement élevé et peuvent être instables (fuite) [164]. Les nano et micro-émulsions peuvent aussi être administrées par voie IV, la taille des émulsions pouvant varier en fonction des huiles et surfactants utilisés. L'avantage des émulsions est de permettre un taux de chargement en SA assez élevé [165]. Les Nps peuvent également être administrées

par voie IV. Globalement les nanoformulations permettent de disperser des SA insolubles dans l'eau, de protéger les SA de la dégradation, d'augmenter le temps de résidence de la SA dans le sang et une meilleure pénétration dans certains tissus.

2.2.5 Exemples de formulations développées pour la voie IV ciblant le segment postérieur de l'œil

Récemment des formulations ont été étudiées pour pouvoir cibler la choroïde et le segment postérieur de l'œil afin de réduire les effets secondaires et augmenter la concentration de SA dans le segment postérieur de l'œil. Parmi elles, on retrouve une formulation qui est déjà commercialisée pour le traitement de la DMLA exsudative : Visudyne® permettant un traitement PDT (photo-dynamique) efficace [166]. Les autres formulations en cours de développement pour cibler le segment postérieur sont décrites dans le **tableau 15**.

Tableau 15 : Exemples de formulations développées pour l'administration par voie IV (traitement de pathologies du segment postérieur de l'œil en phase pré-clinique)

SA	Formulation	Observations
Poly-L-lysine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine [FITC-P(Lys)] pour traiter la néovascularisation des tissus du fond de l'œil	Nanomicelles de polyéthylène glycolblock-poly- α,β -acide aspartique	C _{max} = 4h dans la rétine et choroïde Détection de la SA jusqu'à 7 jours après une seule administration chez le rat [167]
Sans SA	Nanoparticules d'or de 20nm	Diffusion au travers du BHR Distribution dans la rétine. Pas de diffusion avec Nps de 100nm [168]
CNO3 (analogue de l'inhibiteur cGMP) pour traiter la dégénérescence rétinienne	Liposomes PEGylés de glutathion ciblant le transporteur GSH (sur partie apicale de l'EPR)	Délivrance de CNO3 dans la rétine neurale, amélioration du temps de circulation, augmentation de la biodisponibilité, préservation la fonction rétinienne [169]
Coumarin-6  Log P : 4,9	Nanoparticules de PLGA	Pénétration de la coumarin-6 en 15min à travers la BHR [170]

Ces exemples démontrent bien que des SA hydrophiles et lipophiles peuvent traverser la BHR et atteindre le segment postérieur de l'œil grâce à une stratégie de formulation adaptée par voie IV. La biodisponibilité des SA peut être modulée grâce aux formulations.

III. Voie Orale

La voie orale représente la voie d'administration la plus utilisée car elle est la mieux acceptée par le patient notamment pour le traitement de pathologies chroniques ; elle permet une administration de doses élevées et fréquentes. Cependant, cette voie présente des limites pour les SA avec une faible solubilité en milieu aqueux, une faible perméabilité, ou présentant une dégradation ou métabolisation importante. Tous ces facteurs vont réduire la biodisponibilité de la SA [171].

3.1 Problématique des SA faiblement soluble dans l'eau

L'absorption du PA à travers les entérocytes du tractus gastro-intestinal (TGI) va dépendre de plusieurs facteurs : des caractéristiques physico-chimiques de la SA, des facteurs physiologiques et de la forme pharmaceutique. Amidon *et Al.* ont développé un système de classification biopharmaceutique (BCS) (**figure 34**) pour classer les SA en fonction des paramètres qui contrôlent le plus l'absorption par voie orale [172] à savoir la solubilité de la SA dans le milieu gastro-intestinal (GI) et sa perméabilité à travers la membrane intestinale.

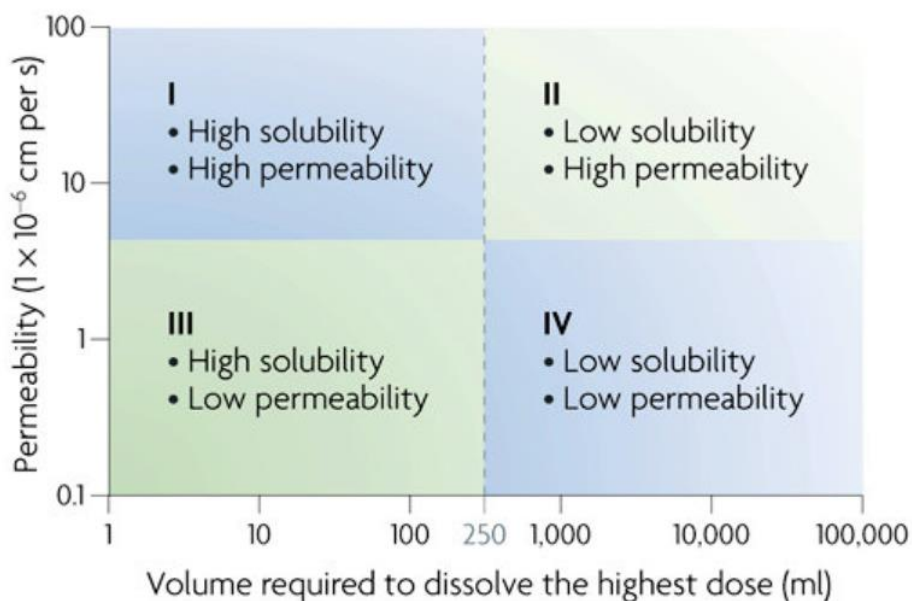


Figure 34 : Système de classification biopharmaceutique [173]

En effet, la solubilité des SA dans le milieu GI est un prérequis indispensable pour l'absorption de la molécule. Une faible solubilité entraîne donc une absorption limitée et donc une faible biodisponibilité de la SA [174]. Parmi les molécules récemment étudiées, de nombreuses molécules sont lipophiles et donc faiblement solubles dans l'eau. Ces dernières décennies, avec la commercialisation d'excipients lipidiques capables d'améliorer la solubilité et la biodisponibilité des composés faiblement solubles dans l'eau, le développement de systèmes lipidiques à base de lipides (LBDDS) a fortement augmenté [175,176]. Les excipients lipidiques pouvant être digérés dans le TGI vont aussi jouer un rôle déterminant dans l'amélioration de l'absorption des SA lipophiles [177]. La connaissance du devenir des lipides dans le TGI est importante pour sélectionner les excipients lipidiques adaptés à la SA.

3.2 Devenir des formulations lipidiques après administration *per os*

L'intérêt des formes lipidiques (LBDDS) vient de la découverte de l'effet d'un repas riche en graisses sur l'augmentation de la biodisponibilité des SA lipophiles [178]. Les lipides présents dans les graisses stimulent les réponses physiologiques [179] telles que la sécrétion biliaire et pancréatique, la stimulation du transport lymphatique, le temps de séjour des aliments et des SA ainsi que la perméabilité de la paroi intestinale [180]. On observe également une réduction de l'activité des transporteurs d'efflux et du métabolisme [181]. Tous ces phénomènes contribuent, dans la plupart des cas, à l'augmentation de la biodisponibilité des SA lipophiles, cependant certaines SA lipophiles sont insensibles à cet effet repas.

En effet, il a été observé que l'effet repas n'a pas d'impact sur les SA de BCS classe I (solubilité et perméabilité élevée) (**figure 34**) car ils peuvent facilement traverser la membrane par diffusion passive ; les lipides vont saturer les transporteurs d'efflux et d'absorption. Par contre, l'absorption des SA de BCS classe II (faiblement soluble et perméabilité élevée) augmente avec l'effet d'un repas riche en graisse car la solubilité des SA est augmentée grâce à la formation de micelles avec les sels biliaires [182]. La quantité de SA biodisponible dans la lumière intestinale augmente et passe plus facilement par diffusion passive, du fait de leur lipophilie. Les composés de BCS classe III (solubilité élevée, faiblement perméable) sont solubilisés dans le milieu intestinal mais ne peuvent pas passer par diffusion passive à travers les entérocytes. Utilisant les transporteurs d'absorption, ils se retrouvent en compétition avec

les lipides présents en grande quantité [183]. Enfin, pour les composés de BCS classe IV, il est difficile de prédire l'influence de l'effet repas [184] car ils pourraient se comporter comme des SA de classe III après un repas par l'augmentation de leur solubilité (solubilisation micellaire) mais ils seront toujours faiblement perméables à cause de la saturation des transporteurs d'absorption.

Globalement, la biodisponibilité des différents SA (classe I à IV) va dépendre grandement de l'amélioration de leur solubilisation et du comportement des lipides (issus des repas ou des excipients utilisés pour la formulation) dans le TGI. Il est donc important de comprendre les mécanismes qui régissent ces transformations allant de la digestion des lipides jusqu'à leur distribution dans les tissus à partir de la circulation générale pour pouvoir développer des formulations lipidiques adaptées et efficaces. Les mécanismes d'absorption des SA formulées avec des formulations LBDDS sont très complexes et ne sont pas encore entièrement élucidés.

3.2.1 Digestion et solubilisation des lipides

Une fois ingérés, les lipides présents dans l'estomac vont former des émulsions grossières après leur digestion due aux forces de cisaillement produites par contraction antrale de l'estomac [185]. Les lipases gastriques vont ensuite hydrolyser les esters glycériques d'acides gras. Les triglycérides (TG) vont subir un premier clivage d'une de leurs fonctions esters pour donner une molécule de diglycéride (DG) et une molécule d'acide gras (AG) libre, puis après un deuxième clivage un monoglycéride (MG) et une seconde molécule d'AG libre [186] (**figure 35**). Ces produits de digestion vont ensuite se déverser vers le duodénum activant une réponse physiologique du pancréas qui va sécréter des lipases, des co-lipases pancréatiques et du bicarbonate. Le

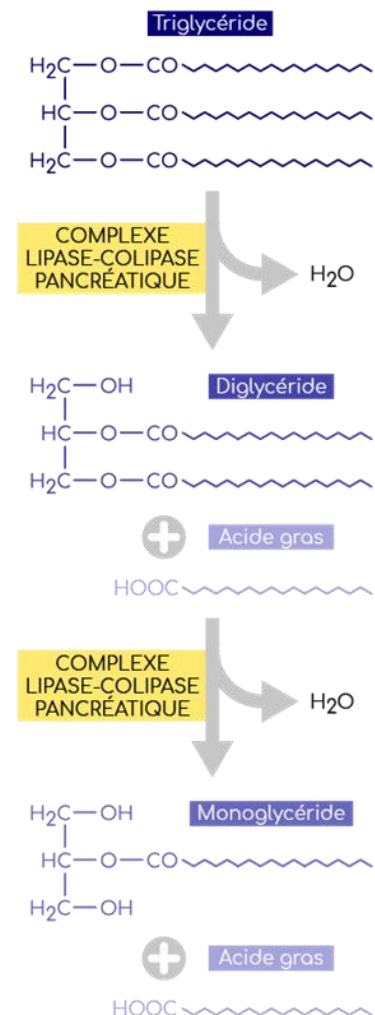


Figure 35 : action des lipases pancréatiques sur la digestion des triglycérides

bicarbonate augmente le pH et favorise l'action des lipases et co-lipases sur la digestion des TG. Ainsi, ces enzymes agissent à l'interface huile/eau des émulsions formées et hydrolysent les TG en MG et AG [187]. L'interaction entre les AG, les MG et les sels biliaires (SB) induit la formation de micelles mixtes [188]. Durant cette étape, les SA dispersées dans le milieu gastro intestinal peuvent être solubilisées dans des vésicules, des micelles et/ou des micelles mixtes (**figure 36**) [189]. Les vésicules obtenues sont composées de phospholipides (PL) organisés en phase lamellaire. Les micelles sont composées de tensioactifs et les micelles mixtes de PL et de différents tensioactifs.

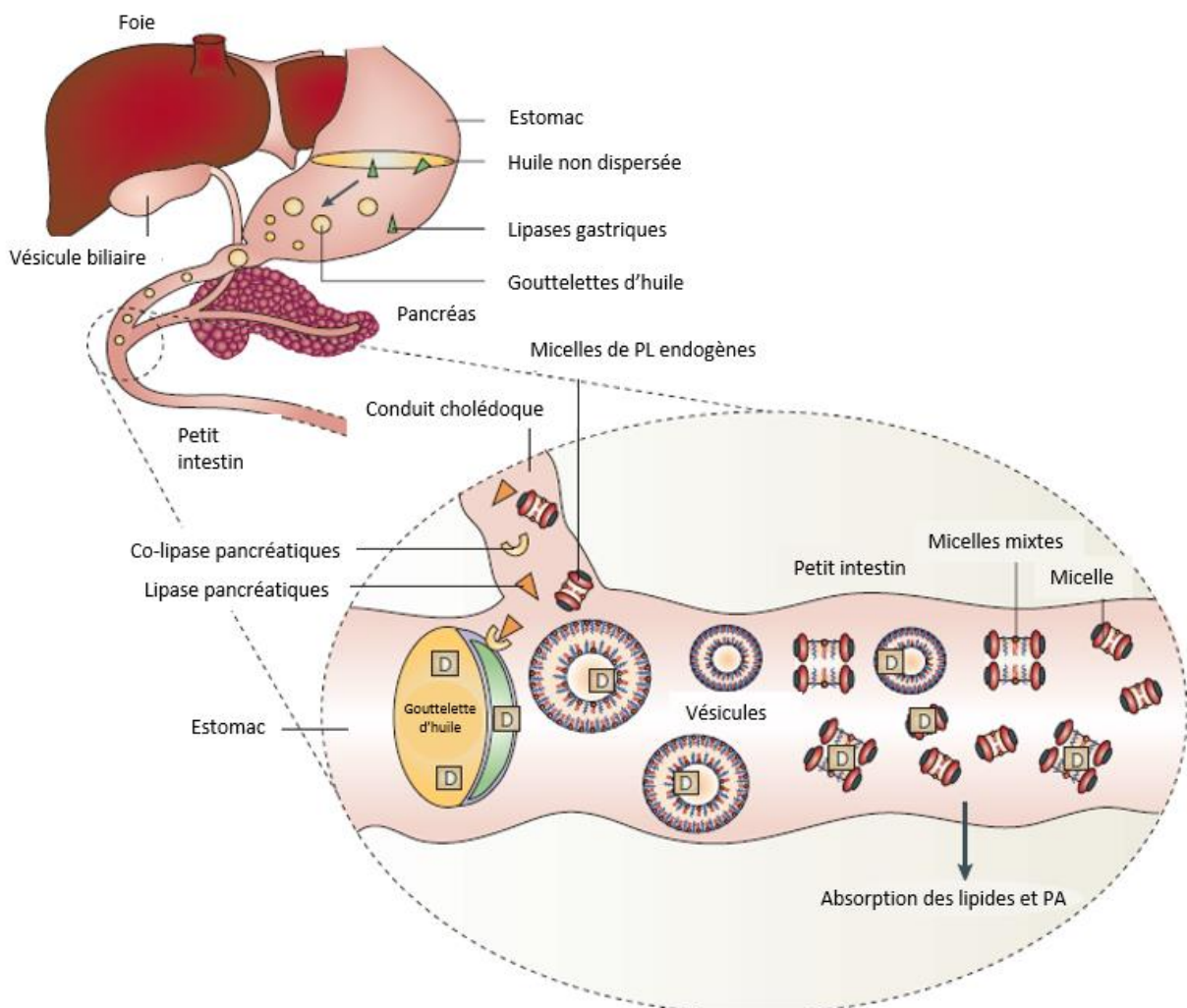


Figure 36 : Digestion des lipides et solubilisation des SA dans le petit intestin, D : principe actif [190]

3.2.2 Absorption

Les formulations issues de la lipolyse (espèces colloïdales, micelles, micelles mixtes, acides gras) peuvent facilement pénétrer les entérocytes par diffusion passive, diffusion facilitée et transport actif. Une fois dans les entérocytes, les protéines de liaison aux AG facilitent leur diffusion vers la lame basale en les transportant vers le réticulum endoplasmique (RE) lisse [191]. Dans le RE lisse, les MG et AG sont estérifiés à nouveau en TG et en phospholipides pour être ensuite libérés par exocytose dans l'espace extracellulaire. Les interactions entre les TG et les protéines de la membrane du RE vont former des larges vésicules colloïdales : les chylomicrons. Les SA lipophiles absorbées peuvent avoir une affinité pour les chylomicrons et vont pouvoir rejoindre la lymphe intestinale [192].

3.2.3 Passage dans la circulation générale

La majorité des SA absorbées vont rejoindre la circulation générale en passant par la veine porte et par le foie où ils peuvent être plus ou moins métabolisés (effet de premier passage hépatique) diminuant leur biodisponibilité. Une des alternatives pour éviter l'effet de premier passage hépatique, est le passage par le système lymphatique. Le liquide lymphatique est déversé dans la veine sous-clavière, ainsi la SA pourra rejoindre directement la circulation générale [193]. Cette voie est possible pour les SA très lipophile ($\log P > 5$) (**figure 37**) et solubles dans les TG [194] afin qu'ils puissent interagir avec les lipoprotéines des chylomicrons. L'absorption par la veine porte est environ 500 fois plus élevée que par la voie lymphatique [195], mais les SA liées aux lipoprotéines (molécules à haut PM) ne peuvent plus passer à travers les fenestrations de l'endothélium des capillaires sanguins. De plus, la paroi des capillaires lymphatiques présentant une seule couche de cellules épithéliales squameuses, permet la diffusion des chylomicrons vers les vaisseaux lymphatiques [196].

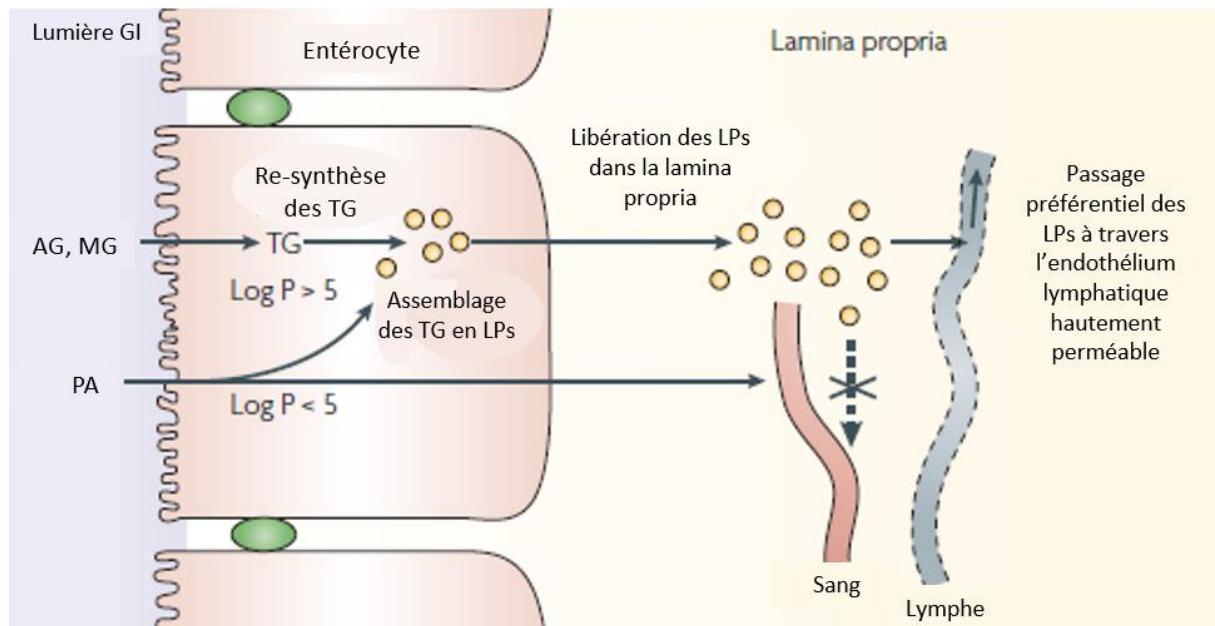


Figure 37 : Transport des lipides et des SA par le système lymphatique ou la veine porte après une administration orale [190]

3.3 Formulation LBDDS : amélioration de la biodisponibilité des SA

lipophiles

Grâce à la compréhension des mécanismes de digestion et d'absorption des lipides, les excipients lipidiques ont été sélectionnés pour formuler des SA faiblement solubles dans l'eau et/ou des SA faiblement perméables grâce aux formulations LBDDS. Les LBDDS peuvent être composés à partir d'huiles (tri, di ou monoglycérides), de mélange d'huile, de surfactants lipophiles et hydrophiles et de co-solvants [197,198]. Ces systèmes ont pour objectif d'augmenter l'absorption des SA à travers les entérocytes et sont classés en fonction des excipients utilisés (**tableau 16**).

Tableau 16 : Système de classification des formulations lipidiques [199,200]

	Type I	Type II	Type IIIA	Type IIIB	Type IV
Matériel	Huiles (100%)	Huiles (40 – 80%) Surfactants insolubles dans l'eau (20 – 60%)	Huiles (40 – 80%), Surfactants solubles et insolubles dans l'eau (20 -40%), Co-solvants hydrophiles (0-40%)	Huiles (< 20%), Surfactants soluble et insoluble dans l'eau (20 – 50%), Co-solvants hydrophiles (20 – 50%)	Surfactants solubles (0 – 20%) ou insolubles dans l'eau (30- 80%), Co-solvants hydrophiles (0 – 50%)
Caractéristiques	Non-dispersant Demande une digestion	Emulsion (SEDDS) sans excipients solubles dans l'eau Sera digérée	SEDDS/SMEDDS : excipients solubles dans l'eau Digestion pas nécessaire	SEDDS/SMEDDS : excipients solubles dans l'eau et faible quantité d'huile Digestion pas nécessaire	Dispersion qui entraîne la formation de micelles Digestion limitée
Avantages et inconvénients	Simple solution, faible capacité de solubilisation sauf pour les SA lipophiles	Moins de risque de perdre le pouvoir solubilisant après dispersion, Emulsions (inférieur à 2µm)	Absorption de la SA peut se faire sans digestion, risque de perdre le pouvoir solubilisant après dispersion	Absorption de la SA peut se faire sans digestion, risque de perdre le pouvoir solubilisant après dispersion	Capacité de solubilisation élevée, risque de perdre le pouvoir solubilisant après dispersion

En fonction de la formulation administrée par voie orale, plusieurs mécanismes d'actions sont possibles pour permettre d'augmenter l'absorption de la SA (**figure 38**) et ainsi sa biodisponibilité.

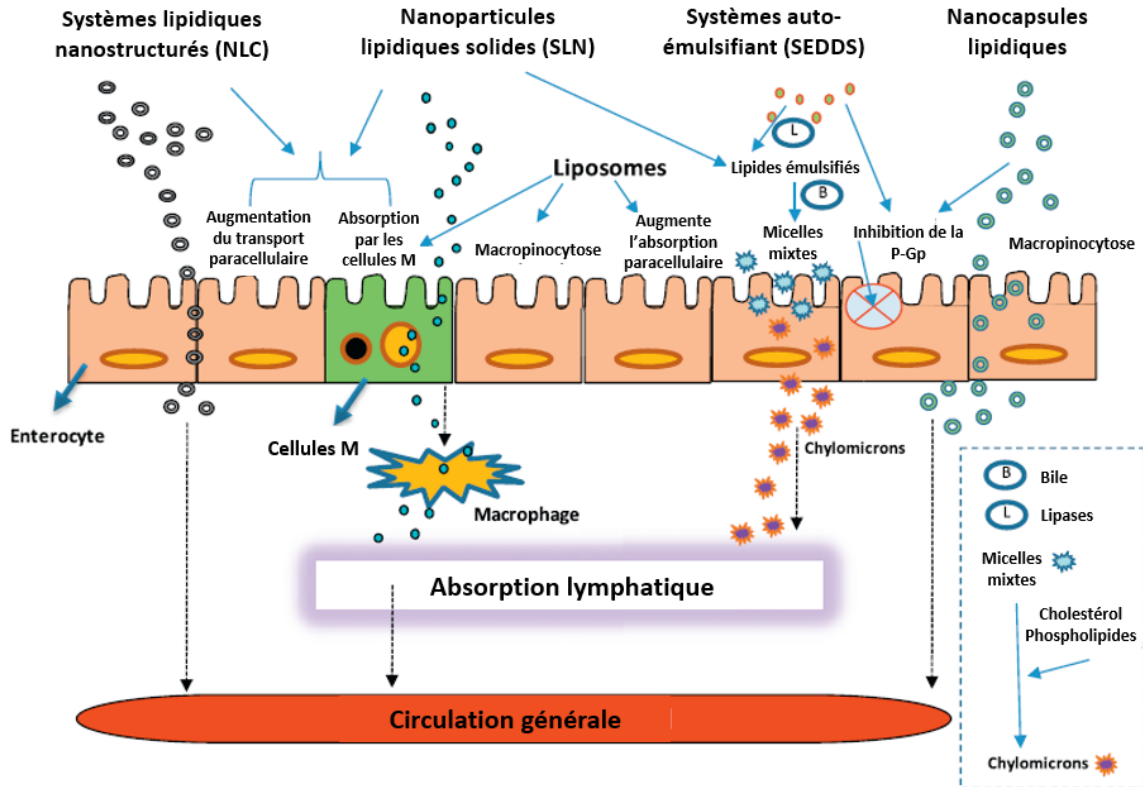


Figure 38 : Mécanismes d'actions des LBDDS pour augmenter la biodisponibilité des SA [201]

3.3.1 Les émulsions

Les émulsions (**figure 32**) sont composées d'une phase huileuse, d'une phase aqueuse et de surfactants et co-surfactants ; elles sont classées selon leurs tailles en émulsions fines, grossières, en microémulsions (ME) (100 – 200nm) ou en nanoémulsions (NE) (< 100nm). Les ME sont thermodynamiquement stables alors que les NE présentent une stabilité cinétique.

Les émulsions ont prouvé leur efficacité pour augmenter la biodisponibilité de SA de BCS classe IV faiblement solubles et faiblement perméables par voie orale. Par exemple, la formulation du docétaxel dans des microémulsions composées de Capryol 90 (phase huileuse), Cremophor EL (surfactant) et de Transcutol (co-surfactant) administrées par voie orale chez des rats a permis d'observer une biodisponibilité de 34,4% contre 6,63% pour la forme commerciale du docétaxel (Taxotère®) [202].

3.3.2 Nanoparticules lipidiques solides (SLN)

Les SLN (**figure 31B**) présentent une bonne alternative aux émulsions en remplaçant leur phase huileuse liquide par une phase huileuse solide pour une meilleure stabilité de la SA et aussi un contrôle de la libération de la SA [203].

N Dudhipa *et al.* ont formulé le Zaleplon (faiblement soluble dans l'eau et sujet au premier passage hépatique) dans des SLN composées de Compritol ATO 888, Poloxamer 188 et de lécithine d'œuf afin de l'administrer par voie orale chez le rat. Une augmentation de la biodisponibilité du Zaleplon d'un facteur 2,66 a été observée avec les SLN en comparaison avec une suspension de la SA [204].

3.3.3 Système lipidiques nanostructurés (NLC)

Les NLC (**figure 31C**) sont composés à la fois d'un mélange de phase huileuse liquide et solide afin d'augmenter la capacité de chargement en SA [205].

Ainsi, le fénofibrate a été formulé sous forme de NLC composés de Precirol ATO 5 (lipide solide), Captex100 (lipide liquide) and tween-80 (surfactant). Après administration orale chez le chien, la biodisponibilité a été augmentée de 3,5 à 3,6 fois en comparaison avec la forme commerciale (Lyphanyl) [206].

3.3.4 Liposomes

Comme décrit précédemment (chapitre 3, partie 1.2.1), les liposomes (**figure 29**) sont des vésicules lipidiques composées d'une bicouche de PL utilisées pour améliorer la biodisponibilité des SA pour la voie orale [207].

L'itraconazole a été formulé avec de la lécithine d'œuf, du cholestérol et du désoxycholate de sodium. Après administration orale de cette formulation chez le rat, la biodisponibilité a été augmentée de 1,67 fois comparée à la forme commerciale (Sporanox) [208].

3.3.5 Système auto-émulsifiant (SEDDS)

Les SEDDS sont des systèmes qui permettent la formation spontanée d'émulsions dans le TGI après administration par voie orale. En fonction de la taille des émulsions formées on parle de SMEDDS si leur taille est micrométrique ou de SNEDDS si leur taille est nanométrique. La SA est solubilisée dans un mélange d'huiles, de surfactants et de co-surfactants [209].

De nombreuses études ont montré le potentiel des SEDDS pour augmenter la biodisponibilité des SA faiblement solubles et/ou faiblement perméables. Par exemple, le paclitaxel a été formulé avec des SMEDDS composés de vitamine E, D-tocopheryl polyethylene glycol succinate 1000 (TPGS), et de cremophor RH 40. Après administration orale chez le rat, les SMEDDS ont permis d'augmenter la biodisponibilité du paclitaxel comparé à sa forme commerciale (Taxol®) de 28,6% à 52,7% en fonction de la dose [210].

3.3.6 Nanocapsules lipidiques (LNC)

Les LNC sont des systèmes de type cœur/coque de petites tailles (20 – 100nm). Le cœur est généralement une phase huileuse liquide et la coque un mélange de surfactants hydrophiles et lipophiles. Ce sont des systèmes biocompatibles et biodégradables qui permettent d'encapsuler des SA avec un taux de chargement assez élevé et d'augmenter la biodisponibilité des SA par voie orale [211].

La biodisponibilité orale de la tanshinone IIA a ainsi été améliorée de 3,6 fois grâce à la formulation LNC composée de Labrafac® (phase huileuse), Kolliphor HS15, et Span 80 (surfactants) par rapport à la suspension de tanshinone IIA [212].

IV. Conclusion

Le choix de la voie d'administration se fait principalement en fonction de la zone et/ou de la pathologie à traiter mais aussi des propriétés physicochimiques des SA. Dans le cas des maladies visuelles, la voie d'administration privilégiée est l'instillation oculaire (voie topique). Cependant, pour des physiopathologies comme la DMLA et la maladie de Stargardt, situées dans le segment postérieur de l'œil, les formes pharmaceutiques conventionnelles ne permettent pas d'obtenir des concentrations en SA suffisantes au niveau de la rétine pour avoir un traitement efficace pour stopper l'avancée de la maladie. Une administration par voie systémique (IV) est souvent utilisée pour valider une preuve de concept d'efficacité *in vivo* mais très traumatisante pour le patient et très coûteuse. L'alternative d'une administration par voie orale est possible pour délivrer les SA jusqu'à la rétine. Cependant, la présence de la BHR entraîne une faible biodisponibilité d'autant plus si les SA sont des molécules de BCS classe IV.

Ces dernières années, l'intérêt des nanoformulations lipidiques pour augmenter la biodisponibilité des molécules lipophiles a été démontré. Ces formulations permettent aux SA de pénétrer et diffuser au travers des barrières physiologiques de manière plus efficace après administration topique ou systémique (IV et orale). Par voie IV ces formulations peuvent permettre d'augmenter le temps de résidence des SA pour retarder leur élimination. Par voie orale, ces formulations permettent d'augmenter la solubilité de la SA dans le TGI et optimise leur absorption via la voie lymphatique pour augmenter la biodisponibilité des SA. Plus généralement, les excipients qui composent la formulation doivent permettre de solubiliser et charger la SA de manière efficace, ils doivent également être biocompatibles et présenter une faible toxicité pour garantir l'innocuité de la forme pharmaceutique administrée. Le rôle du galéniste est de choisir, développer et optimiser des formulations adaptées aux caractéristiques physico-chimiques de la SA afin que la concentration en actif atteigne le site d'action pour pouvoir exercer son effet thérapeutique. Dans l'idéal ces formes doivent être aussi faciles à administrer pour permettre une bonne observance thérapeutique.

Dans cette optique au sein de ce travail de thèse, les caractéristiques physico-chimiques ainsi que les propriétés biopharmaceutiques des molécules lipophénoliques développées ont été étudiées (chapitre 4) afin de proposer des formulations pour la voie IV et orales adaptées (chapitre 5). L'impact de ces formulations sur l'efficacité du traitement proposé a ensuite été étudié *in vivo* sur des modèles animaux de DMLA et de Stargardt (chapitre 6).

Références partie bibliographique

- [1] C. Courteix, B. Sion, *Physiologie de l'œil et principes généraux de la vision*, Actualités Pharmaceutiques. 57 (2018) 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2018.03.004>.
- [2] C.-J. Jeon, E. Strettoi, R.H. Masland, The Major Cell Populations of the Mouse Retina, *J. Neurosci.* 18 (1998) 8936–8946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08936.1998>.
- [3] S. Tachibanaki, Y. Shimauchi-Matsukawa, D. Arinobu, S. Kawamura, Molecular Mechanisms Characterizing Cone Photoresponses., *Photochem Photobiol.* (2006) 2006-02-28-IR-823. <https://doi.org/10.1562/2006-02-28-IR-823>.
- [4] M.J. Lohse, K.P. Hofmann, Spatial and Temporal Aspects of Signaling by G-Protein–Coupled Receptors, *Mol Pharmacol.* 88 (2015) 572–578. <https://doi.org/10.1124/mol.115.100248>.
- [5] F. Mazzoni, H. Safa, S.C. Finnemann, Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: Use and utility of RPE cells in culture, *Experimental Eye Research.* 126 (2014) 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.01.010>.
- [6] S. Fuhrmann, C. Zou, E.M. Levine, Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis, *Experimental Eye Research.* 123 (2014) 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.09.003>.
- [7] O. Strauss, The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function, *Physiological Reviews.* 85 (2005) 845–881. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>.
- [8] O. Strauss, *The Retinal Pigment Epithelium*, (n.d.) 21.
- [9] C. Chiba, The retinal pigment epithelium: An important player of retinal disorders and regeneration, *Experimental Eye Research.* 123 (2014) 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.07.009>.
- [10] S. Vannas, H. Teir, OBSERVATIONS ON STRUCTURES AND AGE CHANGES IN THE HUMAN SCLERA, *Acta Ophthalmologica.* 38 (2009) 268–279. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1960.tb05417.x>.
- [11] M. Norn, Topography of scleral emissaries and sclera-perforating blood vessels, *Acta Ophthalmologica.* 63 (2009) 320–322. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1985.tb06813.x>.
- [12] J.C. Saari, Vitamin A Metabolism in Rod and Cone Visual Cycles, *Annu. Rev. Nutr.* 32 (2012) 125–145. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071811-150748>.
- [13] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I.L. Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor, *Science.* 289 (2000) 739–745. <https://doi.org/10.1126/science.289.5480.739>.
- [14] A. Rattner, P.M. Smallwood, J. Nathans, Identification and Characterization of All-trans-retinol Dehydrogenase from Photoreceptor Outer Segments, the Visual Cycle Enzyme That Reduces All-trans-retinal to All-trans-retinol, *Journal of Biological Chemistry.* 275 (2000) 11034–11043. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11034>.
- [15] F. Haeseleer, G.-F. Jang, Y. Imanishi, C.A.G.G. Driessen, M. Matsumura, P.S. Nelson, K. Palczewski, Dual-substrate Specificity Short Chain Retinol Dehydrogenases from the Vertebrate Retina, *Journal of Biological Chemistry.* 277 (2002) 45537–45546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208882200>.
- [16] J.C. Saari, D.L. Bredberg, Lecithin:Retinol Acyltransferase in Retinal Pigment Epithelial Microsomes, *Journal of Biological Chemistry.* 264 (1989) 8636–8640. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81839-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81839-7).

- [17] M. Jin, S. Li, W.N. Moghrabi, H. Sun, G.H. Travis, Rpe65 Is the Retinoid Isomerase in Bovine Retinal Pigment Epithelium, *Cell*. 122 (2005) 449–459. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.042>.
- [18] D.A. Baylor, B.J. Nunn, J.L. Schnapf, The photocurrent, noise and spectral sensitivity of rods of the monkey *Macaca fascicularis*., *The Journal of Physiology*. 357 (1984) 575–607. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015518>.
- [19] J.L. Schnapf, B.J. Nunn, M. Meister, D.A. Baylor, Visual transduction in cones of the monkey *Macaca fascicularis*., *The Journal of Physiology*. 427 (1990) 681–713. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018193>.
- [20] J.C. Saari, Regeneration of 11-cis-Retinal in Visual Systems with Monostable and Bistable Visual Pigments, in: T. Furukawa, J.B. Hurley, S. Kawamura (Eds.), *Vertebrate Photoreceptors*, Springer Japan, Tokyo, 2014: pp. 47–71. https://doi.org/10.1007/978-4-431-54880-5_3.
- [21] Causes and Prevalence of Visual Impairment Among Adults in the United States, *Arch Ophthalmol*. 122 (2004) 477. <https://doi.org/10.1001/archophth.122.4.477>.
- [22] Y. Deng, L. Qiao, M. Du, C. Qu, L. Wan, J. Li, L. Huang, Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy, *Genes & Diseases*. 9 (2022) 62–79. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.02.009>.
- [23] K.L. Pennington, M.M. DeAngelis, Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors, *Eye and Vis*. 3 (2016) 34. <https://doi.org/10.1186/s40662-016-0063-5>.
- [24] S.J. Woo, J. Ahn, M.A. Morrison, S.Y. Ahn, J. Lee, K.W. Kim, M.M. DeAngelis, K.H. Park, Analysis of Genetic and Environmental Risk Factors and Their Interactions in Korean Patients with Age-Related Macular Degeneration, *PLoS ONE*. 10 (2015) e0132771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132771>.
- [25] J.L. Haines, M.A. Hauser, S. Schmidt, W.K. Scott, L.M. Olson, P. Gallins, K.L. Spencer, S.Y. Kwan, M. Noureddine, J.R. Gilbert, N. Schnetz-Boutaud, A. Agarwal, E.A. Postel, M.A. Pericak-Vance, Complement Factor H Variant Increases the Risk of Age-Related Macular Degeneration, *Science*. 308 (2005) 419–421. <https://doi.org/10.1126/science.1110359>.
- [26] D.H. Anderson, R.F. Mullins, G.S. Hageman, L.V. Johnson, A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye, *American Journal of Ophthalmology*. 134 (2002) 411–431. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(02\)01624-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(02)01624-0).
- [27] S. Velilla, J.J. García-Medina, A. García-Layana, R. Dolz-Marco, S. Pons-Vázquez, M.D. Pinazo-Durán, F. Gómez-Ulla, J.F. Arévalo, M. Díaz-Llopis, R. Gallego-Pinazo, Smoking and Age-Related Macular Degeneration: Review and Update, *Journal of Ophthalmology*. 2013 (2013) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/895147>.
- [28] C. Tolou, L. Mahieu, V. Pagot-Mathis, F. Matonti, V. Soler, De la maculopathie à la dégénérescence maculaire liée à l'âge : modalités de suivi et de traitement, *NPG Neurologie - Psychiatrie - Gériatrie*. 16 (2016) 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.npg.2015.11.007>.
- [29] V. Parier, G. Soubrane, La dégénérescence maculaire liée à l'âge, *La Revue de Médecine Interne*. 29 (2008) 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2007.08.021>.
- [30] X. Ding, M. Patel, C.-C. Chan, Molecular pathology of age-related macular degeneration, *Progress in Retinal and Eye Research*. 28 (2009) 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.10.001>.

- [31] Argon Laser Photocoagulation for Senile Macular Degeneration: Results of a Randomized Clinical Trial, *Arch Ophthalmol.* 100 (1982) 912. <https://doi.org/10.1001/archopht.1982.01030030920003>.
- [32] P.J. Rosenfeld, D.M. Brown, J.S. Heier, D.S. Boyer, P.K. Kaiser, C.Y. Chung, R.Y. Kim, Ranibizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration, *N Engl J Med.* 355 (2006) 1419–1431. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054481>.
- [33] L. Kodjikian, E.H. Souied, G. Mimoun, M. Mauget-Faÿsse, F. Behar-Cohen, E. Decullier, L. Huot, G. Aulagner, Ranibizumab versus Bevacizumab for Neovascular Age-related Macular Degeneration: Results from the GEFAL Noninferiority Randomized Trial, *Ophthalmology.* 120 (2013) 2300–2309. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.06.020>.
- [34] Photodynamic Therapy of Subfoveal Choroidal Neovascularization in Age-related Macular Degeneration With Verteporfin: One-Year Results of 2 Randomized Clinical Trials—TAP Report 1, *Arch Ophthalmol.* 117 (1999) 1329. <https://doi.org/10.1001/archopht.117.10.1329>.
- [35] M. Khan, F.P.M. Cremers, ABCA4-Associated Stargardt Disease, *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 237 (2020) 267–274. <https://doi.org/10.1055/a-1057-9939>.
- [36] S. Chatterjee, S. Gupta, V.N. Chaudhry, P. Chaudhry, A. Mukherjee, M. Mutsuddi, Whole exome sequencing identifies a novel splice-site mutation in IMPG2 gene causing Stargardt-like juvenile macular dystrophy in a north Indian family, *Gene.* 816 (2022) 146158. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146158>.
- [37] J. Kaplan, S. Gerber, D. Larget-Piet, J.-M. Rozet, H. Dollfus, J.-L. Dufier, S. Odent, A. Postel-Vinay, N. Janin, M.-L. Briard, J. Frézal, A. Munnich, A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to the short arm of chromosome 1, *Nat Genet.* 5 (1993) 308–311. <https://doi.org/10.1038/ng1193-308>.
- [38] Y. Tsybovsky, R.S. Molday, K. Palczewski, The ATP-Binding Cassette Transporter ABCA4: Structural and Functional Properties and Role in Retinal Disease, in: J.D. Lambris, A.P. Adamis (Eds.), *Inflammation and Retinal Disease: Complement Biology and Pathology*, Springer New York, New York, NY, 2010: pp. 105–125. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5635-4_8.
- [39] F. Pichi, E.B. Abboud, N.G. Ghazi, A.O. Khan, Fundus autofluorescence imaging in hereditary retinal diseases, *Acta Ophthalmol.* 96 (2018) e549–e561. <https://doi.org/10.1111/aos.13602>.
- [40] P. Tanna, R.W. Strauss, K. Fujinami, M. Michaelides, Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options, *Br J Ophthalmol.* 101 (2017) 25–30. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-308823>.
- [41] K. Fujinami, R.W. Strauss, J. (Pei-W. Chiang, I.S. Audo, P.S. Bernstein, D.G. Birch, S.M. Bomotti, A.V. Cideciyan, A.-M. Ervin, M.J. Marino, J.-A. Sahel, S. Mohand-Said, J.S. Sunness, E.I. Traboulsi, S. West, R. Wojciechowski, E. Zrenner, M. Michaelides, H.P.N. Scholl, ProgStar Study Group, Detailed genetic characteristics of an international large cohort of patients with Stargardt disease: ProgStar study report 8, *Br J Ophthalmol.* 103 (2019) 390–397. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-312064>.
- [42] M.-N. Delyfer, J.-F. Girmens, DMLA atrophique : physiopathologie et traitements à venir, (2011) 4.
- [43] A. Maeda, T. Maeda, M. Golczak, S. Chou, A. Desai, C.L. Hoppel, S. Matsuyama, K. Palczewski, Involvement of All-trans-retinal in Acute Light-induced Retinopathy of Mice, *Journal of Biological Chemistry.* 284 (2009) 15173–15183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900322200>.

- [44] Y. Chen, K. Okano, T. Maeda, V. Chauhan, M. Golczak, A. Maeda, K. Palczewski, Mechanism of All-trans-retinal Toxicity with Implications for Stargardt Disease and Age-related Macular Degeneration, *Journal of Biological Chemistry*. 287 (2012) 5059–5069. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.315432>.
- [45] T.L. Lenis, J. Hu, S.Y. Ng, Z. Jiang, S. Sarfare, M.B. Lloyd, N.J. Esposito, W. Samuel, C. Jaworski, D. Bok, S.C. Finnemann, M.J. Radeke, T.M. Redmond, G.H. Travis, R.A. Radu, Expression of ABCA4 in the retinal pigment epithelium and its implications for Stargardt macular degeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115 (2018). <https://doi.org/10.1073/pnas.1802519115>.
- [46] R.S. Molday, ATP-binding cassette transporter ABCA4: Molecular properties and role in vision and macular degeneration, *J Bioenerg Biomembr.* 39 (2007) 507–517. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9118-6>.
- [47] R.K. Crouch, Y. Koutalos, M. Kono, K. Schey, Z. Ablonczy, A2E and Lipofuscin, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Elsevier, 2015: pp. 449–463. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.005>.
- [48] J.R. Sparrow, K. Yamamoto, The Bisretinoids of RPE Lipofuscin: A Complex Mixture, in: M.M. LaVail, J.D. Ash, R.E. Anderson, J.G. Hollyfield, C. Grimm (Eds.), *Retinal Degenerative Diseases*, Springer US, Boston, MA, 2012: pp. 761–767. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0631-0_97.
- [49] J.R. Sparrow, N. Fishkin, J. Zhou, B. Cai, Y.P. Jang, S. Krane, Y. Itagaki, K. Nakanishi, A2E, a byproduct of the visual cycle, *Vision Research*. 43 (2003) 2983–2990. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(03\)00475-9](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(03)00475-9).
- [50] E.R. Gaillard, L.B. Avalle, L.M.M. Keller, Z. Wang, K.J. Reszka, J.P. Dillon, A mechanistic study of the photooxidation of A2E, a component of human retinal lipofuscin, *Experimental Eye Research*. 79 (2004) 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.05.005>.
- [51] J. Zhou, Y.P. Jang, S.R. Kim, J.R. Sparrow, Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 16182–16187. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604255103>.
- [52] L.E. Lamb, J.D. Simon, A2E: A Component of Ocular Lipofuscin, *Photochem Photobiol.* 79 (2004) 127. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2004\)079<0127:AACOO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2004)079<0127:AACOO>2.0.CO;2).
- [53] X. Liu, J. Chen, Z. Liu, J. Li, K. Yao, Y. Wu, Potential Therapeutic Agents Against Retinal Diseases Caused by Aberrant Metabolism of Retinoids, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57 (2016) 1017. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18429>.
- [54] C. Bellmann, J.-A. Sahel, Autofluorescence du fond d'œil dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge, *Journal Français d'Ophthalmologie*. 30 (2007) 62–64. [https://doi.org/10.1016/S0181-5512\(07\)89684-7](https://doi.org/10.1016/S0181-5512(07)89684-7).
- [55] M.L. Katz, C.M. Drea, G.E. Eldred, H.H. Hess, W.G. Robison, Influence of early photoreceptor degeneration on lipofuscin in the retinal pigment epithelium, *Experimental Eye Research*. 43 (1986) 561–573. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(86\)80023-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(86)80023-9).
- [56] R.W. Young, D. Bok, PARTICIPATION OF THE RETINAL PIGMENT EPITHELIUM IN THE ROD OUTER SEGMENT RENEWAL PROCESS, *Journal of Cell Biology*. 42 (1969) 392–403. <https://doi.org/10.1083/jcb.42.2.392>.
- [57] F. Family, K.I. Mazzitello, C.M. Arizmendi, H.E. Grossniklaus, Statistical physics of age related macular degeneration, *Physics Procedia*. 4 (2010) 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2010.08.006>.

- [58] J. Liu, Y. Itagaki, S. Ben-Shabat, K. Nakanishi, J.R. Sparrow, The Biosynthesis of A2E, a Fluorophore of Aging Retina, Involves the Formation of the Precursor, A2-PE, in the Photoreceptor Outer Segment Membrane, *Journal of Biological Chemistry*. 275 (2000) 29354–29360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910191199>.
- [59] AREDS Research Group, J.P. SanGiovanni, E. Agrón, A.D. Meleth, G.F. Reed, R.D. Sperduto, T.E. Clemons, E.Y. Chew, ω -3 Long-chain polyunsaturated fatty acid intake and 12-y incidence of neovascular age-related macular degeneration and central geographic atrophy: AREDS report 30, a prospective cohort study from the Age-Related Eye Disease Study, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 90 (2009) 1601–1607. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27594>.
- [60] J.R. Evans, J.G. Lawrenson, Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration, in: *The Cochrane Collaboration (Ed.), Cochrane Database of Systematic Reviews*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2012: p. CD000254.pub3. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000254.pub3>.
- [61] W.T. Wong, W. Kam, D. Cunningham, M. Harrington, K. Hammel, C.B. Meyerle, C. Cukras, E.Y. Chew, S.R. Sadda, F.L. Ferris, Treatment of Geographic Atrophy by the Topical Administration of OT-551: Results of a Phase II Clinical Trial, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 51 (2010) 6131. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5637>.
- [62] M.J. Geerlings, E.K. de Jong, A.I. den Hollander, The complement system in age-related macular degeneration: A review of rare genetic variants and implications for personalized treatment, *Molecular Immunology*. 84 (2017) 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.11.016>.
- [63] D.S. Liao, F.V. Grossi, D. El Mehdi, M.R. Gerber, D.M. Brown, J.S. Heier, C.C. Wyckoff, L.J. Singerman, P. Abraham, F. Grassmann, P. Nuernberg, B.H.F. Weber, P. Deschatelets, R.Y. Kim, C.Y. Chung, R.M. Ribeiro, M. Hamdani, P.J. Rosenfeld, D.S. Boyer, J.S. Slakter, C.G. Francois, Complement C3 Inhibitor Pegcetacoplan for Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration, *Ophthalmology*. 127 (2020) 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.07.011>.
- [64] W.T. Wong, S. Dresner, F. Forooghian, T. Glaser, L. Doss, M. Zhou, D. Cunningham, K. Shimel, M. Harrington, K. Hammel, C.A. Cukras, F.L. Ferris, E.Y. Chew, Treatment of Geographic Atrophy With Subconjunctival Sirolimus: Results of a Phase I/II Clinical Trial, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 54 (2013) 2941. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-11650>.
- [65] Z. Yehoshua, C. Alexandre de Amorim Garcia Filho, R.P. Nunes, G. Gregori, F.M. Penha, A.A. Moshfeghi, K. Zhang, S. Sadda, W. Feuer, P.J. Rosenfeld, Systemic Complement Inhibition with Eculizumab for Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration, *Ophthalmology*. 121 (2014) 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.09.044>.
- [66] D.S. Boyer, V.H. Gonzalez, D.Y. Kunitomo, R.K. Maturi, R.H. Roe, M.A. Singer, S. Xavier, J.A. Kornfield, B.D. Kuppermann, H. Quiroz-Mercado, J. Aibel, H.L. Karageozian, J.Y. Park, V.H. Karageozian, L. Karageozian, M.A. Sarayba, P.K. Kaiser, Safety and Efficacy of Intravitreal Risuteganib for Non-Exudative AMD: A Multicenter, Phase 2a, Randomized, Clinical Trial, *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 52 (2021) 327–335. <https://doi.org/10.3928/23258160-20210528-05>.
- [67] F.G. Holz, S.R. Sadda, B. Busbee, E.Y. Chew, P. Mitchell, A. Tufail, C. Brittain, D. Ferrara, S. Gray, L. Honigberg, J. Martin, B. Tong, J.S. Ehrlich, N.M. Bressler, for the Chroma and Spectri Study Investigators, Efficacy and Safety of Lampalizumab for Geographic Atrophy Due to Age-Related Macular Degeneration: Chroma and Spectri Phase 3 Randomized

- Clinical Trials, JAMA Ophthalmol. 136 (2018) 666. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2018.1544>.
- [68] G.J. Jaffe, K. Westby, K.G. Csaky, J. Monés, J.A. Pearlman, S.S. Patel, B.C. Joondeph, J. Randolph, H. Masonson, K.A. Rezaei, C5 Inhibitor Avacincaptad Pegol for Geographic Atrophy Due to Age-Related Macular Degeneration, *Ophthalmology*. 128 (2021) 576–586. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.08.027>.
- [69] M. Nebbioso, A. Lambiase, A. Cerini, P.G. Limoli, M. La Cava, A. Greco, Therapeutic Approaches with Intravitreal Injections in Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration: Current Drugs and Potential Molecules, *IJMS*. 20 (2019) 1693. <https://doi.org/10.3390/ijms20071693>.
- [70] P.J. Rosenfeld, P.U. Dugel, F.G. Holz, J.S. Heier, J.A. Pearlman, R.L. Novack, K.G. Csaky, J.M. Koester, J.K. Gregory, R. Kubota, Emixustat Hydrochloride for Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration, *Ophthalmology*. 125 (2018) 1556–1567. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.03.059>.
- [71] L. Ma, Y. Kaufman, J. Zhang, I. Washington, C20-D3-vitamin A Slows Lipofuscin Accumulation and Electrophysiological Retinal Degeneration in a Mouse Model of Stargardt Disease, *Journal of Biological Chemistry*. 286 (2011) 7966–7974. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178657>.
- [72] P.J. Rosenfeld, B. Berger, E. Reichel, R.P. Danis, A. Gress, L. Ye, M. Magee, L.R. Parham, M.M. McLaughlin, A Randomized Phase 2 Study of an Anti–Amyloid β Monoclonal Antibody in Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration, *Ophthalmology Retina*. 2 (2018) 1028–1040. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2018.03.001>.
- [73] G. Rammes, C.G. Parsons, The A β aggregation modulator MRZ-99030 prevents and even reverses synaptotoxic effects of A β 1-42 on LTP even following serial dilution to a 500:1 stoichiometric excess of A β 1-42, suggesting a beneficial prion-like seeding mechanism, *Neuropharmacology*. 179 (2020) 108267. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108267>.
- [74] B.D. Kuppermann, S.S. Patel, D.S. Boyer, A.J. Augustin, W.R. Freeman, K.J. Kerr, Q. Guo, S. Schneider, F.J. López, PHASE 2 STUDY OF THE SAFETY AND EFFICACY OF BRIMONIDINE DRUG DELIVERY SYSTEM (BRIMO DDS) GENERATION 1 IN PATIENTS WITH GEOGRAPHIC ATROPHY SECONDARY TO AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION, *Retina*. 41 (2021) 144–155. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000002789>.
- [75] K. Kauper, C. McGovern, S. Sherman, P. Heatherton, R. Rapoza, P. Stabila, B. Dean, A. Lee, S. Borges, B. Bouchard, W. Tao, Two-Year Intraocular Delivery of Ciliary Neurotrophic Factor by Encapsulated Cell Technology Implants in Patients with Chronic Retinal Degenerative Diseases, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 53 (2012) 7484. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9970>.
- [76] M.A. Parker, L.R. Erker, I. Audo, D. Choi, S. Mohand-Said, K. Sestakauskas, P. Benoit, T. Appelqvist, M. Krahmer, C. Ségaut-Prévost, B.J. Lujan, A. Faridi, E.N. Chegarnov, P.N. Steinkamp, C. Ku, M.M. da Palma, P.-O. Barale, S. Ayelo-Scheer, A. Lauer, T. Stout, D.J. Wilson, R.G. Weleber, M.E. Pennesi, J.A. Sahel, P. Yang, Three-Year Safety Results of SAR422459 (EIAV-ABCA4) Gene Therapy in Patients With ABCA4-Associated Stargardt Disease: An Open-Label Dose-Escalation Phase I/IIa Clinical Trial, Cohorts 1-5, *American Journal of Ophthalmology*. 240 (2022) 285–301. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2022.02.013>.

- [77] C.N. Thomas, D.A. Sim, W.H. Lee, N. Alfahad, A.D. Dick, A.K. Denniston, L.J. Hill, Emerging therapies and their delivery for treating age-related macular degeneration, *British J Pharmacology*. 179 (2022) 1908–1937. <https://doi.org/10.1111/bph.15459>.
- [78] S.D. Schwartz, C.D. Regillo, B.L. Lam, D. Elliott, P.J. Rosenfeld, N.Z. Gregori, J.-P. Hubschman, J.L. Davis, G. Heilwell, M. Spirn, J. Maguire, R. Gay, J. Bateman, R.M. Ostrick, D. Morris, M. Vincent, E. Anglade, L.V. Del Priore, R. Lanza, Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt’s macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies, *The Lancet*. 385 (2015) 509–516. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3).
- [79] L. da Cruz, K. Fynes, O. Georgiadis, J. Kerby, Y.H. Luo, A. Ahmado, A. Vernon, J.T. Daniels, B. Nommiste, S.M. Hasan, S.B. Gooljar, A.-J.F. Carr, A. Vugler, C.M. Ramsden, M. Bictash, M. Fenster, J. Steer, T. Harbinson, A. Wilbrey, A. Tufail, G. Feng, M. Whitlock, A.G. Robson, G.E. Holder, M.S. Sagoo, P.T. Loudon, P. Whiting, P.J. Coffey, Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell–derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration, *Nat Biotechnol*. 36 (2018) 328–337. <https://doi.org/10.1038/nbt.4114>.
- [80] J.S. Heier, A.C. Ho, M.A. Samuel, T. Chang, C.D. Riemann, J.W. Kitchens, J.S. Slakter, Y.I. Leiderman, R. Spencer, G.A. Williams, S.B. Hickson-Curran, M. Keane, J.S. Baldassarre, Safety and Efficacy of Subretinally Administered Palucorcel for Geographic Atrophy of Age-Related Macular Degeneration, *Ophthalmology Retina*. 4 (2020) 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2019.11.011>.
- [81] J.K. Luttrull, S.H. Sinclair, S. Elmann, D.B. Chang, D. Kent, Slowed Progression of Age-Related Geographic Atrophy Following Subthreshold Laser, *OPHTH. Volume 14* (2020) 2983–2993. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S268322>.
- [82] R.H. Guymer, Z. Wu, L.A.B. Hodgson, E. Caruso, K.H. Brassington, N. Tindill, K.Z. Aung, M.B. McGuinness, E.L. Fletcher, F.K. Chen, U. Chakravarthy, J.J. Arnold, W.J. Heriot, S.R. Durkin, J.J. Lek, C.A. Harper, S.S. Wickremasinghe, S.S. Sandhu, E.K. Baglin, P. Sharangan, S. Braat, C.D. Luu, Subthreshold Nanosecond Laser Intervention in Age-Related Macular Degeneration, *Ophthalmology*. 126 (2019) 829–838. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.09.015>.
- [83] M.J. Allingham, P.S. Mettu, S.W. Cousins, Phase 1 Clinical Trial of Elamipretide in Intermediate Age-Related Macular Degeneration and High-Risk Drusen, *Ophthalmology Science*. 2 (2022) 100095. <https://doi.org/10.1016/j.xops.2021.100095>.
- [84] Y. Deng, L. Qiao, M. Du, C. Qu, L. Wan, J. Li, L. Huang, Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy, *Genes & Diseases*. 9 (2022) 62–79. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.02.009>.
- [85] S.C. Lourenço, M. Moldão-Martins, V.D. Alves, Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications, *Molecules*. 24 (2019) 4132. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>.
- [86] B. Quéguineur, L. Goya, S. Ramos, M.A. Martín, R. Mateos, L. Bravo, Phloroglucinol: Antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line, *Food and Chemical Toxicology*. 50 (2012) 2886–2893. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.026>.
- [87] E.-J. Yang, S. Ahn, J. Ryu, M.-S. Choi, S. Choi, Y.H. Chong, J.-W. Hyun, M.-J. Chang, H.-S. Kim, Phloroglucinol Attenuates the Cognitive Deficits of the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer’s Disease, *PLoS ONE*. 10 (2015) e0135686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135686>.

- [88] D. Cia, A. Cubizolle, C. Crauste, N. Jacquemot, L. Guillou, C. Vigor, C. Angebault, C.P. Hamel, J. Vercauteren, P. Brabet, Phloroglucinol protects retinal pigment epithelium and photoreceptor against all- *trans* -retinal-induced toxicity and inhibits A2E formation, *J. Cell. Mol. Med.* 20 (2016) 1651–1663. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12857>.
- [89] O.L. German, D.L. Agnolazza, L.E. Politi, N.P. Rotstein, Light, lipids and photoreceptor survival: live or let die?, *Photochem. Photobiol. Sci.* 14 (2015) 1737–1753. <https://doi.org/10.1039/C5PP00194C>.
- [90] M.-C. Huang, J.T. Brenna, A.C. Chao, C. Tschanz, D.A. Diersen-Schade, H.-C. Hung, Differential Tissue Dose Responses of (n-3) and (n-6) PUFA in Neonatal Piglets Fed Docosahexaenoate and Arachidonoate, *The Journal of Nutrition.* 137 (2007) 2049–2055. <https://doi.org/10.1093/jn/137.9.2049>.
- [91] T. Georgiou, A. Neokleous, D. Nicolaou, B. Sears, Pilot study for treating dry age-related macular degeneration (AMD) with high-dose omega-3 fatty acids, *PharmaNutrition.* 2 (2014) 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2013.10.001>.
- [92] R.W. Young, THE RENEWAL OF PHOTORECEPTOR CELL OUTER SEGMENTS, *Journal of Cell Biology.* 33 (1967) 61–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.33.1.61>.
- [93] L. Politi, N. Rotstein, N. Carri, Effects of docosahexaenoic acid on retinal development: Cellular and molecular aspects, *Lipids.* 36 (2001) 927–935. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0803-8>.
- [94] W. Chen, W.J. Esselman, D.B. Jump, J.V. Busik, Anti-inflammatory Effect of Docosahexaenoic Acid on Cytokine-Induced Adhesion Molecule Expression in Human Retinal Vascular Endothelial Cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46 (2005) 4342. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0601>.
- [95] O.L. German, M.F. Insua, C. Gentili, N.P. Rotstein, L.E. Politi, Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway, *J Neurochem.* 98 (2006) 1507–1520. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04061.x>.
- [96] M.V. Simón, D.L. Agnolazza, O.L. German, A. Garelli, L.E. Politi, M.-P. Agbaga, R.E. Anderson, N.P. Rotstein, Synthesis of docosahexaenoic acid from eicosapentaenoic acid in retina neurons protects photoreceptors from oxidative stress, *J. Neurochem.* 136 (2016) 931–946. <https://doi.org/10.1111/jnc.13487>.
- [97] N.G. Bazan, Neuroprotectin D1 (NPD1): A DHA-Derived Mediator that Protects Brain and Retina Against Cell Injury-Induced Oxidative Stress, *Brain Pathology.* 15 (2006) 159–166. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2005.tb00513.x>.
- [98] N.G. Bazan, Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 81 (2009) 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.05.024>.
- [99] P.K. Mukherjee, A. Chawla, M.S. Loayza, N.G. Bazan, Docosanoids are multifunctional regulators of neural cell integrity and fate: Significance in aging and disease, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 77 (2007) 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.022>.
- [100] N.G. Bazan, Neurotrophins Induce Neuroprotective Signaling in the Retinal Pigment Epithelial Cell by Activating the Synthesis of the Anti-inflammatory and Anti-apoptotic Neuroprotectin D1, in: R.E. Anderson, M.M. LaVail, J.G. Hollyfield (Eds.), *Recent Advances in Retinal Degeneration*, Springer New York, New York, NY, 2008: pp. 39–44. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74904-4_3.

- [101] N.G. Bazan, Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease, *Journal of Lipid Research*. 50 (2009) S400–S405. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800068-JLR200>.
- [102] C. Crauste, C. Vigor, P. Brabet, M. Picq, M. Lagarde, C. Hamel, T. Durand, J. Vercauteren, Synthesis and Evaluation of Polyunsaturated Fatty Acid-Phenol Conjugates as Anti-Carbonyl-Stress Lipophenols: Polyunsaturated Fatty Acid-Phenol Conjugates, *Eur. J. Org. Chem.* 2014 (2014) 4548–4561. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201402282>.
- [103] E. Moine, M. Boukhallat, D. Cia, N. Jacquemot, L. Guillou, T. Durand, J. Vercauteren, P. Brabet, C. Crauste, New lipophenols prevent carbonyl and oxidative stresses involved in macular degeneration, *Free Radical Biology and Medicine*. 162 (2021) 367–382. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.316>.
- [104] A. Cubizolle, D. Cia, E. Moine, N. Jacquemot, L. Guillou, M. Rosell, C. Angebault-Prouteau, G. Lenaers, I. Meunier, J. Vercauteren, T. Durand, C. Crauste, P. Brabet, Isopropyl-phloroglucinol-DHA protects outer retinal cells against lethal dose of all- *trans* -retinal, *J Cellular Molecular Medi.* 24 (2020) 5057–5069. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15135>.
- [105] N. Taveau, A. Cubizolle, L. Guillou, N. Piquier, E. Moine, D. Cia, V. Kalatzis, J. Vercauteren, T. Durand, C. Crauste, P. Brabet, Preclinical pharmacology of a lipophenol in a mouse model of light-induced retinopathy, *Exp Mol Med*. 52 (2020) 1090–1101. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0460-7>.
- [106] T. Hatahet, M. Morille, A. Hommoss, J.M. Devoisselle, R.H. Müller, S. Bégu, Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 108 (2016) 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.08.011>.
- [107] A. Anand David, R. Arulmoli, S. Parasuraman, Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid, *Phcog Rev.* 10 (2016) 84. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>.
- [108] L. Xiao, G. Luo, Y. Tang, P. Yao, Quercetin and iron metabolism: What we know and what we need to know, *Food and Chemical Toxicology*. 114 (2018) 190–203. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.022>.
- [109] X. Xiao, D. Shi, L. Liu, J. Wang, X. Xie, T. Kang, W. Deng, Quercetin Suppresses Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenesis through Inactivation of P300 Signaling, *PLoS ONE*. 6 (2011) e22934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022934>.
- [110] V.K. Yellepeddi, S. Palakurthi, Recent Advances in Topical Ocular Drug Delivery, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 32 (2016) 67–82. <https://doi.org/10.1089/jop.2015.0047>.
- [111] K. Ghasemi Falavarjani, Q.D. Nguyen, Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature, *Eye*. 27 (2013) 787–794. <https://doi.org/10.1038/eye.2013.107>.
- [112] V.-P. Ranta, E. Mannermaa, K. Lummeppuro, A. Subrizi, A. Laukkanen, M. Antopolsky, L. Murtomäki, M. Hornof, A. Urtti, Barrier analysis of periocular drug delivery to the posterior segment, *Journal of Controlled Release*. 148 (2010) 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.028>.
- [113] S.H. Boddu, Utility of transporter/receptor(s) in drug delivery to the eye, *WJP*. 2 (2013) 1. <https://doi.org/10.5497/wjp.v2.i1.1>.

- [114] B. Yavuz, U.B. Kompella, Ocular Drug Delivery, in: S.M. Whitcup, D.T. Azar (Eds.), Pharmacologic Therapy of Ocular Disease, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 57–93. https://doi.org/10.1007/164_2016_84.
- [115] N. Djebli, S. Khier, F. Griguer, A.-L. Coutant, A. Tavernier, G. Fabre, C. Leriche, D. Fabre, Ocular Drug Distribution After Topical Administration: Population Pharmacokinetic Model in Rabbits, *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 42 (2017) 59–68. <https://doi.org/10.1007/s13318-016-0319-4>.
- [116] L. Bonilla, M. Espina, P. Severino, A. Cano, M. Ettcheto, A. Camins, M.L. García, E.B. Souto, E. Sánchez-López, Lipid Nanoparticles for the Posterior Eye Segment, *Pharmaceutics.* 14 (2021) 90. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010090>.
- [117] I.P. Kaur, S. Kakkar, Nanotherapy for posterior eye diseases, *Journal of Controlled Release.* 193 (2014) 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.031>.
- [118] P. Hughes, O. Olejnik, J. Changlin, C. Wilson, Topical and systemic drug delivery to the posterior segments, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 57 (2005) 2010–2032. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.004>.
- [119] R. Bachu, P. Chowdhury, Z. Al-Saedi, P. Karla, S. Boddu, Ocular Drug Delivery Barriers—Role of Nanocarriers in the Treatment of Anterior Segment Ocular Diseases, *Pharmaceutics.* 10 (2018) 28. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10010028>.
- [120] A.O. Eghrari, S.A. Riazuddin, J.D. Gottsch, Overview of the Cornea, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Elsevier, 2015: pp. 7–23. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.04.001>.
- [121] K.M. Meek, C. Boote, The organization of collagen in the corneal stroma, *Experimental Eye Research.* 78 (2004) 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.07.003>.
- [122] J.M. Fitch, D.E. Birk, C. Linsenmayer, T.F. Linsenmayer, The spatial organization of Descemet’s membrane-associated type IV collagen in the avian cornea., *Journal of Cell Biology.* 110 (1990) 1457–1468. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.4.1457>.
- [123] Y. Shirasaki, Molecular Design for Enhancement of Ocular Penetration, *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 97 (2008) 2462–2496. <https://doi.org/10.1002/jps.21200>.
- [124] L. Battaglia, M. Gallarate, L. Serpe, F. Foglietta, E. Muntoni, A. del Pozo Rodriguez, M. Angeles Solinis Aspiazu, Ocular delivery of solid lipid nanoparticles, in: *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*, Elsevier, 2018: pp. 269–312. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813687-4.00007-4>.
- [125] E. Sánchez-López, M. Espina, S. Doktorovova, E.B. Souto, M.L. García, Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part I – Barriers and determining factors in ocular delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 110 (2017) 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.10.009>.
- [126] M. Attar, J. Shen, K.-H.J. Ling, D. Tang-Liu, Ophthalmic drug delivery considerations at the cellular level: drug-metabolising enzymes and transporters, *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2 (2005) 891–908. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.5.891>.
- [127] S.H. Kim, R.J. Lutz, N.S. Wang, M.R. Robinson, Transport Barriers in Transscleral Drug Delivery for Retinal Diseases, *Ophthalmic Res.* 39 (2007) 244–254. <https://doi.org/10.1159/000108117>.
- [128] M. Hingorani, D. Metz, S.L. Lightman, Characterisation of the Normal Conjunctival Leukocyte Population, *Experimental Eye Research.* 64 (1997) 905–912. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0280>.

- [129] D. Smerdon, Anatomy of the eye and orbit, *Current Anaesthesia & Critical Care*. 11 (2000) 286–292. <https://doi.org/10.1054/cacc.2000.0296>.
- [130] K. Hosoya, V.H.L. Lee, K.-J. Kim, Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 60 (2005) 227–240. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.12.007>.
- [131] P. Saba, J.J. Yang, V.H.L. Lee, Existence of a p-Glycoprotein Drug Efflux Pump in Cultured Rabbit Conjunctival Epithelial Cells, 39 (1998) 6.
- [132] H.F. Edelhauser, C.L. Rowe-Rendleman, M.R. Robinson, D.G. Dawson, G.J. Chader, H.E. Grossniklaus, K.D. Rittenhouse, C.G. Wilson, D.A. Weber, B.D. Kuppermann, K.G. Csaky, T.W. Olsen, U.B. Kompella, V.M. Holers, G.S. Hageman, B.C. Gilger, P.A. Campochiaro, S.M. Whitcup, W.T. Wong, Ophthalmic Drug Delivery Systems for the Treatment of Retinal Diseases: Basic Research to Clinical Applications, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 51 (2010) 5403. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5392>.
- [133] H.M. Kim, H. Han, H.K. Hong, J.H. Park, K.H. Park, H. Kim, S.J. Woo, Permeability of the Retina and RPE-Choroid-Sclera to Three Ophthalmic Drugs and the Associated Factors, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 655. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050655>.
- [134] T. Fujisawa, H. Miyai, K. Hironaka, T. Tsukamoto, K. Tahara, Y. Tozuka, M. Ito, H. Takeuchi, Liposomal diclofenac eye drop formulations targeting the retina: Formulation stability improvement using surface modification of liposomes, *International Journal of Pharmaceutics*. 436 (2012) 564–567. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.024>.
- [135] Y. Shen, J. Tu, Preparation and ocular pharmacokinetics of ganciclovir liposomes, *AAPS J*. 9 (2007) E371. <https://doi.org/10.1208/aapsj0903044>.
- [136] B.M. Davis, E.M. Normando, L. Guo, L.A. Turner, S. Nizari, P. O’Shea, S.E. Moss, S. Somavarapu, M.F. Cordeiro, Topical Delivery of Avastin to the Posterior Segment of the Eye In Vivo Using Annexin A5-associated Liposomes, *Small*. 10 (2014) 1575–1584. <https://doi.org/10.1002/sml.201303433>.
- [137] J. Liaw, S.-F. Chang, F.-C. Hsiao, In vivo gene delivery into ocular tissues by eye drops of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) polymeric micelles, *Gene Ther*. 8 (2001) 999–1004. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301485>.
- [138] S. Patel, C. Garapati, P. Chowdhury, H. Gupta, J. Nesamony, S. Nauli, S.H.S. Boddu, Development and Evaluation of Dexamethasone Nanomicelles with Potential for Treating Posterior Uveitis After Topical Application, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 31 (2015) 215–227. <https://doi.org/10.1089/jop.2014.0152>.
- [139] M. Ali Attia Shafie, Formulation and Evaluation of Betamethasone Sodium Phosphate Loaded Nanoparticles for Ophthalmic Delivery, *J Clin Exp Ophthalmol* 2013. 04 (2013). <https://doi.org/10.4172/2155-9570.1000273>.
- [140] M. Yadav, N. Schiavone, A. Guzman-Aranguez, F. Giansanti, L. Papucci, M.J. Perez de Lara, M. Singh, I.P. Kaur, Atorvastatin-loaded solid lipid nanoparticles as eye drops: proposed treatment option for age-related macular degeneration (AMD), *Drug Deliv. and Transl. Res*. 10 (2020) 919–944. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00733-4>.
- [141] J. Araújo, S. Nikolic, M.A. Egea, E.B. Souto, M.L. Garcia, Nanostructured lipid carriers for triamcinolone acetonide delivery to the posterior segment of the eye, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 88 (2011) 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.06.025>.

- [142] L. Ying, Drug delivery to the ocular posterior segment using lipid emulsion via eye drop administration: Effect of emulsion formulations and surface modification, *International Journal of Pharmaceutics*. (2013) 7.
- [143] S. Delgado-Tirado, D. Amarnani, G. Zhao, E.J. Rossin, D. Elliott, J.B. Miller, W.A. Greene, L. Ramos, S. Arevalo-Alquichire, D. Leyton-Cifuentes, L. Gonzalez-Buendia, D. Isaacs-Bernal, H.A.B. Whitmore, N. Chmielewska, B.V. Duffy, E. Kim, H.-C. Wang, J.M. Ruiz-Moreno, L.A. Kim, J.F. Arboleda-Velasquez, Topical delivery of a small molecule RUNX1 transcription factor inhibitor for the treatment of proliferative vitreoretinopathy, *Sci Rep*. 10 (2020) 20554. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77254-0>.
- [144] R. Gaudana, H.K. Ananthula, A. Parenky, A.K. Mitra, Ocular Drug Delivery, *AAPS J*. 12 (2010) 348–360. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9183-3>.
- [145] T.R. Thrimawithana, S. Young, C.R. Bunt, C. Green, R.G. Alany, Drug delivery to the posterior segment of the eye, *Drug Discovery Today*. 16 (2011) 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.12.004>.
- [146] X. Yang, X.-W. Yu, D.-D. Zhang, Z.-G. Fan, Blood-retinal barrier as a converging pivot in understanding the initiation and development of retinal diseases, *Chinese Medical Journal*. 133 (2020) 2586–2594. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001015>.
- [147] J. Cunha-Vaz, R. Bernardes, C. Lobo, Blood-Retinal Barrier, *European Journal of Ophthalmology*. 21 (2011) 3–9. <https://doi.org/10.5301/EJO.2010.6049>.
- [148] D. Huang, Y.-S. Chen, I.D. Rupenthal, Overcoming ocular drug delivery barriers through the use of physical forces, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 126 (2018) 96–112. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.008>.
- [149] S. Dey, A.K. Mitra, Transporters and receptors in ocular drug delivery: opportunities and challenges, *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2 (2005) 201–204. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.2.201>.
- [150] E.M. del Amo, A.-K. Rimpelä, E. Heikkinen, O.K. Kari, E. Ramsay, T. Lajunen, M. Schmitt, L. Pelkonen, M. Bhattacharya, D. Richardson, A. Subrizi, T. Turunen, M. Reinisalo, J. Itkonen, E. Toropainen, M. Casteleijn, H. Kidron, M. Antopolsky, K.-S. Vellonen, M. Ruponen, A. Urtili, Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery, *Progress in Retinal and Eye Research*. 57 (2017) 134–185. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.12.001>.
- [151] A.T.M. Serajuddin, Salt formation to improve drug solubility, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59 (2007) 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.010>.
- [152] K. Kawakami, N. Oda, K. Miyoshi, T. Funaki, Y. Ida, Solubilization behavior of a poorly soluble drug under combined use of surfactants and cosolvents, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28 (2006) 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.11.012>.
- [153] H. Cabral, K. Kataoka, Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies, *Journal of Controlled Release*. 190 (2014) 465–476. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.042>.
- [154] T. Loftsson, D. Duchene, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *International Journal of Pharmaceutics*. 329 (2007) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044>.
- [155] S.S. Davis, C. Washington, P. West, L. Illum, G. Liversidge, L. Sternson, R. Kirsh, Lipid Emulsions as Drug Delivery Systems, *Ann NY Acad Sci*. 507 (1987) 75–88. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb45793.x>.
- [156] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S.Y. Wu, A.K. Sood, S. Hua, Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery, *Front. Pharmacol*. 6 (2015). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>.

- [157] S. Kalepu, V. Nekkanti, Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 5 (2015) 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>.
- [158] M.A. Al-Omar, Ciprofloxacin: Analytical Profile, in: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, Elsevier, 2005: pp. 179–207. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(04\)31005-1](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(04)31005-1).
- [159] D.P. Elder, R. Holm, H.L. de Diego, Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility, *International Journal of Pharmaceutics*. 453 (2013) 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.028>.
- [160] S.H. Yalkowsky, J.T. Rubino, Solubilization by Cosolvents I: Organic Solutes in Propylene Glycol-Water Mixtures, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 74 (1985) 416–421. <https://doi.org/10.1002/jps.2600740410>.
- [161] C.O. Rangel-Yagui, A. Pessoa-Jr, L.C. Tavares, Micellar solubilization of drugs., (2005) 17.
- [162] H.M.C. Marques, A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, *Flavour Fragr. J.* 25 (2010) 313–326. <https://doi.org/10.1002/ffj.2019>.
- [163] J. Pitha, A. Gerloczy, A. Olivi, Parenteral Hydroxypropyl Cyclodextrins: Intravenous and Intracerebral Administration of Lipophiles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 83 (1994) 833–837. <https://doi.org/10.1002/jps.2600830615>.
- [164] S. Naeem, G. Viswanathan, M.B. Misran, Liposomes as colloidal nanovehicles: on the road to success in intravenous drug delivery, *Reviews in Chemical Engineering*. 34 (2018) 365–383. <https://doi.org/10.1515/revce-2016-0018>.
- [165] A.A. Date, M.S. Nagarsenker, Parenteral microemulsions: An overview, *International Journal of Pharmaceutics*. 355 (2008) 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.004>.
- [166] M. Sickenberg, J.P. Ballini, H. van den Bergh, Photothérapie dynamique à la Visudyne et occlusion du vaisseau afférent : rationnel d'une association synergique et options cliniques illustrées, *Journal Français d'Ophtalmologie*. 27 (2004) 93–102. [https://doi.org/10.1016/S0181-5512\(04\)96100-1](https://doi.org/10.1016/S0181-5512(04)96100-1).
- [167] R. Ideta, Y. Yanagi, Y. Tamaki, F. Tasaka, A. Harada, K. Kataoka, Effective accumulation of polyion complex micelle to experimental choroidal neovascularization in rats, *FEBS Letters*. 557 (2004) 21–25. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01315-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01315-2).
- [168] J.H. Kim, J.H. Kim, K.-W. Kim, M.H. Kim, Y.S. Yu, Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood–retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity, *Nanotechnology*. 20 (2009) 505101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/50/505101>.
- [169] E. Vighi, D. Trifunović, P. Veiga-Crespo, A. Rentsch, D. Hoffmann, A. Sahaboglu, T. Strasser, M. Kulkarni, E. Bertolotti, A. van den Heuvel, T. Peters, A. Reijerkerk, T. Euler, M. Ueffing, F. Schwede, H.-G. Genieser, P. Gaillard, V. Marigo, P. Ekström, F. Paquet-Durand, Combination of cGMP analogue and drug delivery system provides functional protection in hereditary retinal degeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115 (2018). <https://doi.org/10.1073/pnas.1718792115>.
- [170] E. Zhang, N. Osipova, M. Sokolov, O. Maksimenko, A. Semyonkin, M. Wang, L. Grigartzik, S. Gelperina, B.A. Sabel, P. Henrich-Noack, Exploring the systemic delivery of a poorly water-soluble model drug to the retina using PLGA nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 164 (2021) 105905. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105905>.

- [171] S. Prabhu, M. Ortega, C. Ma, Novel lipid-based formulations enhancing the in vitro dissolution and permeability characteristics of a poorly water-soluble model drug, piroxicam, *International Journal of Pharmaceutics*. 301 (2005) 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.032>.
- [172] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, [No title found], *Pharmaceutical Research*. 12 (1995) 413–420. <https://doi.org/10.1023/A:1016212804288>.
- [173] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen, Prodrugs: design and clinical applications, *Nat Rev Drug Discov*. 7 (2008) 255–270. <https://doi.org/10.1038/nrd2468>.
- [174] C.W. Pouton, Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 29 (2006) 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.04.016>.
- [175] C.J.H. Porter, C.W. Pouton, J.F. Cuine, W.N. Charman, Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60 (2008) 673–691. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.014>.
- [176] H. Mu, R. Holm, A. Müllertz, Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs, *International Journal of Pharmaceutics*. 453 (2013) 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.054>.
- [177] M. Brogård, E. Troedsson, K. Thuresson, H. Ljusberg-Wahren, A new standardized lipolysis approach for characterization of emulsions and dispersions, *Journal of Colloid and Interface Science*. 308 (2007) 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.12.015>.
- [178] P. Winstanley, M. Orme, The effects of food on drug bioavailability., *British Journal of Clinical Pharmacology*. 28 (1989) 621–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1989.tb03554.x>.
- [179] C. Feinle, T. Rades, B. Otto, M. Fried, Fat digestion modulates gastrointestinal sensations induced by gastric distention and duodenal lipid in humans, *Gastroenterology*. 120 (2001) 1100–1107. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.23232>.
- [180] N. Subramanian, S.K. Ghosal, Enhancement of gastrointestinal absorption of poorly water soluble drugs via lipid based systems, *Indian J Exp Biol*. 42 (2004) 1056–1065.
- [181] C.M. O’Driscoll, B.T. Griffin, Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility—The potential impact of lipid-based formulations, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60 (2008) 617–624. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.012>.
- [182] D. Fleisher, C. Li, Y. Zhou, L. Pao, A. Karim, Drug, Meal and Formulation Interactions Influencing Drug Absorption After Oral Administration: Clinical Implications, *Clinical Pharmacokinetics*. 36 (1999) 233–254. <https://doi.org/10.2165/00003088-199936030-00004>.
- [183] L. Benet, C. Cummins, C. Wu, Transporter-Enzyme Interactions: Implications for Predicting Drug-Drug Interactions from In Vitro Data, *CDM*. 4 (2003) 393–398. <https://doi.org/10.2174/1389200033489389>.
- [184] C.-Y. Wu, L.Z. Benet, Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System, *Pharm Res*. 22 (2005) 11–23. <https://doi.org/10.1007/s11095-004-9004-4>.
- [185] M.C. Carey, D.M. Small, C.M. Bliss, Lipid Digestion and Absorption, *Annu. Rev. Physiol*. 45 (1983) 651–677. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.45.030183.003251>.

- [186] H.I. Friedman, B. Nylund, Intestinal fat digestion, absorption, and transport A review, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 33 (1980) 1108–1139. <https://doi.org/10.1093/ajcn/33.5.1108>.
- [187] B. Borgström, Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A2, and fatty acid for the digestion of dietary fat, *Gastroenterology*. 78 (1980) 954–962. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(80\)90777-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(80)90777-5).
- [188] O. Hernell, J.E. Staggars, M.C. Carey, Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings, *Biochemistry*. 29 (1990) 2041–2056. <https://doi.org/10.1021/bi00460a012>.
- [189] S. Phan, S. Salentinig, C.A. Prestidge, B.J. Boyd, Self-assembled structures formed during lipid digestion: characterization and implications for oral lipid-based drug delivery systems, *Drug Deliv. and Transl. Res.* 4 (2014) 275–294. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0168-5>.
- [190] C.J.H. Porter, N.L. Trevaskis, W.N. Charman, Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs, *Nat Rev Drug Discov.* 6 (2007) 231–248. <https://doi.org/10.1038/nrd2197>.
- [191] T.T.T. Tran, M. Buttet, V. Traynard, P. Besnard, H. Poirier, I. Niot, Mécanisme d'absorption intestinale des acides gras à longue chaîne : rôle émergent du CD36, *OCL*. 19 (2012) 200–208. <https://doi.org/10.1051/ocl.2012.0461>.
- [192] C.M. O'Driscoll, Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 15 (2002) 405–415. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00051-9).
- [193] J.A. Yáñez, S.W.J. Wang, I.W. Knemeyer, M.A. Wirth, K.B. Alton, Intestinal lymphatic transport for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63 (2011) 923–942. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.05.019>.
- [194] S. Caliph, W. (Fried) Faassen, G. Vogel, C. Porter, Oral Bioavailability Assessment and Intestinal Lymphatic Transport of Org 45697 and Org 46035, Two Highly Lipophilic Novel Immunomodulator Analogues, *CDD*. 6 (2009) 359–366. <https://doi.org/10.2174/156720109789000500>.
- [195] A.S. Elz, N.L. Trevaskis, C.J.H. Porter, J.M. Bowen, C.A. Prestidge, Smart design approaches for orally administered lipophilic prodrugs to promote lymphatic transport, *Journal of Controlled Release*. 341 (2022) 676–701. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.003>.
- [196] L.V. Leak, The structure of lymphatic capillaries in lymph formation, *Fed Proc.* 35 (1976) 1863–1871.
- [197] S. Kalepu, M. Manthina, V. Padavala, Oral lipid-based drug delivery systems – an overview, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 3 (2013) 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.10.001>.
- [198] Md. Akhlaquer Rahman, R. Harwansh, Mohd. Aamir Mirza, S. Hussain, A. Hussain, Oral Lipid Based Drug Delivery System (LBDDS): Formulation, Characterization and Application: A Review, *CDD*. 8 (2011) 330–345. <https://doi.org/10.2174/156720111795767906>.
- [199] K. Vithani, V. Jannin, C.W. Pouton, B.J. Boyd, Colloidal aspects of dispersion and digestion of self-dispersing lipid-based formulations for poorly water-soluble drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 142 (2019) 16–34. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.008>.

- [200] S. Kalepu, M. Manthina, V. Padavala, Oral lipid-based drug delivery systems – an overview, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 3 (2013) 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.10.001>.
- [201] R. Ghadi, N. Dand, BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development, *Journal of Controlled Release*. 248 (2017) 71–95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.014>.
- [202] Y.-M. Yin, F.-D. Cui, C.-F. Mu, M.-K. Choi, J.S. Kim, S.-J. Chung, C.-K. Shim, D.-D. Kim, Docetaxel microemulsion for enhanced oral bioavailability: Preparation and in vitro and in vivo evaluation, *Journal of Controlled Release*. 140 (2009) 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.08.015>.
- [203] L. Hu, X. Tang, F. Cui, Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 56 (2010) 1527–1535. <https://doi.org/10.1211/0022357044959>.
- [204] N. Dudhipala, K.Y. Janga, Lipid nanoparticles of zaleplon for improved oral delivery by Box–Behnken design: optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 43 (2017) 1205–1214. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1304957>.
- [205] N. Poonia, R. Kharb, V. Lather, D. Pandita, Nanostructured lipid carriers: versatile oral delivery vehicle, *Future Science OA*. 2 (2016) FSO135. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2016-0030>.
- [206] Z. Tian, Y. Yi, H. Yuan, J. Han, X. Zhang, Y. Xie, Y. Lu, J. Qi, W. Wu, Solidification of nanostructured lipid carriers (NLCs) onto pellets by fluid-bed coating: Preparation, in vitro characterization and bioavailability in dogs, *Powder Technology*. 247 (2013) 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.07.010>.
- [207] M. Daeihamed, S. Dadashzadeh, A. Haeri, M. Akhlaghi, Potential of Liposomes for Enhancement of Oral Drug Absorption, *CDD*. 13 (2016) 1–1. <https://doi.org/10.2174/1567201813666160115125756>.
- [208] Z. Li, M. Zhang, C. Liu, S. Zhou, W. Zhang, T. Wang, M. Zhou, X. Liu, Y. Wang, Y. Sun, J. Sun, Development of Liposome containing sodium deoxycholate to enhance oral bioavailability of itraconazole, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 12 (2017) 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.006>.
- [209] R. Neslihan Gursoy, S. Benita, Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 58 (2004) 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2004.02.001>.
- [210] S. Yang, R.N. Gursoy, G. Lambert, S. Benita, Enhanced Oral Absorption of Paclitaxel in a Novel Self-Microemulsifying Drug Delivery System with or Without Concomitant Use of P-Glycoprotein Inhibitors, *Pharm Res*. 21 (2004) 261–270. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016238.44452.f1>.
- [211] M. Plaza-Oliver, M.J. Santander-Ortega, M.Victoria. Lozano, Current approaches in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery, *Drug Deliv. and Transl. Res*. 11 (2021) 471–497. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00908-7>.
- [212] A.A. Ashour, A.A. Ramadan, D.A. Abdelmonsif, A.H. El-Kamel, Enhanced oral bioavailability of Tanshinone IIA using lipid nanocapsules: Formulation, in-vitro appraisal and pharmacokinetics, *International Journal of Pharmaceutics*. 586 (2020) 119598. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119598>.

Travaux de thèse

Chapitre 4 : Caractérisation physico-chimique et biopharmaceutique de l'IP-DHA et de la Q- IP-DHA

I. Introduction

Les résultats prometteurs dans le traitement de la DMLA atrophique et de la maladie génétique de Stargardt (chapitre 2, partie 2) obtenus avec les nouvelles molécules lipophénoliques (IP-DHA et Q-IP-DHA) développées dans le laboratoire nous ont permis de continuer leur développement. Pour rappel, une preuve de concept de l'efficacité *in vivo* sur un modèle de la maladie de Stargardt a été obtenue par voie IV avec l'IP-DHA mais pas encore avec la Q-IP-DHA. L'objectif de la première partie de cette étude est donc (1) de formuler la molécule LEAD : IP-DHA pour une administration par voie orale et (2) de formuler la molécule Back up Lead Q-IP-DHA pour la voie IV afin d'obtenir une preuve de concept avec cette molécule (**tableau 17**).

Tableau 17 : Résultats précédemment obtenus avec la molécule Lead (IP-DHA) et backup Lead (Q-IP-DHA)

	IP-DHA	Q-IP-DHA
Activité antioxydante <i>in vitro</i>	+	++
Activité anti-stress carbonylé <i>in vitro</i>	+	+
Protection contre la toxicité induite par l'A2E	+	++
Efficacité par voie iv <i>in vivo</i> (preuve de concept)	+	A évaluer
Efficacité par voie orale <i>in vivo</i>	A évaluer	A évaluer

Avant de commencer les études de formulations (chapitre 5), il est important de déterminer les caractéristiques physico-chimiques (solubilité dans du tampon PBS, solubilité en milieu gastrique et en milieu intestinale simulé, log P) et les propriétés biopharmaceutiques (perméabilité à travers les entérocytes et métabolisation par les cellules hépatiques) des SA. Pour pouvoir être efficace, le PA administré par voie orale doit pouvoir être libéré et solubilisé dans le TGI pour être absorbé et ensuite distribué jusqu'au site d'action en concentration suffisante [1]. Ces différentes étapes dépendent essentiellement des caractéristiques physico-chimiques et des propriétés biopharmaceutiques de la molécule [2]. Ainsi la solubilité et la perméabilité de la molécule sont des paramètres essentiels pour nous permettre de connaître la classification BCS de la molécule et proposer une formulation adaptée capable d'améliorer les propriétés de la SA qui limiteraient sa biodisponibilité et donc son efficacité.

II. Matériels & Méthodes

2.1 Matériel

L'IP-DHA et la Q-IP-DHA ont été synthétisés comme décrit précédemment [3]. L'acétonitrile, le méthanol (MeOH) et le chlorure de sodium (NaCl) ont été achetés chez Honeywell (Charlotte, NC, USA). La pepsine de la muqueuse gastrique porcine, la pancréatine du pancréas porcin (4x les spécifications USP), l'extrait biliaire porcin, le NaOH et les comprimés de solution saline tamponnée au phosphate ont été achetés chez Sigma (Saint Louis, MO, USA). Le CaCl₂ a été acheté auprès de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Le HCl (37%) provient de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA).

2.2 Détermination du Log P de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA

Le log P de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA ont été évalués *in silico* en utilisant le logiciel ALOGPS [4].

2.3 Analyse par µHPLC-MS/MS

L'analyse quantitative a été réalisée par µHPLC (Sciex, ExionLC AD) avec une colonne C18 (phenomenex C18 luna polar, 30 x 2,1mm ID, 100A) comme phase stationnaire. La phase mobile était constituée de 0,1 % d'acide formique dans l'eau (phase A) et de 0,1 % d'acide formique dans l'acétonitrile (phase B) avec un mode de gradient commençant par un ratio de 30/70% (v/v) à 0min puis à 0/100% à 1,90min et enfin à 30/70% à 3min (débit de 0,7mL.min⁻¹) pendant 10min. Les échantillons ont été analysés sur le Sciex 5500- triple-quadrupole MS, mode d'ionisation positive, température capillaire 300°C, tension capillaire 5,5Kv.

2.4 Solubilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA

Les solubilités de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA ont été évaluées dans le PBS pH 7,4, le fluide gastrique simulé à pH 1,5 (SGF) et le fluide intestinal simulé à pH 7,4 (SIF) (**tableau 18**) sans enzymes (pepsine et pancréatine). Un excès d'IP-DHA et de Q-IP-DHA a été ajouté à chaque milieu et maintenu sous agitation magnétique à température ambiante pendant 24h. Ensuite, les mélanges ont été centrifugés à 3000rpm pendant 15min. Le surnageant de chaque

échantillon a été dilué avec du méthanol. La concentration de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA dans chaque échantillon a été déterminée en utilisant l'analyse μ HPLC/MS-MS (section 2.3)

Tableau 18 : Composition des milieux SGF et ISF utilisés pour l'étude de stabilité

SGF	ISF
2g NaCl	5mL de pancréatine (4,80mg/mL)
7mL HCl 37%	8mL de sels biliaires (5mg/mL)
3,2g pepsine	2mL de CaCl ₂ (83,5mg/mL)
1L d'eau	PBS pH 7,4
pH = 1,5	pH = 7,4

2.5 Perméabilité des SA sur cellules Caco-2

L'analyse de perméabilité a été faite par Eurofins. Les cellules Caco-2, cellules épithéliales intestinales humaines dérivées d'un adénocarcinome colorectal ont étéensemencées à 1×10^5 cellules/cm² dans des plaques Multiscreen™ à 96 puits (Millipore). Cet essai a été réalisé dans le sens pôle apical vers le pôle basolatéral (A-B) et B-A. L'IP-DHA et la Q-IP-DHA ont été préparés à 10 μ M dans HBSS-MES (pH 6,5) ou HBSS-HEPES (pH 7,4) avec une concentration finale de DMSO de 1%. La solution de travail a ensuite été centrifugée et le surnageant est ajouté au côté donneur. La plaque d'essai a été incubée à 37°C avec une légère agitation pendant 60min ou 40min pour l'essai A-B ou B-A. Les échantillons aliquotés du côté donneur à T0 et au point final et du côté du récepteur au point final ont été analysés par HPLC-MS/MS (section 2.3).

Le coefficient de perméabilité apparent (P_{app}) en cm/s du Q-IP-DHA et de l'IP-DHA a été calculé selon l'équation suivante :

$$P_{app} = \frac{V_R \times C_{R(end)}}{\Delta t} \times \frac{1}{A \times (C_{D(min)} - C_{R(min)})}$$

Où V_R est le volume de la chambre de réception, $C_{R(end)}$ la concentration de Q-IP-DHA ou d'IP-DHA dans la chambre réceptrice au point de temps final, Δt le temps d'incubation, A la surface

de la monocouche cellulaire, $C_{D (mind)}$ la concentration calculée au point médian du composé à tester du côté du donneur, qui est la valeur moyenne de la concentration du donneur au temps 0min et de la concentration du donneur au point de temps final. $C_{R (mind)}$ est la concentration à mi-parcours du composé testé du côté récepteur, qui correspond à la moitié de la concentration du récepteur au point final.

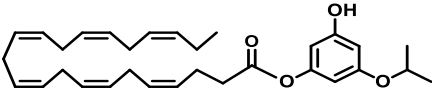
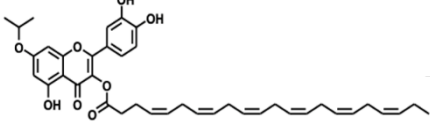
2.6 Stabilité des SA sur les microsomes humains

L'analyse de stabilité a été faite par Eurofins. La stabilité métabolique de la Q-IP-DHA et de l'IP-DHA sur des microsomes humains (microsomes S9, hépatocytes cryoconservés, CYP recombinant, UGT recombinante) a été évaluée, exprimée en pourcentage de Q-IP-DHA ou d'IP-DHA restant, le Q-IP-DHA et l'IP-DHA ont été pré-incubés sur des microsomes hépatiques regroupés dans un tampon phosphate (pH 7,4) à 10mM pendant 5min dans un bain-marie à 37°C avec agitation. La réaction a été initiée par l'ajout du système générateur de NADPH et incubée pendant 0, 15, 30, 45 et 60min. La réaction a été stoppée en ajoutant le mélange d'incubation dans un mélange d'acétonitrile/méthanol (rapport 1:3 v/v). Les échantillons ont été mélangés et centrifugés (3000rpm, 2 min) pour précipiter les protéines et les surnageants ont été recueillis. La concentration de Q-IP-DHA et d'IP-DHA a été déterminée par analyse μ HPLC-MS/MS décrite dans la section 2.3. La demi-vie ($T_{1/2}$) a été estimée à partir de la pente de la plage linéaire initiale de la courbe logarithmique du composé restant (%) en fonction du temps, en supposant une cinétique de premier ordre.

III. Résultats et discussion

Les PM de l'IP-DHA de 478g/mol et de la Q-IP-DHA de 654,79g/mol ainsi que la valeur de leur log P déterminés à 7,91 pour l'IP-DHA et à 7,92 pour la Q-IP-DHA (**tableau 19**) nous indiquent que ces molécules et en particulier la Q-IP-DHA ne suivent pas les règles de Lipinski qui sont un indicateur du passage favorable des molécules au travers de la barrière digestive. En effet selon ces règles les molécules ayant un PM < 500g/mol, un log P < 5 et > 2 et un maximum de 5 liaisons hydrogène donneurs (< 5 Oxygène-Hydrogène et d'azote-hydrogène) sont généralement absorbés plus facilement à travers les entérocytes par diffusion passive que les molécules plus grosses [5]. La Q-IP-DHA pourrait donc être moins bien absorbée que l'IP-DHA après une administration par voie orale.

Tableau 19 : Structure chimique, PM et Log P de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA

	IP-DHA	Q-IP-DHA
Structure		
PM	478g/mol	654,79g/mol
Log P	7,91	7,92
Nombre de liaisons donneurs H	1	3

Après une administration par voie orale, lors de la phase d'absorption, une molécule avec un Log P > 5 pourra préférentiellement rejoindre la circulation générale *via* la voie lymphatique [6,7]. Les deux SA sont donc de bonnes candidates pour un passage par la voie lymphatique.

3.1 Détermination de la solubilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA

La solubilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA a été évaluée dans le tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,4 ainsi que dans des fluides gastriques et intestinaux simulés (SGF et SIF).

Tableau 20 : Solubilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA dans différents milieux aqueux ($n=3$)

	IP-DHA	Q-IP-DHA
Solubilité PBS pH 7,4	11,54 ± 1,53µg/mL	22,2 ± 0,62µg/mL
Solubilité SGF pH 1,5	7,39 ± 0,26µg/mL	187,2 ± 1,46µg/mL
Solubilité SIF pH 7,4	10,19 ± 0,12µg/mL	118,6 ± 2,59µg/mL

Globalement, l'IP-DHA s'est avéré peu soluble dans tous les milieux aqueux (**tableau 20**), avec une concentration de : 11,54 ± 1,53µg/mL dans le PBS, à 10,19 ± 0,12µg/mL dans le SIF et encore plus faible à 7,39 ± 0,26µg/mL dans le SGF. La Q-IP-DHA est également peu soluble avec une concentration de 22,2 ± 0,62µg/mL dans le PBS, 187,2 ± 1,46µg/mL dans le SGF et 118,6 ± 2,59µg/mL dans le SIF. La solubilité des deux SA en milieu aqueux doit être améliorée aussi bien dans le cas d'une administration par voie IV pour éviter tout risque de thrombose

[8] que pour une administration *per os* pour améliorer la biodisponibilité de ces molécules par l'utilisation de solvants, co-solvants, surfactants ou de formulations [9].

3.2 Détermination de la perméabilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA sur modèle Caco-2

Des études de perméabilité sur des cellules intestinales humaines, Caco-2, ont été réalisées pour compléter les données de log P, de PM et de liaisons H (**tableau 19**). Le modèle Caco-2 est le modèle de référence pour évaluer la perméabilité des SA chez l'homme [10].

Tableau 21 : Perméabilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA *in vitro* sur modèle Caco-2 ($n=3$)

	IP-DHA	Q-IP-DHA
A-B permeability (Caco-2, pH 6.5/7.4)	$1,0 \pm 0,14 \times 10^{-6} \text{cm/s}$	$0,0 \pm 0,00 \times 10^{-6} \text{cm/s}$
B-A permeability (Caco-2, pH 6.5/7.4)	$0,7 \pm 0,05 \times 10^{-6} \text{cm/s}$	$0,01 \pm 0,00 \times 10^{-6} \text{cm/s}$

La vitesse diffusion de l'IP-DHA de la partie apicale à la partie basolatérale (A-B) a été déterminée à $1,0 \pm 0,14 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ et de la partie basolatérale à partie apicale (B-A) à $0,7 \pm 0,05 \times 10^{-6} \text{cm/s}$. Pour la Q-IP-DHA, aucun passage n'a été mis en évidence avec des valeurs de vitesse de diffusion nulle dans le cas A-B et presque nulle ($0,01 \pm 0,00 \times 10^{-6} \text{cm/s}$) pour le cas B-A (**tableau 21**). Ces valeurs confirment la faible diffusion des deux SA et particulièrement de la Q-IP-DHA au travers de la membrane et donc leur classification en molécules peu perméables [11]. A titre de comparaison, la caféine qui est un composé très perméable, présente des valeurs de perméabilité sur modèle Caco-2 de 46,3 à $53,5 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ pour le passage A-B et 45,6 à $49,4 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ pour le passage B-A [12].

l'IP-DHA et la Q-IP-DHA étant des molécules peu solubles et peu perméables, classées en BCS classe IV [13] conduisent à une absorption par voie orale erratique et très limitée, avec des variations de biodisponibilité inter et intra-individuelle élevées [14]. Ces paramètres de solubilité et de perméabilité pourraient être améliorés en modifiant certains groupements présents sur la molécule [2], mais cette démarche pourrait conduire à une perte d'efficacité et/ou à une modification des propriétés thérapeutiques. Ces paramètres seront donc améliorés en développant des formulations innovantes [15].

3.3 Détermination de la stabilité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA sur microsomes humains

Après administration et absorption des SA par voie orale, une majorité des substances actives va passer par la veine porte puis par le foie avant de rejoindre la circulation générale [16]. Ce test permet de savoir dans quelle proportion les molécules administrées par voie orale vont être métabolisées par l'effet de premier passage hépatique. La quantité d'IP-DHA et de la Q-IP-DHA dans le temps (stabilité métabolique) a ainsi été évaluée sur des microsomes hépatiques.

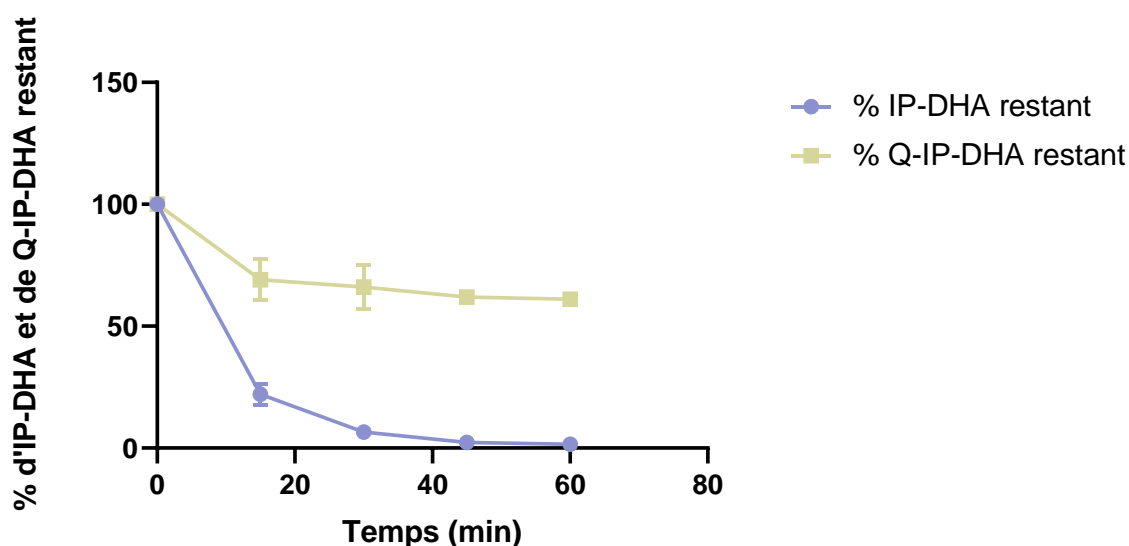


Figure 39 : Cinétique de dégradation de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA sur microsomes hépatiques humains

Les résultats montrent que l'IP-DHA et la Q-IP-DHA sont métabolisés par les microsomes de façon différente (**figure 39**). L'IP-DHA présente une dégradation très rapide avec un $T_{1/2}$ de 10min alors que la Q-IP-DHA n'est que partiellement dégradée car nous retrouvons plus de 65% de Q-IP-DHA à 60min ($T_{1/2} > 60$ min). La métabolisation hépatique est un facteur limitant la biodisponibilité des SA administrées par voie orale. Cependant comme l'IP-DHA présente un $\log P > 5$, il est possible d'envisager un passage préférentiel dans la circulation systémique par la voie lymphatique afin de limiter cette métabolisation.

IV. Conclusion

Les deux molécules lipophénoliques développées présentent des caractéristiques physico-chimiques et biopharmaceutiques assez similaires (**tableau 22**) qui les classent en composés de BCS classe IV (faiblement solubles et faiblement perméables). La Q-IP-DHA présente toutefois un avantage par rapport au Lead IP-DHA car elle est plus soluble dans l'eau et n'est que partiellement dégradée par les hépatocytes, mais sa perméabilité intestinale est plus réduite en raison de ses caractéristiques physicochimiques plus défavorables (PM, nombre d'O-H et de N-H > 5). Il sera donc envisagé de développer des formulations permettant de passer par la voie lymphatique pour l'IP-DHA et des formulations améliorant la pénétration à travers les entérocytes pour la Q-IP-DHA.

Tableau 22 : Récapitulatif des propriétés de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA

	IP-DHA	Q-IP-DHA
Solubilité aqueuse	--	-
Perméabilité	-	--
Stabilité sur microsomes	-	+

Les caractéristiques physico-chimiques et biopharmaceutiques des SA sont des paramètres importants à déterminer au cours du processus de développement de nouvelles molécules actives. Les études en cours dans ce projet montrent l'importance du greffage par une fonction ester (instable) pour conserver l'activité et l'optimisation de leurs propriétés biopharmaceutiques par modification chimique ne semble donc pas être possible. Le greffage de groupements labiles sur des fonctions phénoliques pourraient cependant permettre de changer la solubilité et de réduire la métabolisation de certains lipophénols. L'autre solution pour améliorer ces paramètres serait donc de formuler les SA efficacement pour augmenter leur biodisponibilité. Le développement de nos molécules d'intérêt classées BCS classe IV pour une administration par voie orale est un véritable challenge compte tenu de leurs caractéristiques. Ces dernières années de nombreuses formulations innovantes ont été étudiées pour permettre d'améliorer la biodisponibilité de ce type de molécule. Parmi les formulations, les formulations lipidiques LBBDS (chapitre 3, partie 3.3) ont montré des résultats très encourageants. Dans le chapitre suivant, le développement de formulations pour la voie IV et orale des deux molécules sera présenté.

Références

- [1] M.J. Rein, M. Renouf, C. Cruz-Hernandez, L. Actis-Goretta, S.K. Thakkar, M. da Silva Pinto, Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy: Bioavailability of bioactive food compounds, *Br J Clin Pharmacol.* 75 (2013) 588–602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x>.
- [2] M. Yazdanian, Overview of Determination of Biopharmaceutical Properties for Development Candidate Selection, *Current Protocols in Pharmacology.* 60 (2013). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0917s60>.
- [3] C. Crauste, C. Vigor, P. Brabet, M. Picq, M. Lagarde, C. Hamel, T. Durand, J. Vercauteren, Synthesis and Evaluation of Polyunsaturated Fatty Acid-Phenol Conjugates as Anti-Carbonyl-Stress Lipophenols: Polyunsaturated Fatty Acid-Phenol Conjugates, *Eur. J. Org. Chem.* 2014 (2014) 4548–4561. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201402282>.
- [4] J. Kujawski, M.K. Bernard, A. Janusz, W. Kuźma, Prediction of log *P* : ALOGPS Application in Medicinal Chemistry Education, *J. Chem. Educ.* 89 (2012) 64–67. <https://doi.org/10.1021/ed100444h>.
- [5] L.Z. Benet, C.M. Hosey, O. Ursu, T.I. Oprea, BDDCS, the Rule of 5 and drugability, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 101 (2016) 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.007>.
- [6] P. Ryšánek, T. Grus, M. Šíma, O. Slanař, Lymphatic Transport of Drugs after Intestinal Absorption: Impact of Drug Formulation and Physicochemical Properties, *Pharm Res.* 37 (2020) 166. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02858-0>.
- [7] A.S. Elz, N.L. Trevaskis, C.J.H. Porter, J.M. Bowen, C.A. Prestidge, Smart design approaches for orally administered lipophilic prodrugs to promote lymphatic transport, *Journal of Controlled Release.* 341 (2022) 676–701. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.003>.
- [8] P. Li, L. Zhao, Developing early formulations: Practice and perspective, *International Journal of Pharmaceutics.* 341 (2007) 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.049>.
- [9] B. Bittner, R.J. Mountfield, Intravenous administration of poorly soluble new drug entities in early drug discovery: the potential impact of formulation on pharmacokinetic parameters, *Curr Opin Drug Discov Devel.* 5 (2002) 59–71.
- [10] P. Artursson, J. Karlsson, Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 175 (1991) 880–885. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)91647-U](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)91647-U).
- [11] T.P. Stockdale, V.L. Challinor, R.P. Lehmann, J.J. De Voss, J.T. Blanchfield, Caco-2 Monolayer Permeability and Stability of *Chamaelirium luteum* (False Unicorn) Open-Chain Steroidal Saponins, *ACS Omega.* 4 (2019) 7658–7666. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00496>.
- [12] L. Smetanova, V. Stetinova, D. Kholova, J. Kvetina, J. Smetana, Z. Svoboda, Caco-2 cells and Biopharmaceutics Classification System (BCS) for prediction of transepithelial transport of xenobiotics (model drug: caffeine), *Neuro Endocrinol Lett.* 30 Suppl 1 (2009) 101–105.
- [13] M.G. Papich, M.N. Martinez, Applying Biopharmaceutical Classification System (BCS) Criteria to Predict Oral Absorption of Drugs in Dogs: Challenges and Pitfalls, *AAPS J.* 17 (2015) 948–964. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9743-7>.

- [14] M. Markovic, M. Zur, I. Ragatsky, S. Cvijić, A. Dahan, BCS Class IV Oral Drugs and Absorption Windows: Regional-Dependent Intestinal Permeability of Furosemide, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1175. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121175>.
- [15] R. Ghadi, N. Dand, BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development, *Journal of Controlled Release*. 248 (2017) 71–95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.014>.
- [16] S.A. Roberts, DRUG METABOLISM | Overview, in: *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, 2005: pp. 293–305. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00108-4>.

Chapitre 5 : Développement et caractérisation de formulations IV et orales pour l'IP-DHA et la Q-IP-DHA

I. Développement et caractérisation d'une formulation IV pour la Q-IP-DHA et l'IP-DHA

1.1 Introduction

Les études *in vitro* ont démontré la capacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA à améliorer la survie cellulaire de cellules rétinienne après induction d'un stress oxydant, carbonylé et contre la toxicité de l'A2E [1]. Ces mécanismes étant directement impliqués dans la physiopathologie de la DMLA atrophique et de la maladie génétique de Stargardt, il est nécessaire d'obtenir une preuve de concept de l'efficacité de ces molécules par voie IV pour le traitement de ces pathologies.

Comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent, la Q-IP-DHA est une molécule très faiblement soluble dans l'eau, du fait de sa structure chimique, car le cycle flavonoïdique de l'IP-DHA est sujet au phénomène de π stacking, limitant sa solubilité en milieu aqueux. Mais, pour pouvoir être administrée par voie IV la Q-IP-DHA devra être solubilisée [2]. Différentes approches peuvent être proposées pour améliorer la solubilité [3,4] telles que des méthodes conventionnelles comme l'ajustement du pH [5], l'utilisation de co-solvants [6], la formation de micelles avec des surfactants [7], l'utilisation de cyclodextrines [8], d'émulsions [9] et de liposomes [10].

L'objectif de cette étude est de proposer une formulation IV adaptée à la Q-IP-DHA pour pouvoir l'administrer par voie IV chez la souris ABCA4KO (modèle de la maladie génétique de Stargardt [11]) afin d'évaluer son efficacité protectrice après induction d'un stress lumineux aigu provoquant une dégénérescence des photorécepteurs. La formulation doit permettre une solubilisation ou une dispersion de la Q-IP-DHA en quantité suffisante pour avoir un effet thérapeutique lors de l'administration mais il faut aussi s'assurer de la stabilité de la formulation après administration pour éviter la re-précipitation de la Q-IP-DHA. Cette formulation sera également évaluée pour savoir si elle peut permettre de solubiliser l'IP-DHA afin de pouvoir comparer l'efficacité de l'IP-DHA complexé avec la BSA (précédemment évaluée *in vivo* : chapitre 2, partie 2.1.2) et cette nouvelle formulation par voie IV.

1.2 Matériel & Méthodes

1.2.1 Matériel

La Q-IP-DHA et l'IP-DHA ont été synthétisés comme décrit précédemment [12]. Le Kolliphor® HS 15 a été acheté chez BASF (Allemagne). L'acétonitrile, le méthanol (MeOH) et le chlorure de sodium (NaCl) ont été achetés chez Honeywell (USA). Le HCL 37% provient de Fischer Scientific (USA) et l'éthanol, le glycofurol et le PBS pH 7,4 a été acheté chez Sigma (USA).

1.2.2 Solubilité de la Q-IP-DHA dans différents excipients

La solubilité de la Q-IP-DHA a été déterminée dans différents excipients (éthanol, kolliphor® HS 15, glycofurol) utilisés pour les formulations de la voie IV. Pour cela, la Q-IP-DHA a été ajoutée en excès (> 40mg/mL) dans un volume d'excipient déterminé sous légère agitation pendant 24h à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (centrifugeuse Sigma 2K15, 10 000rpm, 15min) et le surnageant a été prélevé et dilué dans le méthanol avant d'être quantifié comme décrit dans la section 1.2.6

1.2.3 Préparation des micelles vides (M-V) et des micelles chargées en Q-IP-DHA (M-Q-IP-DHA)

La Q-IP-DHA a été solubilisée à une concentration de 30mg/mL dans le Kolliphor® HS 15 à 40°C avec bain marie et agitation (300rpm). Une fois la Q-IP-DHA complètement solubilisée, un volume déterminé de solution saline à 0,9% a été ajouté sous agitation magnétique douce pour former spontanément des micelles chargées de Q-IP-DHA (M-Q-IP-DHA). Des micelles vides (M-V) ont été préparées par la même méthode, sans ajout de Q-IP-DHA. Les formulations ont été filtrées sur des filtres de polycarbonate 0,22µM avant d'être analysées.

1.2.4 Détermination du ratio Kolliphor® HS 15/eau

Différents ratios volumiques de Kolliphor® HS 15/solution saline 0,9% allant de 90/10 à 20/80 (v/v) ont été testés. La précipitation du Q-IP-DHA a été évaluée macroscopiquement lors de l'ajout de la solution saline 0,9%.

1.2.5 Stabilité de la formulation M-Q-IP-DHA en milieu physiologique

100µL de M-Q-IP-DHA à 6mg/mL ont été dilués dans 1,8mL de PBS pH 7,4 sous agitation magnétique douce (300rpm) pendant 1 heure pour simuler les conditions de dilution lors d'une administration IV. Ensuite, les mélanges ont été centrifugés à 10 000rpm (centrifugeuse Sigma 2K15) pendant 10 minutes. La précipitation de la Q-IP-DHA a été observée visuellement après centrifugation. Les mélanges sont à nouveau centrifugés à 3000rpm pendant 10min et le surnageant de chaque échantillon est prélevé et dilué dans du méthanol. La concentration de Q-IP-DHA dans chaque échantillon a été déterminée par HPLC/UV (section 1.2.6).

1.2.6 Taux de chargement et pourcentage d'encapsulation en Q-IP-DHA

La quantification de la Q-IP-DHA chargée dans les M-Q-IP-DHA a été effectuée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sur l'appareil de modèle LC6-2012HT (Shimadzu, Kyoto, Japon) avec une colonne Prontosil C8 (120-5-C8 SH, 5µm, 250 x 4,0mm) couplée à un détecteur UV-visible (Shimadzu, Kyoto, Japon). Le débit a été réglé à 1mL/min. et la détection mesurée à 204nm. La phase mobile était un mélange d'eau et d'acétonitrile en mode isocratique avec un rapport 90/10 (v/v) d'acétonitrile/eau avec de l'acide formique à 0,2%. La courbe d'étalonnage était linéaire de 1 à 200µg/mL ($r^2 = 0,9992$).

Le taux de chargement a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Taux de chargement} = \frac{\text{Quantité de Q - IP - DHA ajouté}}{\text{Quantité totale de Q - IP - DHA + d'excipients}}$$

Le taux d'encapsulation a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ Encapsulation} = \frac{\text{Quantité de Q - IP - DHA dans les micelles}}{\text{Quantité de Q - IP - DHA ajoutée}} \times 100$$

1.2.7 Détermination de taille et potentiel zêta des M-V et M-Q-IP-DHA

La distribution de taille et le potentiel zêta des M-V et M-Q-IP-DHA obtenus après dilution dans 1,8mL de PBS pH 7,4 ont été étudiés par spectroscopie de corrélation de photons (PCS) à l'aide d'un appareil Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) équipé d'un laser He-Ne (632,8nm) à une température de 20 °C et à un angle de diffusion de 173°

pour la détection. Pour déterminer la taille des particules et la distribution de taille, chaque échantillon de micelles a été placé dans une cuvette. La taille des particules a été exprimée en tant que diamètre moyen tandis que la distribution de taille des particules a été exprimée en tant qu'indice de polydispersité (PDI). Pour la détermination du potentiel zêta, chaque formulation a été transférée dans des cellules capillaires DT51070 (Malvern).

1.2.8 Adaptation de la formulation à l'IP-DHA

La formulation développée avec la Q-IP-DHA a été évaluée pour savoir si elle pouvait être également utilisée pour l'IP-DHA. La taille, le taux de chargement et le pourcentage d'encapsulation de l'IP-DHA dans les micelles de Kolliphor® HS 15 ont été évalués pour une concentration de 6mg/mL d'IP-DHA de la même façon que pour la Q-IP-DHA.

1.3 Résultats et discussion

1.3.1 Choix de la formulation

Les premiers essais réalisés à base d'éthanol et de glycofurol n'ont pas permis de charger suffisamment de SA (6mg/mL) pour le développement de la formulation IV. Nous nous sommes donc orientés vers le développement d'une formulation micellaire à base de Kolliphor® HS 15 [12] (**figure 40**).

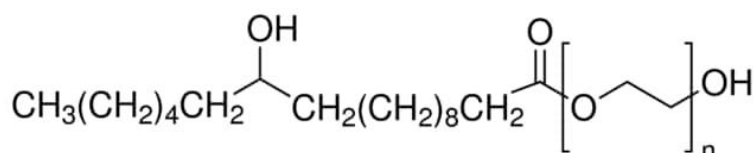


Figure 40 : Structure chimique du Kolliphor® HS 15

Il s'agit d'un tensioactif amphiphile non ionique composé à 70% de composants mono- et di-ester éthoxylés, dont le groupe carboxylique et le groupe hydroxy peuvent être éthoxylés, et à environ 30% de PEG libres [13]. Le Kolliphor® HS 15 est un excipient qui présente une bonne biocompatibilité et une faible toxicité à sa concentration micellaire critique de 0,005%-0,02% et permet de former spontanément des micelles dans un environnement aqueux [14,15]. La formation de micelles permet de charger des composés lipophiles tels que la Q-IP-DHA dans son cœur lipophile [16] par solubilisation micellaire (**figure 41**).

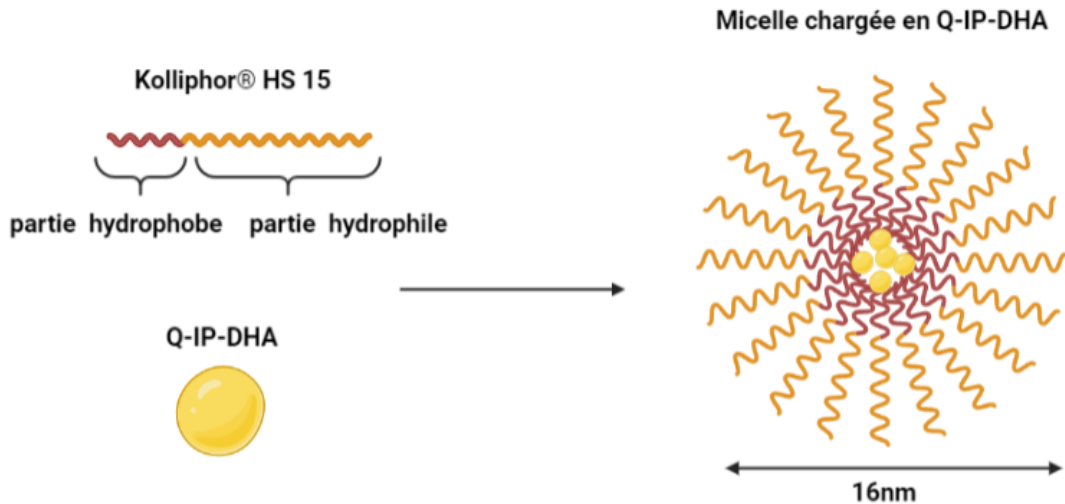


Figure 41 : Schéma d'une micelle de Kolliphor® HS 15 chargée en Q-IP-DHA

En plus de la capacité des micelles à augmenter la solubilité d'actifs lipophiles, elles permettent aussi de protéger l'actif de la dégradation dans le sang en limitant les interactions avec les protéines et les cellules du sang [17]. L'actif n'étant pas reconnu par les macrophages, son temps de demi-vie est augmenté dans la circulation sanguine [18]. Une étude a montré que l'utilisation de Kolliphor® HS 15 augmentait le temps de résidence de la colchicine dans le sang (alcaloïde tricyclique) et diminuait sa clairance après administration IV chez le rat [19]. Les micelles présentent donc de nombreux avantages pour l'administration de SA par voie IV.

1.3.2 Influence de la concentration en Kolliphor® HS 15 sur le taux de chargement en Q-IP-DHA

Le Kolliphor® HS 15 peut être utilisé jusqu'à 50% dans certaines préparations pharmaceutiques : diclofénac, vitamine K1 [20]. Pour notre étude chez l'animal, il faudra limiter la quantité de Kolliphor® HS 15 pour éviter des effets secondaires (dose létale chez 50% des souris (DL50) est $> 3,16\text{g/kg}$). L'objectif est de charger la Q-IP-DHA dans les micelles à une concentration de 6mg/mL pour nous permettre d'injecter des doses de 30mg/kg par voie IV chez la souris, dose à laquelle l'IP-DHA complexé avec la BSA a permis d'obtenir une protection optimale des photorécepteurs. Nous avons donc étudié différents ratios de Kolliphor® HS 15 /solution saline à 0,9% afin de définir la quantité de Kolliphor® HS 15 optimale pour solubiliser la Q-IP-DHA à 6mg/mL (**tableau 23**).

Tableau 23 : Etude de la solubilisation de Q-IP-DHA à 6mg/mL dans différents ratios Kolliphor® HS 15/solution saline 0,9% (n = 3)

Excipients	Ratio	Précipitation de la Q-IP-DHA
Kolliphor® HS 15/ Solution saline à 0.9%	50/50	Pas de précipitation
	40/60	Pas de précipitation
	30/70	Pas de précipitation
	20/80	Pas de précipitation

Au cours des expériences, nous n'avons pas observé de précipitation de la Q-IP-DHA aux différents ratio de Kolliphor® HS 15/solution saline 0.9 % allant de 50/50 à 20/80 (v/v). Nous avons donc choisi de continuer le développement avec un ratio Kolliphor® HS 15/solution saline 0,9% de 20/80 avec une concentration de Q-IP-DHA de 6mg/mL ce qui correspond à un taux de chargement en Q-IP-DHA de 3,11%. Cette composition permet de limiter au maximum la quantité de Kolliphor® HS 15 utilisée afin de réduire les risques d'irritation et d'effets secondaires.

1.3.3 Taille et potentiel zêta des micelles vides (M-V) et des M-Q-IP-DHA

La caractérisation de la formulation des micelles vides (M-V) et chargées en Q-IP-DHA (M-Q-IP-DHA) a permis de déterminer leur distribution de taille et leur potentiel zêta (**tableau 24**). Le chargement en Q-IP-DHA dans les micelles n'a pas conduit à une augmentation de la taille moyenne : $15,9 \pm 2,6\text{nm}$ par rapport au M-V : $15,8 \pm 2,9\text{nm}$. L'indice de polydispersité (PDI) varie peu passant de 0,1 pour les M-V à 0,2 pour les M-Q-IP-DHA. Compte tenu de la faible solubilité de la Q-IP-DHA dans l'eau, l'absence de précipité confirme le chargement de la Q-IP-DHA dans les micelles.

Tableau 24 : Taille, PDI et potentiel zêta des M-V et des M-Q-IP-DHA à 6mg/mL (n = 3).

	M-V	M-Q-IP-DHA
Taille des micelles (diluées à 1:18 dans le PBS)	$15,8 \pm 2,9\text{nm}$	$15,9 \pm 2,6\text{nm}$
PDI	$0,1 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,1$
Potentiel zêta (non dilué)	$-1,4 \pm 0,4\text{mV}$	$0,1 \pm 0,0\text{mV}$

La mesure de potentiel zêta rend compte de la charge électrique à la surface des formulations en solution. Les M-V et les M-Q-IP-DHA présentent un potentiel zêta presque neutre de $-1,4 \pm 0,4\text{mV}$ et $0,1 \pm 0,0\text{mV}$. Il est admis qu'une valeur de potentiel zêta supérieure ou inférieure à 30mV évite l'agrégation des micelles entre elles et maintient une bonne stabilité due aux forces de répulsion électrostatique [21]. Cependant, l'administration IV de micelles ayant une charge de surface neutre évite l'agrégation de ces micelles avec les protéines sériques qui sont chargées négativement [22] et empêche également une élimination rapide dans le sang par les phagocytes [23]. La formulation de Kolliphor® HS 15/solution saline 0,9% avec un ratio de 20/80 nous permet donc de formuler la Q-IP-DHA à 6mg/mL , stable à la dilution dans du PBS pH 7,4.

1.3.4 Test de précipitation en milieu physiologique et % d'encapsulation

La dilution de la formulation dans un grand volume aqueux tel que le sang pourrait entraîner la précipitation de la Q-IP-DHA [24]. Pour s'en assurer, nous avons effectué un test de précipitation *in vitro*. Le volume de formulation normalement injecté chez la souris ($\approx 100\mu\text{L}$) a été dilué dans $1,8\text{mL}$ de PBS pH 7,4 (volume de sang moyen d'une souris de 25g) sous une agitation douce. La Q-IP-DHA a été ensuite dosée à $345 \pm 26\mu\text{g/mL}$. Dans un second temps, ce même échantillon a été centrifugé et la Q-IP-DHA dosée dans le surnageant à $320 \pm 24\mu\text{g/mL}$. La perte estimée à $4,5\%$ de Q-IP-DHA lors de la dilution pourrait donc potentiellement reprécipiter lors de l'injection *in vivo*. Le pourcentage en Q-IP-DHA restant solubilisé dans les micelles est donc de $95,5 \pm 0,8\%$.

1.3.5 Adaptation de la formulation à l'IP-DHA

Lors des études précédentes pour évaluer l'efficacité de l'IP-DHA par voie IV, l'IP-DHA a été administrée par complexation avec le BSA. La BSA possédant des sites de fixation aux acides gras polyinsaturés [25] devrait donc former des complexes avec l'IP-DHA en se fixant sur les sites de liaisons du DHA. Malgré la preuve de concept obtenue avec le complexe BSA-IP-DHA par voie IV, nous avons voulu déterminer si notre nouvelle formulation micellaire pouvait permettre d'optimiser l'activité de l'IP-DHA en comparant l'efficacité de l'IP-DHA complexé avec la BSA vs l'IP-DHA en solution micellaire. Pour cela nous avons chargé l'IP-DHA à 6mg/mL

dans une solution micellaire et nous l'avons caractérisée en termes de taille, taux de chargement et pourcentage d'encapsulation comme pour la Q-IP-DHA (**tableau 25**).

Tableau 25 : Taille, PDI, taux de chargement et pourcentage d'encapsulation des M-IP-DHA à 6mg/mL ($n = 3$).

	M-IP-DHA
Taille des micelles (diluées à 1:18 dans le PBS)	18,4 ± 4,6nm
PDI	0,3 ± 0,2
Taux de chargement	3,11%
% d'encapsulation	99,5 ± 1,1%

La distribution de taille des micelles chargées est de 18,4 ± 4,6nm avec un PDI de 0,3 traduisant l'homogénéité de taille des micelles formées. Le taux de chargement est identique à celui de la Q-IP-DHA car la quantité d'actif et d'excipients utilisé est identique, cependant le pourcentage d'encapsulation en IP-DHA de 99,5 ± 1,1% est légèrement supérieur à celui obtenu avec la Q-IP-DHA (95,5%). Le chargement en IP-DHA dans cette solution micellaire à hauteur de 6mg/mL permet donc de solubiliser l'IP-DHA en milieux aqueux.

1.4 Conclusion

La formulation IV développée à base de Kolliphor® HS 15 et d'une solution saline à 0,9% nous a permis de former des micelles chargées en Q-IP-DHA à hauteur de 3,11% avec un pourcentage d'encapsulation de 95,5 ± 0,8 %. Ces micelles présentent une distribution de taille de 15,9 ± 2,6nm avec une charge de surface quasiment neutre de 0,1 ± 0,0mV. Ces micelles sont stables à la dilution ce qui permet de limiter la re-précipitation de la Q-IP-DHA dans le sang lors de l'injection dans le sang à 4,5% environ de la dose administrée. Cette formulation a pu être adaptée à l'IP-DHA avec succès garantissant un taux de chargement identique et un pourcentage d'encapsulation élevé de 99,5 ± 1,1%. Ces formulations pourront donc être utilisées pour évaluer l'efficacité de ces molécules par voie IV.

II. Développement et caractérisation de la formulation orale pour l'IP-DHA et la Q-IP-DHA

2.1 Introduction

Les expériences *in vitro* réalisées en amont sur des cellules rétinienne ont démontré un effet protecteur de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA sur la survie cellulaire après induction d'un stress oxydant et carbonylé [1]. Il a ainsi été mis en évidence l'importance des parties alkyle et oméga-3 sur l'efficacité de cette protection cellulaire. Ces études ont également prouvé l'efficacité de l'IP-DHA après administration par voie IV sur le modèle de souris ABCA4KO (-/-) avec une protection des photorécepteurs entre 80 et 85 % [26] qui n'a pas affecté le cycle visuel des rétinoïdes (chapitre 2, partie 2) et l'efficacité de la Q-IP-DHA par voie IV sur le même modèle à hauteur de 76% (chapitre 6, partie 1). La prochaine étape dans l'étude de ces dérivés lipophénoliques est donc de trouver des formulations adaptées pour la voie orale, de les évaluer en termes de stabilité, de taux de chargement et de taille puis dans un second temps (chapitre 6) d'évaluer leur efficacité *in vivo* après avoir induit une dégénérescence rétinienne par un stress lumineux aigu et chronique sur des modèles de souris ABCA4KO et BALB/c pouvant subir une dégénérescence maculaire.

Comme nous l'avons démontré, la Q-IP-DHA et l'IP-DHA étant des molécules de BCS classe IV, elles ne présentent pas des propriétés favorables en termes de biodisponibilité après une administration par voie orale [27,28]. Les principaux inconvénients de ces molécules sont leur faible solubilité aqueuse, et leur faibles perméabilité [29] qui conduisent à une faible absorption induisant une biodisponibilité variable intra et inter-individuelle [30]. De nos jours, de plus en plus de SA en cours de développement avec un fort potentiel thérapeutique sont des BCS classe IV : le développement de formulations efficaces pour pouvoir les administrer par voie orale est un véritable challenge. Les composés de BCS class IV administrés par voie orale représentent environ 5% de la totalité des formes sur le marché [31].

Le choix et la composition des formulations développées est donc important pour garantir l'efficacité de ces nouveaux traitements. Des formulations de type LBBDS (chapitre 3, partie

3.3) peuvent permettre d'améliorer la biodisponibilité et de diminuer la variabilité inter-individuelle de ces composés [32]. Parmi les LBBDS étudiées, nous avons sélectionné pour l'IP-DHA, des formulations de type auto-nanoémulsifiant (SNEDDS) [33] qui peuvent augmenter le transport lymphatique de molécules lipophiles, ce qui est un avantage pour les molécules sujettes à l'effet de premier passage hépatique comme l'IP-DHA. Les SNEDDS sont des mélanges de lipides et de surfactants, qui dilués en milieu aqueux et sous légère agitation, vont spontanément former des nanoémulsions (NE) huile dans l'eau (o/w) avec des tailles inférieures à 200nm [34,35]. Les principaux avantages des SNEDDS par rapport aux autres LBBDS présentés dans le chapitre 3, partie 3.3, telles que les nanoparticules lipidiques solides (SLN), les nanoparticules lipidiques nanostructurées (SLN) et les liposomes sont leur grande stabilité physique lors du stockage et leur stabilité cinétique après dispersion dans une phase aqueuse ainsi que la faible quantité d'énergie requise pour leur préparation [36–39]. De plus, les SNEDDS ont récemment prouvé leur efficacité dans la prévention des maladies oculaires avec des formulations de composés antioxydants tels que la lutéine [40,41] qui présente de nombreuses similitudes physico-chimiques avec l'IP-DHA.

Pour la Q-IP-DHA, notre choix s'est porté sur les nanocapsules lipidiques (LNC) [42]. En effet, la Q-IP-DHA, étant faiblement métabolisée par le foie, il est intéressant de choisir une formulation LNC qui possède un mécanisme d'absorption spécifique de type transcellulaire qui permet d'augmenter la biodisponibilité de nombreux SA [44] permettant de rejoindre rapidement la veine porte. De plus, Les LNC sont des formulations biocompatibles qui permettent des taux de chargement en SA élevés et qui peuvent inhiber les transporteurs d'efflux. Les LNC développées par *Heurtault et al.* [43] suivant la méthode d'inversion de phase, par un processus peu énergivore, sans ajout de solvants organiques, permettent de former des vésicules monodisperses de taille nanométrique (20 – 100nm). Ce procédé se base sur le changement de propriétés des surfactants non ioniques qui passent d'un état hydrophile à basse température (émulsion huile/eau) à lipophile à haute température (émulsion eau/huile) à partir de la température de transition de phase liée à la déshydratation des chaînes de polyoxyéthylène par la rupture des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau [44]. Des molécules de BCS classe IV de type docétaxel ou paclitaxel (anticancéreux) ont déjà été formulées avec les LNC [44] avec des résultats prometteurs ; les LNC de paclitaxel

administrées par voie orale, ont permis d'améliorer la biodisponibilité de la molécule par 3 chez le rat [45].

Dans ce contexte, cette étude vise à développer et à caractériser des LNC et des SNEDDS contenant de la Q-IP-DHA (LNC-Q-IP-DHA) et de l'IP-DHA (SNEDDS-IP-DHA) pour une administration orale afin d'améliorer la solubilité et la biodisponibilité de ces molécules et *in fine* d'améliorer la compliance des patients [46] pour le traitement de la DMLA atrophique et de la maladie de Stargardt.

Pour le développement des SNEDDS-IP-DHA, un diagramme de phase a été utilisé pour sélectionner le ratio de chaque excipient afin d'obtenir des SNEDDS-IP-DHA permettant l'obtention des NE stables et homogènes. Les SNEDDS ont ensuite été caractérisés en termes de taille, potentiel zêta, robustesse à la dilution, stabilité en milieu gastrique et intestinal. Pour le développement des LNC-Q-IP-DHA, nous avons fait varier les pourcentages des différents excipients qui composent les LNC pour optimiser le taux de chargement en Q-IP-DHA. Nous avons ensuite déterminé le pourcentage d'encapsulation en Q-IP-DHA et caractérisé la taille et le potentiel zêta des LNC chargées en Q-IP-DHA.

Les deux formulations doivent présenter un taux de chargement en Q-IP-DHA ou IP-DHA suffisamment élevé pour permettre la réalisation de tests d'efficacité *in vivo* à des doses élevées. En effet, des études précédentes ont démontré l'efficacité maximale de l'IP-DHA associée à la BSA à 30 mg/kg chez la souris par voie IV [26]. Sur la base de ces résultats, nous avons cherché à formuler les SA dans des SNEDDS et LNC pour expérimenter l'administration orale en utilisant des doses plus élevées d'IP-DHA et de Q-IP-DHA (environ 100mg/kg) et réaliser des études doses/réponses par voie orale chez les animaux.

2.2 Matériel & Méthodes

2.2.1 Matériel

La Q-IP-DHA et l'IP-DHA ont été synthétisés comme décrit précédemment [1]. L'acétonitrile, le méthanol (MeOH) et le chlorure de sodium (NaCl) ont été achetés chez Honeywell (USA). HCL 37% chez Fischer Scientific (USA). Eau Milli-Q ultra-pure a été produit à partir de Milli-Q gradient A10 (Millipore, Allemagne). Le Kolliphor® HS 15 a été acheté chez BASF (Ludwischafen, Allemagne). Le Labrafac® lipophile WL 1349 constitué de triglycérides (TG à chaîne moyenne d'acides carpylique (C8) et caprique (C10) provient de chez Gattefossé (Saint-Priest, France). Le Lipoid® S75 composé de phospholipides avec 70% de phosphatidylcholine lécithine de soja a été gracieusement fourni par Lipoid (Ludwigshafen, Allemagne). Le Phosal® 53 MCT a été acheté auprès de Lipoid (Allemagne). Le Labrasol® et Transcutol HP® ont été gracieusement fournis par Gattefossé (France). La pepsine issue de la muqueuse gastrique porcine, la pancréatine issue du pancréas porcin (4x les spécifications USP), l'extrait de bile porcine, le NaOH et le PBS pH 7,4 ont été achetés chez Sigma (USA). HCL 37 % provient de Fischer Scientific (USA).

2.2.2 SNEDDS-IP-DHA

2.2.2.1 Solubilité de l'IP-DHA dans différents excipients

La solubilité de l'IP-DHA a été évaluée dans différentes huiles et surfactants pour déterminer la composition des SNEDDS. L'IP-DHA a été ajouté en excès (> 40mg/mL) dans un volume d'excipient déterminé sous légère agitation pendant 24h à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (10 000rpm, 15min) et le surnageant a été prélevé et dilué dans le méthanol avant d'être quantifié (section 2.2.2.6).

2.2.2.2 Diagramme ternaire : plan expérimental et formulation des SNEDDS

A partir du diagramme ternaire, différents ratios des excipients sélectionnés dans l'étude de solubilité ont été étudiés. Le Phosal® 53 MCT est utilisé comme base huileuse, le Labrasol® comme tensioactif et le Transcutol HP® comme co-tensioactif (% m/m). Le pourcentage massique de la phase huileuse varie de 5 à 35 (% m/m), le tensioactif de 50 à 85 (% m/m) et le co-tensioactif de 5 à 20 (% m/m). Les NE sont obtenues après dilution à un ratio de 1:1000

(v/v) du mélange lipidique composé (Phosal® 53 MCT, Labrasol® et Transcutol HP®) dans de l'eau MiliQ suivi d'un mélange (Vortex Génie 2) jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène.

2.2.2.3 Préparation et caractérisation des SNEDDS-IP-DHA

Des gammes de concentration d'IP-DHA (10 à 40 mg/mL) sont solubilisées dans le Phosal® 53 MCT puis le Labrasol® et le Transcutol HP® sont ajoutés dans un ratio de 25/60/15 (% m/m) selon les résultats obtenus dans la section 2.2.2.2. Le mélange est agité au vortex (Vortex Génie 2) jusqu'à l'obtention d'une phase liquide homogène. La solubilité de l'IP-DHA dans chaque formulation de SNEDDS a été déterminée par analyse HPLC/UV (section 3.2.7). Les SNEDDS ont été dilués dans de l'eau (1:1000 v/v) sous agitation douce pour obtenir des NE qui seront évaluées en termes de taille. Les formulations SNEDDS permettant la solubilisation d'IP-DHA la plus élevée ont été sélectionnées pour des études de stabilité. Les SNEDDS ont été dilués dans de l'eau (1:1000 v/v) sous agitation douce pour obtenir des NE.

2.2.2.4 Détermination de la distribution de taille et du potentiel zêta des NE

La distribution de taille et le potentiel zêta des formulations obtenues après dilution au 1:1000 (v/v) dans l'eau MiliQ à partir des SNEDDS vides et des SNEDDS-IP-DHA ont été déterminés par diffusion de la lumière (chapitre 5, partie 1.2.6).

2.2.2.5 Étude morphologique des NE

L'analyse morphologique a été réalisée par Cryo-TEM. 3µL de NE obtenues après dilution des SNEDDS-IP-DHA à 30mg/mL dans de l'eau ou dans du PBS pH 7,4 ont été déposés sur des grilles Lacey à décharge lumineuse (Delta Microscopies), puis congelés dans de l'éthane liquide à l'aide d'une cryo-plongeuse CP3 (AMETEK SAS - Division GATAN). Avant la congélation, le taux d'humidité a été stabilisé à environ 95%. L'observation cryo-TEM a été réalisée sur un microscope JEOL 2200FS FEG (JEOL Europe SAS) fonctionnant à 200 kV dans des conditions de faible dose (dose totale de 20 électrons/Å²) en mode zéro perte d'énergie avec une largeur de fente de 20eV. Les images ont été prises à un grossissement nominal de 50 000x correspondant à un grossissement calibré de 45 591 x avec une défocalisation allant de 1,5 à 2µm avec une caméra CCD 4kx4k à balayage lent (AMETEK SAS -Division GATAN).

2.2.2.6 Taux de chargement et pourcentage d'IP-DHA dans les NE

La quantification de l'IP-DHA dans les NE a été effectuée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sur l'appareil modèle LC6-2012HT (Shimadzu, Kyoto, Japon) avec une colonne Prontosil C8 (120-5-C8 SH, 5 μm , 250 x 4,0 mm) couplée à un détecteur UV-visible (Shimadzu, Kyoto, Japon). Le débit a été réglé à 1mL/min et la détection de l'IP-DHA mesurée à 206nm. La phase mobile était un mélange d'eau et d'acétonitrile utilisé en mode isocratique avec un rapport acétonitrile/eau de 90/10. La ligne de la courbe d'étalonnage était linéaire de 1 à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0,9996$. Les équations pour le calcul du taux de chargement et du pourcentage d'IP-DHA dans les NE se fait de la même façon que dans le chapitre 5, partie 1.2.6.

2.2.2.7 Robustesse à la dilution

Les SNEDDS et SNEDDS-IP-DHA à 30 mg/mL ont été dilués dans de l'eau MiliQ à 1:1000, 1:750, 1:500, 1:250, 1:100 et 1:10 (v/v). Les échantillons ont été analysés par DLS après agitation magnétique (150 rpm) pendant 5 minutes.

2.2.2.8 Influence de la formulation SNEDDS sur la stabilité de l'IP-DHA dans les fluides simulés gastrique (SGF) et intestinal (ISF)

La stabilité chimique en milieu gastrique et intestinal de l'IP-DHA et de l'IP-DHA chargé dans la formulation SNEDDS à 30 mg/mL a été évaluée dans en milieu gastrique et intestinal (**tableau 18**). 150 μL d'IP-DHA (solubilisé dans MeOH) ou de SNEDDS-IP-DHA chargé à 30mg/mL ont été placés dans 20mL de SGF ou ISF (fraîchement préparés) sous agitation magnétique à 150rpm dans un bain-marie à 37°C. Des échantillons de 500 μL ont été prélevés à 0, 30, 60 et 90min pour l'analyse de stabilité dans le SGF ou à 0, 20, 40, 60, 80, 100 et 120min pour l'analyse de stabilité dans l'ISF. Les échantillons sont dilués avec 500 μL de MeOH pour arrêter la réaction de dégradation enzymatique puis centrifugés (centrifugeuse Sigma 2K15) pendant 10min à 15 000rpm. L'IP-DHA a été quantifié dans le surnageant (section 2.2.2.6).

2.2.3 LNC-Q-IP-DHA

2.2.3.1 Préparation des LNC-Q-IP-DHA

Les LNC ont été obtenues en mélangeant simultanément Q-IP-DHA, Labrafac®, Lipoid® S75, l'eau Milli-Q, NaCl et Kolliphor® HS 15. Trois cycles de chauffage et de refroidissement (85 - 55°C) du mélange ont été effectués sous agitation magnétique puis 4mL d'eau Milli-Q à 4°C sont ajoutés pour figer le système (**figure 42**). Les LNC chargés en Q-IP-DHA (LNC-Q-IP-DHA) sont laissées à température ambiante sous agitation magnétique (300 tours/min) pendant 30min. Les LNC vides (LNC-V) ont été préparées par la même méthode, sans ajout de la Q-IP-DHA.

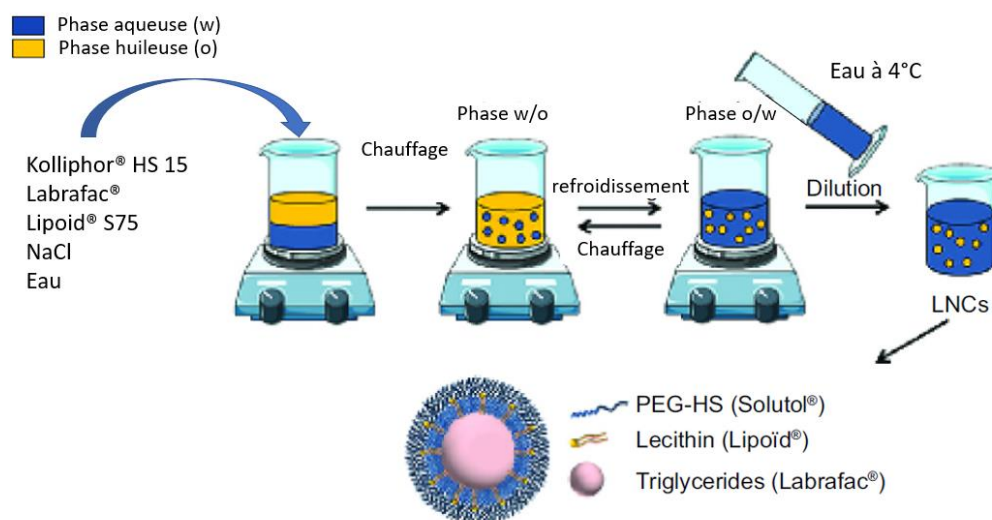


Figure 42 : Protocole de fabrication des LNC-V par inversion de phase inverse [47]

2.2.3.2 Optimisation de la composition des LNC

La composition a été optimisée sur la base du diagramme de phase ternaire développé par *Heurtault et al.* (Kolliphor® HS 15, huile Labrafac®, eau) pour lequel les concentrations de Lipoid® S75 et de NaCl ont été fixées à 1,5% et 3% (m/m) respectivement. Différents ratios correspondant de 60 à 30% de Kolliphor® HS 15, 10% de Labrafac® et 60 à 40% d'eau (m/m) ont été étudiés pour réduire la quantité d'eau utilisée et ainsi améliorer le taux de chargement de Q-IP-DHA dans les LNC. La distribution de taille des LNC a été analysée par DLS (section 2.2.3.4).

2.2.3.3 Taux de chargement et pourcentage d'encapsulation

Des quantités croissantes de Q-IP-DHA (20 à 50mg) ont été chargées dans les LNC afin de déterminer la quantité maximale de Q-IP-DHA pouvant être formulée dans les LNC sans les déstabiliser. Le taux de chargement et le pourcentage d'encapsulation en Q-IP-DHA dans les LNC ont été déterminés par HPLC-UV (chapitre 5, partie 1.2.5).

2.2.3.4 Détermination de la taille et du potentiel zêta de LNC-V et LNC-Q-IP-DHA

La taille des gouttelettes et le potentiel zêta des LNC-V et LNC-Q-IP-DHA ont été déterminés comme décrit dans le chapitre 5, partie 1.2.6 sur les formulations non diluées.

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 SNEDDS-IP-DHA

2.3.1.1 Choix des SNEDDS et de leur composition

Les PA peu solubles dans l'eau comme l'IP-DHA doivent être formulés pour améliorer leur solubilité et leur perméabilité afin d'augmenter leur biodisponibilité par voie orale et donc l'efficacité thérapeutique. L'étude bibliographique met en avant les formulations LBDDS dans l'amélioration de la pharmacocinétique (PK) des BCS classe IV. Parmi les différents LBDDS, nous avons choisi les SNEDDS car différentes études ont montré une amélioration de la biodisponibilité orale par augmentation de la solubilité mais aussi par réduction de l'effet de premier passage hépatique grâce au passage des SA par la voie lymphatique [48–50] avec des excipients appropriés [51]. Les SNEDDS sont des mélanges isotropes composés d'huile, de tensioactif et de co-tensioactif qui, une fois administrés par voie orale formeront une NE huile dans eau au contact de milieux aqueux tels que le liquide gastrique ou intestinal (**figure 43**) [52]. La phase huileuse améliore la solubilité de l'IP-DHA, les tensioactifs lipophiles et hydrophiles réduisent la distribution de taille des gouttelettes de NE en diminuant la tension de surface avec le liquide gastro-intestinal [53].

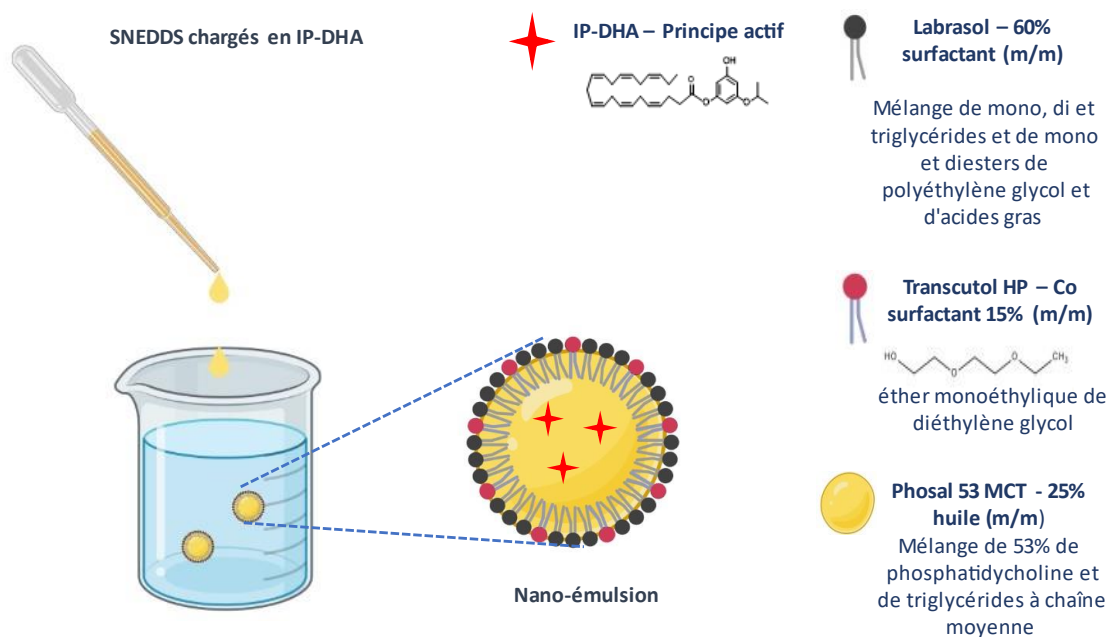


Figure 43 : Composition et formation des NE à partir des SNEDDS-IP-DHA

Parmi les excipients de SNEDDS sélectionnés pour améliorer la biodisponibilité de l'IP-DHA, nous avons choisi pour la phase huileuse : le Phosal® 53 MCT. Cet excipient est composé de phosphatidylcholine (53 %) et de triglycérides à chaîne moyenne (MCT), la solubilité de l'IP-DHA dans cette huile s'est avérée être de $25,47 \pm 3,27$ mg/mL. De plus, le Phosal® 53 MCT est connu pour être absorbé directement par les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal et pour améliorer la pénétration des SA et la perméabilité des membranes. Notre hypothèse de mécanisme repose également sur la présence de lipides dans le duodénum qui va conduire à la sécrétion de cholestérol et de sels biliaires qui induisent la formation de micelles colloïdales capables de solubiliser des composés lipophiles comme l'IP-DHA [54]. Ensuite, la digestion des lipides stimule la production de chylomicrons. Un composé lipidique tel que l'IP-DHA associé au noyau triglycéride des chylomicrons pourrait donc être excrété dans la lymphe par exocytose [55]. Il a ainsi été démontré que les composés ayant un log P élevé (> 5) pouvaient passer préférentiellement dans la voie lymphatique en étant piégés dans les chylomicrons [56]. Le Labrasol® ayant permis de solubiliser l'IP-DHA à $46,00 \pm 2,15$ mg/ml a été choisi comme tensioactif non ionique. Il est composé d'une petite fraction de mono-, di- et triglycérides et principalement de mono- et diesters PEG-8 des acides caprylique (C8) et caprique (C10), avec une valeur HLB élevée (12). L'utilisation de tensioactifs non ioniques a

été préférée pour la voie orale car ils sont moins toxiques et irritants que les tensioactifs ioniques. Le Labrasol® permet de réduire la tension superficielle des gouttelettes d'huile formées à l'interface huile/eau de la NE et est également connu pour augmenter la fluidité de la membrane [57] et le transport paracellulaire [58]. Enfin, le Transcutol HP® (éther monoéthylique de diéthylène glycol) (valeur HLB ≈4) utilisé comme co-surfactant amphiphile pour stabiliser les gouttelettes de NE augmente la solubilité de l'IP-DHA à $45,02 \pm 2,16$ mg/mL et devrait augmenter également la fluidité membranaire [59]. Le Transcutol HP® pourrait également inhiber la pompe d'efflux P-gP [60]. Tous ces mécanismes devraient induire une augmentation de la biodisponibilité de l'IP-DHA.

2.3.1.2 Effet de la composition des SNEDDS sur la taille des NE

La taille des NE formées est un facteur important pour améliorer la dissolution de la SA dans le TGI [61]. En effet, plus la taille des NE est petite, plus la surface d'échange pour l'IP-DHA sera grande, favorisant ainsi une meilleure absorption de la SA [62]. Pour ce faire, une étude avec un diagramme de phase ternaire (**figure 44**) a été réalisée afin de déterminer le ratio huile/surfactant/co-surfactant optimal par mesure de la distribution de taille (mesure DLS) (**tableau 26**).

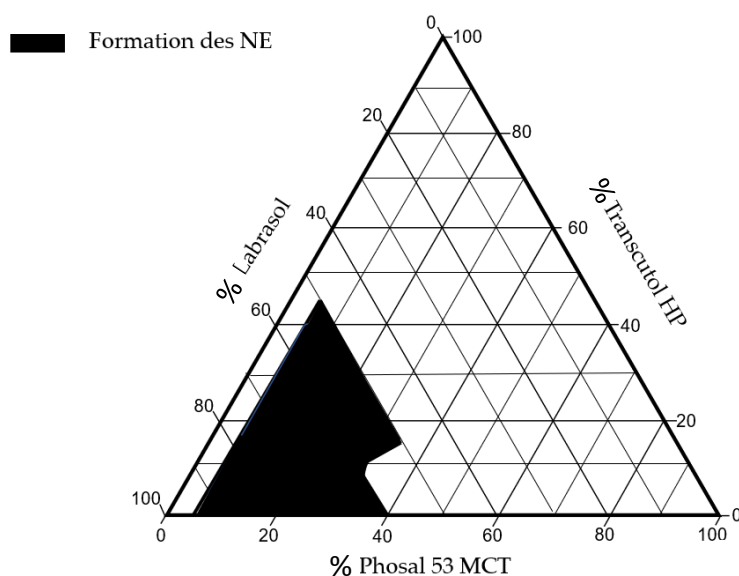


Figure 44 : Diagramme de phase

Tableau 26 : Influence du ratio d'excipients sur la distribution de taille de NE (SNEDDS dilué dans l'eau à 1:1000, n=3)

Ratio (% m/m/m) Phosal® 53 MCT, Labrasol®, Transcutol HP®	Taille des NE (nm)	PDI
5/50/45	78,4 ± 9,9	0,2 ± 0,1
5/85/10	79,3 ± 2,8	0,1 ± 0,1
10/85/5	96,8 ± 16,0	0,2 ± 0,1
20/65/15	57,6 ± 4,1	0,1 ± 0,0
20/60/20	69,2 ± 4,4	0,2 ± 0,1
25/60/15	53,5 ± 4,5	0,1 ± 0,0
30/60/10	57,2 ± 7,1	0,1 ± 0,0
35/60/15	NA	NA

Le rapport phase huileuse/surfactant/co-surfactant de 25/60/15 (m/m/m) a été retenu comme formulation optimisée des SNEDDS pour cette étude car il permet de formuler des NE de 53,53nm.

2.3.1.3 Détermination de la charge maximale de l'IP-DHA dans les SNEDDS

Devant formuler des SNEDDS chargées à 30mg/mL pour pouvoir obtenir des doses d'environ 100mg/kg chez la souris après administration orale, différentes concentrations d'IP-DHA ont été chargées (10, 20, 30 et 40mg/mL) dans la formulation SNEDDS, avec le ratio précédemment choisi (25/60/15). La taille des gouttelettes de NE a été évaluée par mesure DLS après dilution dans l'eau des SNEDDS-IP-DHA (**figure 45**). Les résultats ont montré une distribution similaire de la taille des gouttelettes : 57,2 ± 4,7nm, 59,5 ± 1,6nm et 62,4 ± 3,4nm respectivement pour les SNEDDS à 10, 20 et 30mg/mL. Au-delà de cette concentration (40mg/mL), les NE obtenues présentaient une distribution de tailles hétérogènes (PDI > 0,3).

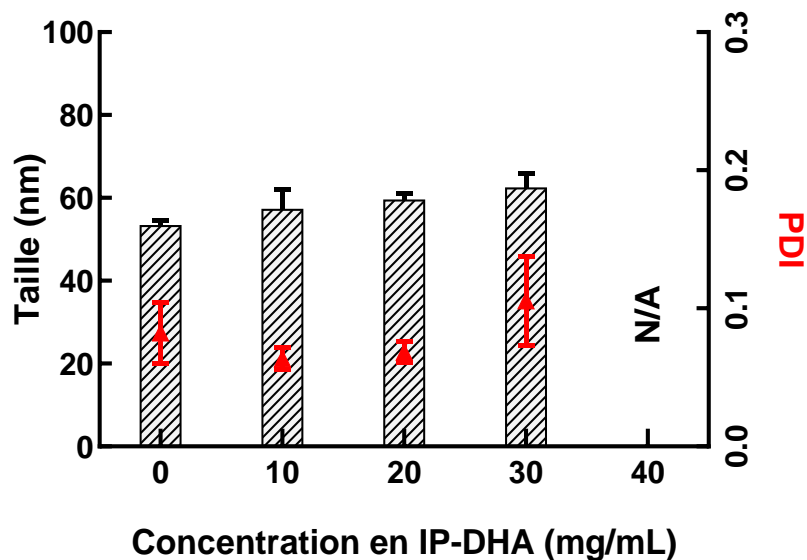


Figure 45 : Influence du taux de chargement d'IP-DHA sur la distribution de taille de NE après dilution de SNEDDS-IP-DHA dans de l'eau MilliQ (dilution 1:1000) (n=3)

Par conséquent, la formulation SNEDDS-IP-DHA (25/60/15) à 30mg/mL a été choisie pour poursuivre les expériences.

2.3.1.4 Taux de chargement et pourcentage d'IP-DHA dans les NE

Le taux de chargement en SA et le pourcentage d'IP-DHA dans les NE ont été déterminés à partir de l'équation décrite dans la section 2.1.3.6. Le pourcentage d'IP-DHA dans les NE était proche de 100 % ($99,1 \pm 0,9\%$), le taux de chargement en IP-DHA correspond à $2,9 \pm 0,1\%$ par rapport à la masse total des excipients lipidiques de la formulation SNEDDS. Ces valeurs ont confirmé le chargement en IP-DHA dans les NE. La concentration de la SA était conforme à la concentration souhaitée d'IP-DHA dans le SNEDDS (30mg/mL) pour l'évaluation de l'efficacité préclinique.

2.3.1.5 Caractérisation des NE

2.3.1.5.1 Taille, potentiel zêta et étude morphologique des NE

L'ajout de l'IP-DHA a conduit à une augmentation de la distribution de la taille des gouttelettes de $53,5 \pm 4,5$ à $62,4 \pm 3,4$ nm avec une valeur PDI à 0,1 (distribution de taille homogène) (**tableau 27**).

Tableau 27 : Taille, PDI et potentiel zêta de NE vides ou NE-IP-DHA dans l'eau après dilution de SNEDDS et SNEDDS-IP-DHA à 30mg/mL (n = 3).

	NE vides	NE-IP-DHA
Taille des gouttelettes (nm)	53.5 ± 4.5nm	62.4 ± 3.4nm
PDI	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Potentiel zêta	-8.0 ± 1.8mV	-22.0 ± 3.3mV

Les NE vides et les NE-IP-DHA présentent un potentiel zêta respectivement de $-8,0 \pm 1,7$ et de $-22,0 \pm 3,3$ mV. Les formulations SNEDDS avec le ratio phase huileuse/surfactant/co-surfactant de 25/60/15 ont permis de former des NE chargées en IP-DHA induisant une répulsion électrostatique entre les gouttelettes qui limite la coalescence [63]. Nous avons supposé que la charge négative des NE est due à l'ionisation des acides gras libres du Labrasol® [64] et l'augmentation de la charge négative avec les NE-IP-DHA serait probablement due à l'ionisation du groupement OH de la fonction phénolique de l'IP-DHA [65]. Cette augmentation du potentiel zêta semble aussi indiquer la localisation de l'IP-DHA à l'interface huile/eau, suggérant que l'IP-DHA n'est pas entièrement encapsulée dans les NE mais adsorbée à l'interface ou à la surface. Le seuil de ± 30 mV n'est pas atteint, mais aucune précipitation n'a été observée pendant les expériences *in vitro* et la taille des gouttelettes et le PDI sont restés stables en milieu aqueux sur plusieurs heures.

Ensuite, la morphologie des NE a été déterminée par imagerie Cryo-TEM (**figure 46**). Les résultats ont confirmé la forme sphérique, la morphologie vésiculaire et la structure unilamellaire des NE obtenues après dilution des SNEDDS dans de l'eau MilliQ ou du PBS pH 7,4. Les NE observées après dilution dans l'eau MilliQ (**figure 46A**) et dans le PBS pH 7,4 (**figure 46B**) sont similaires en termes de taille ; la force ionique du PBS n'ayant pas eu d'impact significatif sur la taille des NE. La méthode de préparation des échantillons pour CryoTEM (déshydratation) devrait expliquer la variation de la distribution de taille par rapport aux valeurs obtenues de l'analyse DLS.

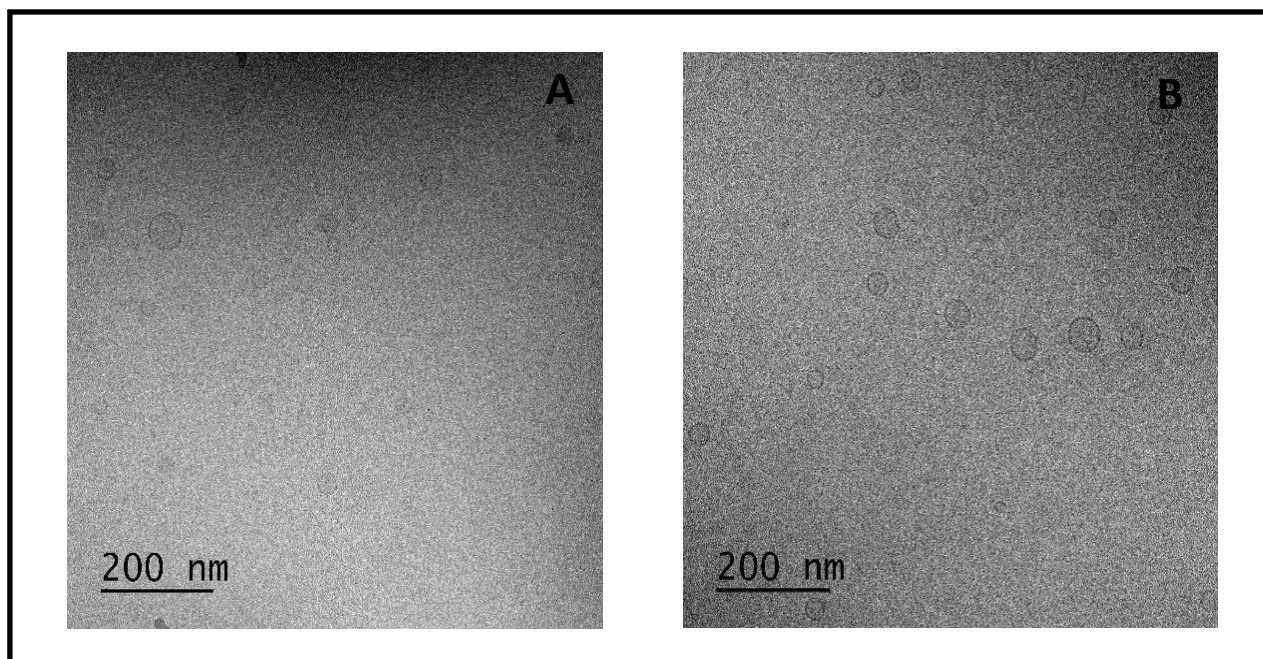


Figure 46 : Images Cryo-Tem de NE obtenues à partir des SNEDDS-IP-DHA à 30mg/mL dilué au 1:100 dans de l'eau milliQ (A) ou du PBS pH7,4 (B) (50 000 x).

2.3.1.5.2 Robustesse des NE à la dilution

Pour finaliser la caractérisation des SNEDDS, nous avons réalisé une étude de stabilité, d'abord à la dilution dans l'eau en mesurant la taille des NE et dans un second temps, en présence de fluides gastriques et intestinaux. En effet, le volume des fluides dans le tractus gastro-intestinal varie en fonction des individus et aussi au cours de la journée [66] avec une forte augmentation après un repas (avec la sécrétion d'enzymes digestives). Ainsi, il est particulièrement important de déterminer la capacité des SNEDDS à former des NE homogènes quel que soit le volume du milieu aqueux. Pour ce faire, nous avons dilué les SNEDDS dans l'eau par un facteur allant de 100 à 1000 (**figure 47**) et évalué la distribution de la taille des gouttelettes des NE. Entre 1:1000 et 1:500, la variation de la taille des gouttelettes est faible, avec des tailles de allant de $62,4 \pm 3,4$ nm à la dilution au 1000^{ème} à $77,0 \pm 8,8$ nm à la dilution au 500^{ème} avec les SNEDDS-IP-DHA. À une dilution plus faible, nous avons observé une augmentation de la taille des gouttelettes avec une taille respectivement de $102,2 \pm 7,2$ nm et $130,6 \pm 32,8$ nm à une dilution au 250^{ème} et au 100^{ème} (**figure 47, barre vide**). Les SNEDDS-IP-DHA (**figure 47, barre grisée**) ont formé des NE légèrement plus grosses que celles

obtenues avec les SNEDDS vides en raison du chargement en IP-DHA. La taille des gouttelettes de NE issues des SNEDDS a augmenté avec la diminution du volume de dilution de la même manière que pour SNEDDS-IP-DHA. Aucune précipitation ou séparation de phase n'a été observée.

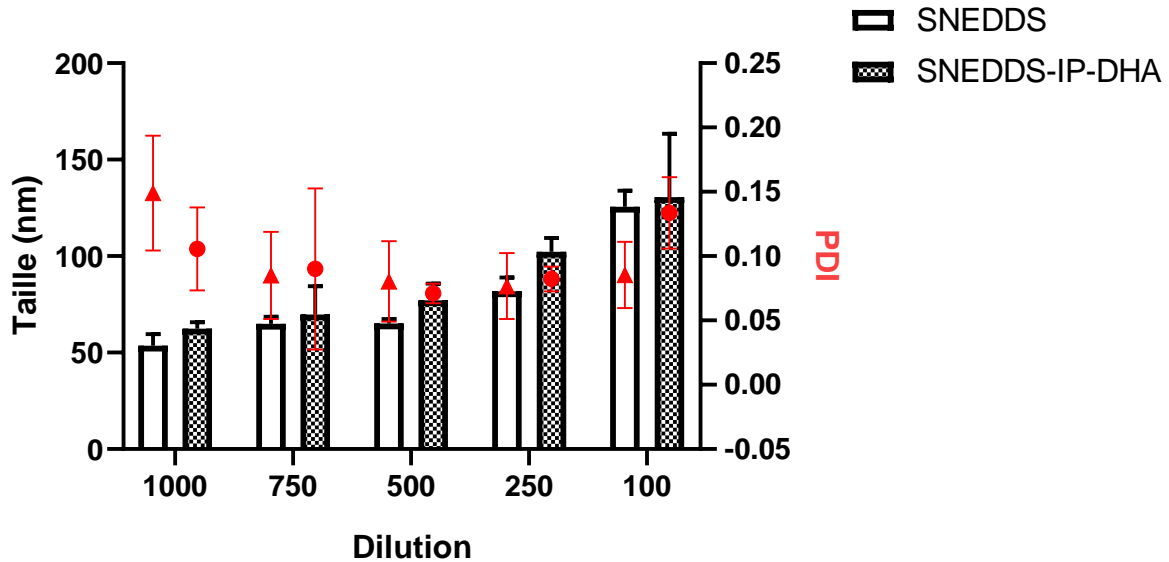


Figure 47 : Distribution de taille et PDI des NE vide et des NE-IP-DHA en fonction de la dilution dans l'eau du SNEDDS et du SNEDDS-IP-DHA chargées à 30mg/mL (n = 3).

Nous avons conclu que le volume d'eau a un impact sur la taille des gouttelettes formées tout en restant homogène en termes de distribution de taille (PDI < 0,3) et en dessous de 200nm. Toutefois, la taille des gouttelettes pouvant avoir un impact sur l'absorption du médicament, il sera préférable de se trouver dans les conditions de dilution de 1:1000 pour optimiser la taille des NE formées et ainsi optimiser l'absorption de l'IP-DHA.

2.3.1.5.3 Influence des SNEDDS sur la solubilité et la stabilité de l'IP-DHA dans les fluides gastriques et intestinaux simulés

La stabilité de l'IP-DHA seul et des SNEDDS-IP-DHA a été comparée, dans des milieux SGF et SIF, afin d'évaluer l'impact du pH et des enzymes sur la dégradation de l'IP-DHA.

Dans le milieu gastrique, avec ou sans formulation, l'IP-DHA est resté stable et n'a pas été dégradé par le pH acide ou par la pepsine dans le milieu (**figure 48A**). La faible solubilité de

l'IP-DHA dans le milieu gastrique ($7,4 \pm 0,3\mu\text{g/mL}$) a été augmentée d'un facteur 30 avec la formulation SNEDDS ($> 225\mu\text{g/mL}$).

Dans le milieu intestinal, la solubilité de l'IP-DHA dans l'ISF ($> 225\mu\text{g/mL}$) a également été augmentée en utilisant la formulation SNEDDS mais dans les deux cas, une forte dégradation de l'IP-DHA a été observée avec toutefois une amélioration grâce à la formulation : $T_{1/2}$ SNEDDS-IP-DHA = 17min vs $T_{1/2}$ IP-DHA = 11min (**figure 48B**). La dégradation est certainement causée par la pancréatine qui peut cliver la fonction ester de l'IP-DHA. Cette dégradation confirme que la molécule est adsorbée à la surface des NE et non entièrement encapsulée. La limitation de cette dégradation par les SNEDDS n'est pas surprenante ; il a été rapporté que les SNEDDS peuvent protéger certaines SA de la dégradation enzymatique dans le TGI [67]. De plus, une autre étude a montré que les tensioactifs non ioniques offrent une protection contre la déstabilisation par les lipases dans les émulsions [68].

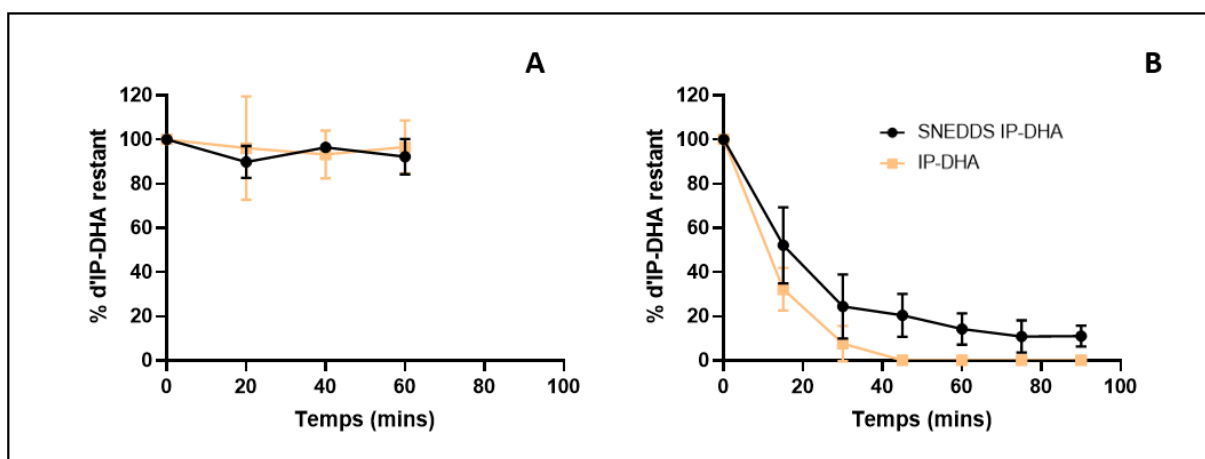


Figure 48 : Stabilité de l'IP-DHA en milieu SGF (A) et ISF (B) après dilution de l'IP-DHA ou des SNEDDS-IP-DHA à 30 mg/mL ($n = 3$)

Par conséquent, les SNEDDS ont permis d'augmenter la solubilité de l'IP-DHA dans le SGF et l'ISF. Le pH acide et la pepsine du SGF n'ont eu aucun impact sur la stabilité de l'IP-DHA dans le milieu. La dégradation de l'IP-DHA dans l'ISF probablement causée par les enzymes intestinales (notamment la pancréatine) a été partiellement limitée par les SNEDDS.

2.3.2 LNC-Q-IP-DHA

Les nanocapsules lipidiques (LNC) sont formées à partir de plusieurs excipients : (i) un cœur huileux constitué de Labrafac®, qui en fonction de la quantité utilisée peut faire varier la taille des LNC obtenues [69], (ii) un tensioactif lipophile ancré à la phase huileuse : le Lipoid® S75, qui va stabiliser la coque rigide des LNC [70] et (iii) un surfactant hydrophile situé dans la phase aqueuse : le Kolliphor® HS 15, qui va favoriser la formation et la dispersion des LNC [71] et enfin, (iv) une phase aqueuse saline (mélange d'eau MiliQ et de NaCl) qui va faire varier la température de transition de phase [72]. Il est important de bien maîtriser ces paramètres en fonction de l'objectif à atteindre. Connaissant l'impact de chacun des constituants, nous avons dû optimiser les différentes concentrations afin d'obtenir des LNC de petites tailles permettant de solubiliser un maximum de Q-IP-DHA.

2.3.2.1 Optimisation de la formulation des LNC vides et chargées : choix du ratio Kolliphor® HS 15/Labrafac®/ phase aqueuse

Afin d'optimiser le chargement en Q-IP-DHA dans les LNC, le ratio en Kolliphor® HS 15/Labrafac®/phase aqueuse a été modulé pour obtenir des tailles de LNC les plus petites possible. La diminution de la taille des LNC permet d'augmenter la surface d'échange entre les LNC formées et l'eau et ainsi augmenter le chargement en Q-IP-DHA à l'intérieur des LNC. Pour diminuer au maximum la taille des LNC, nous avons augmenté la quantité de surfactant utilisée et diminué la quantité d'huile et d'eau. Dans notre étude, la quantité de phase huileuse (Labrafac®) a été fixée à 10%, ce qui correspond à la quantité minimum de phase huileuse nécessaire pour former des LNC, la phase aqueuse varie de 40 à 60% et le surfactant de 30 à 60%. Les études sont faites dans un premier temps sur les LNC-V et leur caractérisation par corrélation de photons sont regroupées dans le **tableau 28**.

Tableau 28 : Taille et PDI des LNC-V en fonction du ratio utilisé

Ratio Kolliphor® HS 15/Labrafac®/phase aqueuse	Taille (nm)	PDI
60/10/40	N/A	N/A
40/10/50	21,6 ± 0,8nm	0,2 ± 0,0
30/10/60	23,3 ± 0,8nm	0,1 ± 0,1

Avec un ratio 60/10/40, Les LNC sont très hétérogènes, probablement à cause de la trop faible quantité d'eau utilisée pour former les LNC. Les ratios 40/10/50 et 30/10/60 présentent des résultats satisfaisants avec la formation de LNC de petite taille, respectivement de $21,6 \pm 0,8\text{nm}$ et de $23,3 \pm 0,8\text{nm}$ monodisperses ($\text{PDI} < 0,3$).

2.3.2.2 Optimisation et caractérisation de la formulation LNC-Q-IP-DHA

Les LNC vides avec le plus haut pourcentage massique en Kolliphor® HS 15 (40/10/50) ont dans un premier temps été retenues pour continuer le développement car elles devraient permettre de charger une quantité de Q-IP-DHA plus importante. Cependant au cours des études de chargement en Q-IP-DHA, les tailles et PDI des LNC n'étant pas satisfaisants et limitant fortement le chargement en Q-IP-DHA, notre choix s'est orienté vers le ratio 30/10/60 pour développer la formulation.

Les résultats obtenus avec la formulation 30/10/60 (**figure 49**) montrent que la taille des LNC augmente progressivement avec la masse de Q-IP-DHA passant de $23,4 \pm 1,3\text{nm}$ avec 20mg à $25,2 \pm 1,0\text{nm}$ avec 30mg jusqu'à $26,1 \pm 3,1\text{nm}$ avec 40mg en Q-IP-DHA. Cependant à partir d'un chargement à 50mg de Q-IP-DHA, les LNC formées présentent une distribution de taille hétérogène ne pouvant être déterminée (N/A). Le PDI inférieur à 0,3 pour les formulations chargées à 20, 30 et 40 mg atteste de l'homogénéité des formulations.

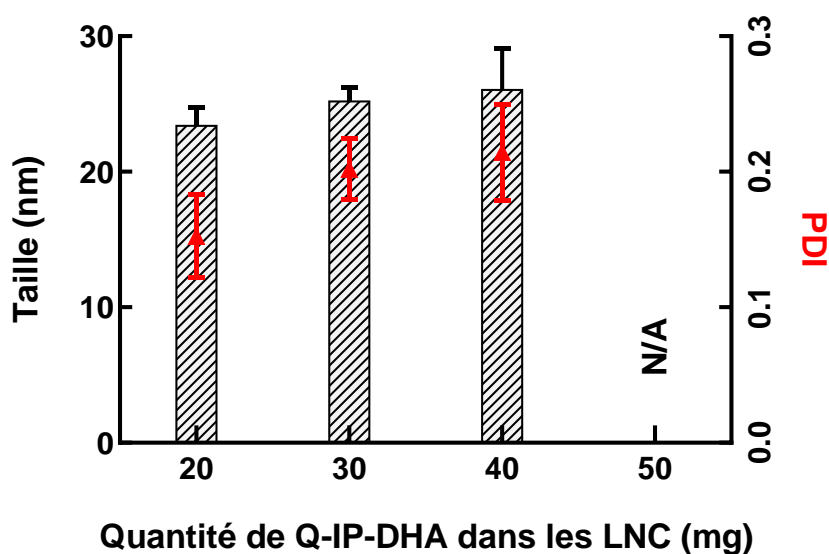


Figure 49 : Taille et PDI des LNC chargées (30% Kolliphor® HS 15/10% Labrafac®/60% phase aqueuse) en fonction de la masse de Q-IP-DHA utilisée (n=3)

La formulation retenue pour la suite de l'étude sera donc celle d'un ratio en Kolliphor® HS 15/Labrafac®/ phase aqueuse (% m/m) de 30/10/60 permettant de formuler 40mg de Q-IP-DHA ce qui correspond à un taux de chargement de 3,24 % et un pourcentage d'encapsulation de $96,5 \pm 1,7\%$. Ce résultat prouve l'affinité de la Q-IP-DHA pour les LNC (**tableau 29**). Le potentiel zêta reste proche de la neutralité pour les LNC-V et le chargement en Q-IP-DHA n'affecte pas sa valeur.

Tableau 29 : Taille, PDI, taux de chargement et pourcentage d'encapsulation de la Q-IP-DHA dans les LNC (n=3)

	LNC-V	LNC-Q-IP-DHA
Taille (nm)	$23,3 \pm 0,8\text{nm}$	$26,1 \pm 3,1\text{nm}$
PDI	$0,1 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,0$
Potentiel zêta	$- 1.5 \pm 1.0$	$- 2 \pm 0.7$
Taux de chargement	/	3,24%
% d'encapsulation	/	$96,5 \pm 1,7\%$

2.4 Conclusion

L'IP-DHA a été formulé pour la voie orale avec des SNEDDS composés de Phosal® 53 MCT, de Labrasol® et de Transcutol HP®. Après étude du diagramme ternaire, le ratio d'excipients utilisés a été optimisé à 25/60/15 en phase huileuse/surfactant/co-surfactant conduisant à la formation de NE homogènes d'environ 62nm de diamètre moyen. Un taux de chargement en IP-DHA de 2,93% avec un pourcentage d'encapsulation de 99% a été obtenu avec un faible impact sur la taille et l'homogénéité des NE. Les SNEDDS chargées en IP-DHA se sont avérées robustes à la dilution et ont permis de réduire l'impact des enzymes intestinales sur la dégradation de l'actif.


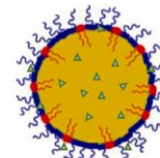
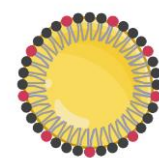
La Q-IP-DHA a été formulée avec des LNC composées de Kolliphor® HS 15/Labrafac®/phase aqueuse. Le ratio des excipients utilisés a été optimisé à un ratio de 30/10/60 permettant d'obtenir des LNC homogènes de taille de 26nm. Le taux de chargement en Q-IP-DHA représente 3,24% avec un pourcentage d'encapsulation obtenu de 96,5%.

Le taux de chargement de ces deux actifs (IP-DHA et Q-IP-DHA) dans ces deux formulations (SNEDDS et LNC) permettent une administration orale de doses élevées (100mg/kg) chez la souris afin de pouvoir effectuer des études pharmacocinétiques (PK) et d'évaluer leur efficacité par voie orale (chapitre 6).

III. Conclusion sur les formulations développées

Nous avons développé plusieurs nanoformulations lipidiques pour la voie IV et orale : micelles, LNC et SNEDDS. Les caractéristiques des formulations développées sont regroupées dans le **tableau 30**. L'IP-DHA, premier composé LEAD de notre étude ayant été synthétisé en plus grande quantité que la Q-IP-DHA, la formulation orale de l'IP-DHA a pu être caractérisée de manière plus complète. La Q-IP-DHA ayant donné des résultats prometteurs *in vitro* (chapitre 2), nous avons choisi de continuer son développement mais il a fallu travailler sur le développement de formulations et de méthodes de caractérisation avec des quantités limitées d'actifs, pour ensuite nous permettre de les évaluer *in vivo* (chapitre 6).

Tableau 30 : Comparaison des nanoformulations lipidiques développées

Formulations développées	Micelle	LNC	SNEDDS
			
Actif chargé	Q-IP-DHA ou IP-DHA	Q-IP-DHA	IP-DHA
Voie d'administration	IV	Orale	Orale
Composition	Kolliphor® HS15 Solution saline 0,9%	Kolliphor® HS 15 Labrafac® Lipoid S75	Phosal® 53 MCT Labrasol® Transuctol® HP
Taille, PDI	Q-IP-DHA : 16nm, PDI 0,19 IP-DHA : 18nm, PDI : 0,28	26nm, PDI 0,21	62nm, PDI 0,11
Taux de chargement	3,11%	3,24%	2,93%
% d'encapsulation	Q-IP-DHA : 95% IP-DHA : 99%	97%	99%

Des études de stabilités sur les formulations sont en cours. Dans le chapitre suivant nous étudierons la pharmacocinétique de l'IP-DHA par voie IV et orale chez l'animal et l'efficacité *in vivo* de l'IP-DHA et Q-IP-DHA, avec les 3 formulations développées (IV et orale) chez deux modèles d'animaux (ABCA4KO et BALB/c) capables de développer une dégénérescence des photorécepteurs induite par un stress lumineux aigu et chronique (ABCA4KO et BALB/c).

Références

- [1] E. Moine, M. Boukhallat, D. Cia, N. Jacquemot, L. Guillou, T. Durand, J. Vercauteren, P. Brabet, C. Crauste, New lipophenols prevent carbonyl and oxidative stresses involved in macular degeneration, *Free Radical Biology and Medicine*. 162 (2021) 367–382. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.316>.
- [2] B. Bittner, R.J. Mountfield, Intravenous administration of poorly soluble new drug entities in early drug discovery: the potential impact of formulation on pharmacokinetic parameters, *Curr Opin Drug Discov Devel*. 5 (2002) 59–71.
- [3] P. van Hoogevest, X. Liu, A. Fahr, Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective, *Expert Opinion on Drug Delivery*. 8 (2011) 1481–1500. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.614228>.
- [4] S. Kalepu, V. Nekkanti, Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 5 (2015) 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>.
- [5] A.T.M. Serajuddin, Salt formation to improve drug solubility, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59 (2007) 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.010>.
- [6] K. Kawakami, N. Oda, K. Miyoshi, T. Funaki, Y. Ida, Solubilization behavior of a poorly soluble drug under combined use of surfactants and cosolvents, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28 (2006) 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.11.012>.
- [7] H. Cabral, K. Kataoka, Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies, *Journal of Controlled Release*. 190 (2014) 465–476. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.042>.
- [8] T. Loftsson, D. Duchene, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *International Journal of Pharmaceutics*. 329 (2007) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044>.
- [9] S.S. Davis, C. Washington, P. West, L. Illum, G. Liversidge, L. Sternson, R. Kirsh, Lipid Emulsions as Drug Delivery Systems, *Ann NY Acad Sci*. 507 (1987) 75–88. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb45793.x>.
- [10] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S.Y. Wu, A.K. Sood, S. Hua, Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery, *Front. Pharmacol*. 6 (2015). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>.
- [11] T.L. Lenis, J. Hu, S.Y. Ng, Z. Jiang, S. Sarfare, M.B. Lloyd, N.J. Esposito, W. Samuel, C. Jaworski, D. Bok, S.C. Finnemann, M.J. Radeke, T.M. Redmond, G.H. Travis, R.A. Radu, Expression of ABCA4 in the retinal pigment epithelium and its implications for Stargardt

- macular degeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115 (2018). <https://doi.org/10.1073/pnas.1802519115>.
- [12] R.G. Strickley, Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations, *Pharmaceutical Research*. 21 (2004) 201–230. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016235.32639.23>.
- [13] P. Ding, Y. Chen, G. Cao, H. Shen, J. Ju, W. Li, Solutol®HS15+pluronicF127 and Solutol®HS15+pluronicL61 mixed micelle systems for oral delivery of genistein, *DDDT*. Volume 13 (2019) 1947–1956. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S201453>.
- [14] L. Liu, K. Mao, W. Wang, H. Pan, F. Wang, M. Yang, H. Liu, Kolliphor® HS 15 Micelles for the Delivery of Coenzyme Q10: Preparation, Characterization, and Stability, *AAPS PharmSciTech*. 17 (2016) 757–766. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0399-5>.
- [15] J.J. Sheng, Surfactant Flooding, in: *Modern Chemical Enhanced Oil Recovery*, Elsevier, 2011: pp. 239–335. <https://doi.org/10.1016/B978-1-85617-745-0.00007-3>.
- [16] C.O. Rangel-Yagui, A. Pessoa-Jr, L.C. Tavares, Micellar solubilization of drugs., (2005)
- [17] H. Cabral, K. Kataoka, Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies, *Journal of Controlled Release*. 190 (2014) 465–476. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.042>.
- [18] N. Nishiyama, K. Kataoka, Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery, *Pharmacology & Therapeutics*. 112 (2006) 630–648. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.05.006>.
- [19] B. Bittner, R.C.B. González, I. Walter, M. Kapps, J. Huwyler, Impact of solutol HS 15 on the pharmacokinetic behaviour of colchicine upon intravenous administration to male Wistar rats: SOLUTOL HS 15 ALTERS COLCHICINE KINETICS, *Biopharm. Drug Dispos*. 24 (2003) 173–181. <https://doi.org/10.1002/bdd.353>.
- [20] Handbook of Pharmaceutical Excipients – 7th Edition, *Pharmaceutical Development and Technology*. 18 (2013) 544–544. <https://doi.org/10.3109/10837450.2012.751408>.
- [21] R.H. Müller, C. Jacobs, O. Kayser, Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 47 (2001) 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00118-6).
- [22] S.-D. Li, L. Huang, Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles, *Mol. Pharmaceutics*. 5 (2008) 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>.
- [23] Y. Wang, X. Ke, Z.X. Voo, S.S.L. Yap, C. Yang, S. Gao, S. Liu, S. Venkataraman, S.A.O. Obuobi, J.S. Khara, Y.Y. Yang, P.L.R. Ee, Biodegradable functional polycarbonate micelles for controlled release of amphotericin B, *Acta Biomaterialia*. 46 (2016) 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.036>.
- [24] Y. Shi, W. Porter, T. Merdan, L.C. Li, Recent advances in intravenous delivery of poorly water-soluble compounds, *Expert Opinion on Drug Delivery*. 6 (2009) 1261–1282. <https://doi.org/10.1517/17425240903307423>.
- [25] M.L. Kielar, D.R. Jeyarajah, X.J. Zhou, C.Y. Lu, Docosahexaenoic Acid Ameliorates Murine Ischemic Acute Renal Failure and Prevents Increases in mRNA Abundance for both TNF- α and Inducible Nitric Oxide Synthase, *JASN*. 14 (2003) 389–396. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000045047.44107.0B>.

- [26] N. Taveau, A. Cubizolle, L. Guillou, N. Pinquier, E. Moine, D. Cia, V. Kalatzis, J. Vercauteren, T. Durand, C. Crauste, P. Brabet, Preclinical pharmacology of a lipophenol in a mouse model of light-induced retinopathy, *Exp Mol Med.* 52 (2020) 1090–1101. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0460-7>.
- [27] P. Stenberg, C.A.S. Bergström, K. Luthman, P. Artursson, Theoretical Predictions of Drug Absorption in Drug Discovery and Development, *Clinical Pharmacokinetics.* 41 (2002) 877–899. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241110-00005>.
- [28] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 64 (2012) 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- [29] L. Perioli, V. Ambrogi, M. Nocchetti, M. Sisani, C. Pagano, Preformulation studies on host–guest composites for oral administration of BCS class IV drugs: HTlc and furosemide, *Applied Clay Science.* 53 (2011) 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2011.06.006>.
- [30] R. Ghadi, N. Dand, BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development, *Journal of Controlled Release.* 248 (2017) 71–95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.014>.
- [31] M. Markovic, M. Zur, I. Ragatsky, S. Cvijić, A. Dahan, BCS Class IV Oral Drugs and Absorption Windows: Regional-Dependent Intestinal Permeability of Furosemide, *Pharmaceutics.* 12 (2020) 1175. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121175>.
- [32] S.S. Rane, B.D. Anderson, What determines drug solubility in lipid vehicles: Is it predictable?, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 60 (2008) 638–656. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.015>.
- [33] U.S. M., J.R. Lobo F., K.B. Uppuluri, Self Nano Emulsifying Drug Delivery Systems for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs, *Biomed. Pharmacol. J.* 6 (2013) 355–362. <https://doi.org/10.13005/bpj/425>.
- [34] S.R. Sökkula, S. Gande, A Comprehensive Review on Self-Nano Emulsifying Drug Delivery Systems: Advancements & Applications, *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* (2020) 576–583. <https://doi.org/10.25004/IJPSDR.2020.120522>.
- [35] A.A. Date, N. Desai, R. Dixit, M. Nagarsenker, Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances, *Nanomedicine.* 5 (2010) 1595–1616. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.126>.
- [36] M. Kuentz, Lipid-based formulations for oral delivery of lipophilic drugs, *Drug Discovery Today: Technologies.* 9 (2012) e97–e104. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.03.002>.
- [37] S. Kalepu, M. Manthina, V. Padavala, Oral lipid-based drug delivery systems – an overview, *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 3 (2013) 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.10.001>.
- [38] I. Cherniakov, A.J. Domb, A. Hoffman, Self-nano-emulsifying drug delivery systems: an update of the biopharmaceutical aspects, *Expert Opinion on Drug Delivery.* 12 (2015) 1121–1133. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.999038>.
- [39] R. Neslihan Gursoy, S. Benita, Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs, *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 58 (2004) 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2004.02.001>.
- [40] J.H. Yoo, S. Shanmugam, P. Thapa, E.-S. Lee, P. Balakrishnan, R. Baskaran, S.-K. Yoon, H.-G. Choi, C.S. Yong, B.K. Yoo, K. Han, Novel self-nanoemulsifying drug delivery system

- for enhanced solubility and dissolution of lutein, *Arch. Pharm. Res.* 33 (2010) 417–426. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0311-5>.
- [41] S. Shanmugam, R. Baskaran, P. Balakrishnan, P. Thapa, C.S. Yong, B.K. Yoo, Solid self-nanoemulsifying drug delivery system (S-SNEDDS) containing phosphatidylcholine for enhanced bioavailability of highly lipophilic bioactive carotenoid lutein, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 79 (2011) 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.04.012>.
- [42] R. Amara, A. Ramadan, R. El-Moslemany, M. Eissa, M. El-Azzouni, L. El-Khordagui, Praziquantel–lipid nanocapsules: an oral nanotherapeutic with potential *Schistosoma mansoni* tegumental targeting, *IJN.* Volume 13 (2018) 4493–4505. <https://doi.org/10.2147/IJN.S167285>.
- [43] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers, *Pharmaceutical Research.* 19 (2002) 875–880. <https://doi.org/10.1023/A:1016121319668>.
- [44] N.T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine, *International Journal of Pharmaceutics.* 379 (2009) 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.026>.
- [45] S. Peltier, J.-M. Oger, F. Lagarce, W. Couet, J.-P. Benoît, Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules, *Pharm Res.* 23 (2006) 1243–1250. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0022-2>.
- [46] K. Nayak, M. Misra, A review on recent drug delivery systems for posterior segment of eye, *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 107 (2018) 1564–1582. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.138>.
- [47] A. Clavreul, N. Lautram, F. Franconi, C. Passirani, C. Montero-Menei, P. Menei, C. Tetaud, A. Montagu, A.-L. Laine, A. Vessieres, Targeting and treatment of glioblastomas with human mesenchymal stem cells carrying ferrociphenol lipid nanocapsules, *IJN.* (2015) 1259. <https://doi.org/10.2147/IJN.S69175>.
- [48] M. Krstić, Đ. Medarević, J. Đuriš, S. Ibrić, Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) and self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) as lipid nanocarriers for improving dissolution rate and bioavailability of poorly soluble drugs, in: *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*, Elsevier, 2018: pp. 473–508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813687-4.00012-8>.
- [49] S. Gupta, R. Kesarla, A. Omri, Formulation Strategies to Improve the Bioavailability of Poorly Absorbed Drugs with Special Emphasis on Self-Emulsifying Systems, *ISRN Pharmaceutics.* 2013 (2013) 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/848043>.
- [50] H. Shrestha, R. Bala, S. Arora, Lipid-Based Drug Delivery Systems, *Journal of Pharmaceutics.* 2014 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/801820>.
- [51] A.B. Buya, A. Beloqui, P.B. Memvanga, V. Préat, Self-Nano-Emulsifying Drug-Delivery Systems: From the Development to the Current Applications and Challenges in Oral Drug Delivery, *Pharmaceutics.* 12 (2020) 1194. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121194>.
- [52] E.B. Basalious, N. Shawky, S.M. Badr-Eldin, SNEDDS containing bioenhancers for improvement of dissolution and oral absorption of lacidipine. I: Development and optimization, *International Journal of Pharmaceutics.* 391 (2010) 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.008>.

- [53] B. Morakul, Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS): an advancement technology for oral drug delivery, *Pharm Sci Asia*. 47 (2020) 205–220. <https://doi.org/10.29090/psa.2020.03.019.0121>.
- [54] B. Chatterjee, S. Hamed Almurisi, A. Ahmed Mahdi Dukhan, U.K. Mandal, P. Sengupta, Controversies with self-emulsifying drug delivery system from pharmacokinetic point of view, *Drug Delivery*. 23 (2016) 3639–3652. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1214990>.
- [55] C.M. O'Driscoll, Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 15 (2002) 405–415. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00051-9).
- [56] W.N.A. Charman, V.J. Stella, Estimating the maximal potential for intestinal lymphatic transport of lipophilic drug molecules, *International Journal of Pharmaceutics*. 34 (1986) 175–178. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(86\)90027-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(86)90027-X).
- [57] X. Sha, G. Yan, Y. Wu, J. Li, X. Fang, Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junctions in Caco-2 cells, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 24 (2005) 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.01.001>.
- [58] F. McCartney, V. Jannin, S. Chevrier, H. Boulghobra, D.R. Hristov, N. Ritter, C. Miolane, Y. Chavant, F. Demarne, D.J. Brayden, Labrasol® is an efficacious intestinal permeation enhancer across rat intestine: Ex vivo and in vivo rat studies, *Journal of Controlled Release*. 310 (2019) 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.008>.
- [59] H. Shen, M. Zhong, Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) containing atorvastatin, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 58 (2010) 1183–1191. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.9.0004>.
- [60] M.H. Patel, K.K. Sawant, Self microemulsifying drug delivery system of lurasidone hydrochloride for enhanced oral bioavailability by lymphatic targeting: In vitro, Caco-2 cell line and in vivo evaluation, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 138 (2019) 105027. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105027>.
- [61] P.P. Constantinides, J.-P. Scalart, C. Lancaster, J. Marcello, G. Marks, H. Ellens, P.L. Smith, Formulation and Intestinal Absorption Enhancement Evaluation of Water-in-Oil Microemulsions Incorporating Medium-Chain Glycerides, *Pharmaceutical Research*. 11 (1994) 1385–1390. <https://doi.org/10.1023/A:1018927402875>.
- [62] S.V.R. Rao, K. Yajurvedi, J. Shao, Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs, *International Journal of Pharmaceutics*. 362 (2008) 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.05.015>.
- [63] R.H. Muller, C. Jacobs, O. Kayser, Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy Rationale for development and what we can expect for the future, *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2001) 17.
- [64] K. AboulFotouh, A.A. Allam, M. El-Badry, A.M. El-Sayed, Development and in vitro / in vivo performance of self-nanoemulsifying drug delivery systems loaded with candesartan cilexetil, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 109 (2017) 503–513. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.001>.
- [65] S. Okonogi, P. Phumat, S. Khongkhunthian, P. Chaijareenont, T. Rades, A. Müllertz, Development of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems Containing 4-Allylpyrocatechol for Treatment of Oral Infections Caused by *Candida albicans*, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 167. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020167>.
- [66] A. Yu, T. Jackson, Y. Tsume, M. Koenigsknecht, J. Wysocki, L. Marciani, G.L. Amidon, A. Frances, J.R. Baker, W. Hasler, B. Wen, A. Pai, D. Sun, Mechanistic Fluid Transport Model

- to Estimate Gastrointestinal Fluid Volume and Its Dynamic Change Over Time, *AAPS J.* 19 (2017) 1682–1690. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0145-x>.
- [67] S.R. Sokkula, S. Gande, A Comprehensive Review on Self-Nano Emulsifying Drug Delivery Systems: Advancements & Applications, *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* (2020) 576–583. <https://doi.org/10.25004/IJPSDR.2020.120522>.
- [68] A. Torcello-Gómez, J. Maldonado-Valderrama, J. de Vicente, M.A. Cabrerizo-Vílchez, M.J. Gálvez-Ruiz, A. Martín-Rodríguez, Investigating the effect of surfactants on lipase interfacial behaviour in the presence of bile salts, *Food Hydrocolloids.* 25 (2011) 809–816. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.007>.
- [69] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.-C. Venier-Julienne, J.-E. Proust, R. Phan-Tan-Luu, J.-P. Benoît, The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution, *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 18 (2003) 55–61. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00241-5](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00241-5).
- [70] A. Vonarbourg, P. Saulnier, C. Passirani, J.-P. Benoit, Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: Influence of the dipolar distribution at the interface, *Electrophoresis.* 26 (2005) 2066–2075. <https://doi.org/10.1002/elps.200410145>.
- [71] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.E. Proust, J.P. Benoît, Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface, *International Journal of Pharmaceutics.* 242 (2002) 167–170. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00144-8).
- [72] N. Anton, P. Saulnier, A. Béduneau, J.-P. Benoit, Salting-Out Effect Induced by Temperature Cycling on a Water/Nonionic Surfactant/Oil System, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 3651–3657. <https://doi.org/10.1021/jp0664768>.

Chapitre 6 : Pharmacocinétique, métabolisation et évaluation de l'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA

I. Introduction

L'IP-DHA a été précédemment formulé avec une formulation lipidique SNEDDS pour améliorer sa solubilité et sa dissolution dans le TGI et ainsi améliorer sa biodisponibilité. Afin de valider cette hypothèse, des **études pharmacocinétiques** ont été conduites. Pour cela, nous avons dans un premier temps, administré l'IP-DHA sous solution micellaire par voie IV à 30mg/kg, puis par voie orale à une même dose (150mg/kg) et dans les mêmes conditions avec la formulation SNEDDS ou en solution huileuse. Suite aux résultats de l'étude de pharmacocinétique, nous avons voulu **déterminer et quantifier les molécules issues de la dégradation de l'IP-DHA** dans le sang. L'ensemble de ces résultats sera présenté dans la partie 2. Pour des raisons de temps, de coût et de quantité d'actifs disponibles, l'analyse pharmacocinétique n'a pas pu être réalisée avec les formulations IV et orales développées pour la Q-IP-DHA.

Dans la partie 3, nous déterminerons **l'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA formulés et administrés par voie IV chez la souris ABCA4KO** (modèle de la maladie de Stargardt) ; l'administration est suivie par une induction de la dégénérescence des photorécepteurs des souris par un **stress lumineux aigu**. Pour cela, la Q-IP-DHA est administrée à une dose de 30mg/kg par voie IV formulée avec les micelles de Kolliphor® HS 15. Pour l'IP-DHA, son efficacité ayant été précédemment démontrée en étant complexé avec la BSA, nous avons voulu vérifier si la nouvelle formulation micellaire de l'IP-DHA (développée pour la Q-IP-DHA) aurait une influence sur son efficacité. Nous avons donc administré l'IP-DHA formulé avec le kolliphor® HS 15 ou avec la BSA pour comparer son efficacité à dose égale dans les mêmes conditions expérimentales.

Dans la partie 4, sera abordée **l'efficacité des SA administrées par voie orale**. Une étude dose-réponse a été menée avec les SNEDDS-IP-DHA de 17mg/kg à 100mg/kg et avec les LNC-Q-IP-DHA de 50mg/kg à 100mg/kg. Pour mesurer l'impact de la formulation sur l'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA à protéger les photorécepteurs des souris après induction de leur dégénérescence par un **stress lumineux aigu**, ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec l'IP-DHA et la Q-IP-DHA en solution, solubilisé dans l'huile de soja pour l'IP-DHA et solubilisé dans le Labrafac® pour la Q-IP-DHA (100mg/kg).

Pour finir, la dernière partie de ce chapitre portera sur **l'évaluation de l'efficacité de l'IP-DHA formulé par voie orale dans un modèle de dégénérescence maculaire induit pas un stress lumineux chronique**. L'étude avec le modèle de dégénérescence des photorécepteurs des souris induit par un stress lumineux aigu est un bon moyen pour évaluer l'efficacité de différents traitements potentiels sur un temps court (1h30). Cependant, pour nous rapprocher des **conditions réelles de la physiopathologie de la DMLA** qui est une maladie chronique, nous avons voulu évaluer l'efficacité des composés sur un temps plus long (1 semaine) avec des lumières moins intenses (500 – 2000Lux). Nous avons donc développé un modèle « chronique » de dégénérescence des photorécepteurs. Pour cela, plusieurs types de lumière (bleue ou blanche) avec des intensités différentes (700 et 1000Lux) ont été étudiés sur une semaine afin d'obtenir des niveaux de dégénérescence similaires à ceux du modèle aigu (environ 80%). Une fois le modèle validé, nous avons pu comparer l'efficacité de la formulation de SNEDDS-IP-DHA administrée pendant une semaine par voie orale à des fréquences différentes (dose journalière égale à 100mg/kg) : 100mg/kg une fois par jour, 50mg/kg deux fois par jour et 33mg/kg trois fois par jour pour **évaluer l'impact de la fréquence d'administration sur la protection des photorécepteurs des souris**.

II. Etude pharmacocinétique de l'IP-DHA en IV vs *per os*.

Recherche des métabolites de l'IP-DHA chez la souris

2.1 Matériel & Méthodes

2.1.1 Animaux

Des souris albinos ABCA4^{-/-} ont été achetées auprès de Taconic Biosciences Inc. sur un fond mixte 129/S5 x C57BL/6J-Tyrc-Brd. Les souris ont été accouplées et génotypées pour le mutant nul Abca4 et homozygotes pour Rpe65-Leu450. Le mutant rd8 était absent dans cette lignée ABCA4KO (mutation du gène crb1 présente chez la souris C57BL/6N, responsable de lésions oculaires). Les souris ont été soumises à des cycles lumineux standard de 12h de lumière (90 Lux) et 12h d'obscurité, à une température ambiante proche de 22°C, nourries *ad libitum* avec un régime standard pour rongeurs. Les souris ont été hébergées dans des installations

accréditées par le ministère français de l'agriculture et de la forêt (n°C34-17236 - 19 décembre 2014). Les procédures expérimentales ont été réalisées conformément à la directive européenne 2010/63/UE et au ministère français de l'éducation et de la recherche (APAFIS n°15117-2018051712092842 v3), concernant les soins et l'utilisation des animaux.

2.1.2 Dosage HPLC/MS de l'IP-DHA

L'analyse quantitative a été réalisée par μ HPLC (Sciex, ExionLC AD) avec une colonne kinetx Phenyl Hexyl (phenomenex, 50 x 2,1mm, 100A) comme phase stationnaire. La phase mobile était constituée de 0,1 % d'acide formique dans l'eau (phase A) et de 0,1 % d'acide formique dans l'acétonitrile (phase B) avec un mode de gradient commençant par un ratio de 30/70% (v/v) à 0min puis à 0/97% à 0,60min et enfin à 30/70% à 2,30min (débit de 0,6mL.min⁻¹) pendant 10min. Les échantillons ont été analysés sur le Sciex 5500- triple-quadrupole MS, mode d'ionisation positive, température capillaire 300°C, tension capillaire 5,5Kv.

2.1.3 Administration de l'IP-DHA

Des souris âgées de 8 à 16 semaines (des deux sexes), ont été pesées afin d'ajuster la dose injectée dans la veine caudale à 30mg/kg soit environ 100 μ L de la formulation IV de M-IP-DHA à 6mg/mL. Pour la formulation SNEDDS-IP-DHA administrée par voie orale, les doses ont été fixées à 150mg/kg (dose max) et 17mg/kg (dose faible) et pour l'IP-DHA administrée en solution huileuse, la dose administrée était de 150mg/kg également. Les administrations orales ont été faites avec une sonde de gavage calibre 22.

Tableau 31 : Formulations administrées pour l'étude de pharmacocinétique de l'IP-DHA

	SNEDDS	SNEDDS	Non formulé	Micelle
Voie d'administration	Orale	Orale	Orale	IV
Concentration d'IP-DHA (mg/mL)	30	30	30	6
Excipients	Phosal® 53 MCT Labrasol® Transcutol® HP	Phosal® 53 MCT Labrasol® Transcutol® HP	Huile de Soja	Kolliphor® HS15 Eau MilliQ
Volume à administrer (souris de 25g)	15 μ L	125 μ L	125 μ L	125 μ L
Dose d'IP-DHA administrée	17mg/kg	150mg/kg	150mg/kg	30mg/kg

2.1.4 Prélèvement de sang

Des prélèvements submandibulaires de 100µL de sang ont été effectués à différents temps après injection par voie IV chez la souris : 5, 15, 30, 60, 120 et 180min et à 5, 60, 120, 180, 240 et 360min après une administration par voie orale. Le sang a été prélevé dans des tubes héparinés pour éviter la coagulation du sang. Chaque tube de prélèvement contenait également 10µM de diisopropylfluorophosphate (DFP) (sigma-Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) pour inhiber la dégradation de l'IP-DHA par les estérases. Après prélèvement les tubes sont conservés sur glace avant d'être préparés pour quantification.

2.1.5 Traitement de l'échantillon avant dosage

Les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 15min à 2500rpm (centrifugeuse Sigma 2K15) afin de séparer le plasma du sang total. 50µL de plasma ont été récupérés dans le surnageant et 100µL d'agent précipitant (mélange ACN/MeoH à un ratio 50/50 v/v) sont ajoutés avant une nouvelle centrifugation à 8000rpm de 10min pour éliminer les protéines plasmatiques. Le surnageant a été récupéré et dilué avec 100µL d'eau MilliQ pour être conservé à -20°C jusqu'à quantification.

2.1.6 Recherche des métabolites de l'IP-DHA

Une recherche de métabolites a été effectuée par le prestataire externe Pharmacelsus. L'objectif est de déterminer les produits de dégradation de l'IP-DHA dans le plasma avec et sans DFP qui est un inhibiteur d'estérases. L'analyse a été faite sur du sang de rats et les métabolites ont été quantifiés par HPLC/MS (section 2.1.2).

2.2 Résultats et discussion

Les études de pharmacocinétique permettent de déterminer l'évolution de la concentration en actif dans le sang au cours du temps. Pour cela, nous avons administré l'IP-DHA :

- Par voie IV à 30mg/kg, sous forme de micelles de Kolliphor® HS 15,
- Par voie orale à 17mg mg/kg, avec les SNEDDS-IP-DHA,
- Par voie orale à 150mg/kg, avec les SNEDDS-IP-DHA,
- Par voie orale à 150mg/kg, solubilisé dans l'huile de soja.

Ces études ont été réalisées chez des souris plutôt que chez des rats pour pouvoir diminuer la quantité d'actif utilisée. Avec la souris, les volumes de sang prélevés doivent être faibles pour pouvoir effectuer plusieurs prélèvements tout en étant suffisamment élevés pour pouvoir quantifier l'IP-DHA. Le volume de sang total chez la souris étant de 1,8mL pour une souris de 25g, nous avons ainsi fixé un minimum de 100µL de sang à chaque prélèvement, et un maximum de trois prélèvements par souris soit 17% du volume de sang total. Ce protocole permet de limiter la souffrance et le stress causé par le prélèvement chez l'animal. Cette méthode est néanmoins contraignante car cela nécessite d'utiliser deux souris pour avoir 6 points de prélèvement (3 prélèvements/souris) ce qui conduit à une variabilité des données récoltées. 3 souris sont utilisées pour chaque point de prélèvements.

2.2.1 Pharmacocinétique de l'IP-DHA par voie IV

Après injection de la solution micellaire l'IP-DHA par voie IV, la concentration de l'IP-DHA diminue très rapidement passant de 206 962ng/mL 5 minutes après l'injection, à 12,45ng/mL à 180min (**tableau 32**). Ces résultats indiquent que l'IP-DHA est rapidement distribué et/ou dégradé dans le sang avec $T_{1/2} < 15$ min. L'IP-DHA injecté par voie IV ($T_{1/2} < 15$ min) ayant déjà prouvé son efficacité pour protéger les photorécepteurs des souris après dégénérescence de ces derniers par un stress lumineux aigu (20 000 lux pendant 1,5h) [6], nous pouvons donc émettre deux hypothèses : (i) l'IP-DHA passe rapidement à travers la BHR en concentration suffisante pour passer dans l'EPR et atteindre les photorécepteurs pour exercer son activité protectrice et/ou (ii) Les métabolites issus de l'IP-DHA lors de sa dégradation sont actifs et vont passer à travers la BHR.

Tableau 32 : Cinétique plasmatique de l'IP-DHA après administration IV de M-IP-DHA à 30mg/kg ($n=3$)

Temps (min)	Concentration IP-DHA en ng/mL	Ecart-type
5	206962	281270
15	6501	9243
30	4990	8630
60	217	319
120	116	193
180	12	18

2.2.2 Pharmacocinétique de l'IP-DHA par voie orale

Après administration orale de la formulation de SNEDDS-IP-DHA, les valeurs de concentration plasmatique n'étant pas reproductible (écarts types très grands) (**tableau 33**), les paramètres PK : $T_{1/2}$, C_{max} et T_{max} ne peuvent pas être calculés afin de comparer la biodisponibilité absolue de l'IP-DHA : voie orale (SNEDDS) vs voie IV (micelles). Toutefois, à dose égale, une nette amélioration de la biodisponibilité est observée par la voie orale entre 0min et 360min permettant d'atteindre à $t=360$ min une concentration plasmatique en IP-DHA d'environ 650ng/mL avec les SNEDDS contre 32ng/mL solubilisé dans l'huile de soja. De plus, même en administrant l'IP-DHA sous forme SNEDDS à une dose de 17mg/kg la concentration plasmatique en IP-DHA tout au long de l'analyse est supérieur à celle obtenue avec l'IP-DHA solubilisée dans l'huile de soja à 150mg/kg.

Tableau 33 : Concentration plasmatique d'IP-DHA après administration orale de SNEDDS-IP-DHA à 17 et 150mg/kg et de solution d'IP-DHA dans l'huile de soja à 150mg/kg ($n=3$)

Temps (min)	SNEDDS-IP-DHA à 150mg/kg		Solution (huile de soja) IP-DHA à 150mg/kg		SNEDDS-IP-DHA à 17 mg/kg	
	[C] IP-DHA en ng/mL	Ecart-type	[C] IP-DHA en ng/mL	Ecart-type	[C] IP-DHA en ng/mL	Ecart-type
0	41670	72068	914	1367	1229	963
60	398	335	381	459	1051	282
120	23493	40558	240	371	302	102
180	132	102	23	12	810	391
240	9266	15952	57	16	884	847
360	651	839	32	18	407	169

2.2.3 identification et quantification des métabolites dans le sang

L'étude pharmacocinétique ayant mis en évidence la dégradation rapide de l'IP-DHA dans le sang, les métabolites issus de cette dégradation doivent être identifiés et quantifiés par HPLCS/MS. Le mécanisme de dégradation suggéré est le suivant : la fonction ester qui permet de greffer le DHA au phloroglucinol est clivée par les estérases sanguines provoquant la libération de deux principaux métabolites : le phloroglucinol-isopropyl et le DHA (**figure 50A**). Afin de vérifier cette hypothèse, deux analyses ont été effectuées : (i) la quantification de l'IP-DHA, du DHA (M1) et du second métabolite M2 issus de la dégradation du DHA et (ii) la même

analyse faite cette fois en présence de DFP (inhibiteur d'estérase) pour confirmer le rôle des estérases sanguines dans la dégradation de l'IP-DHA.

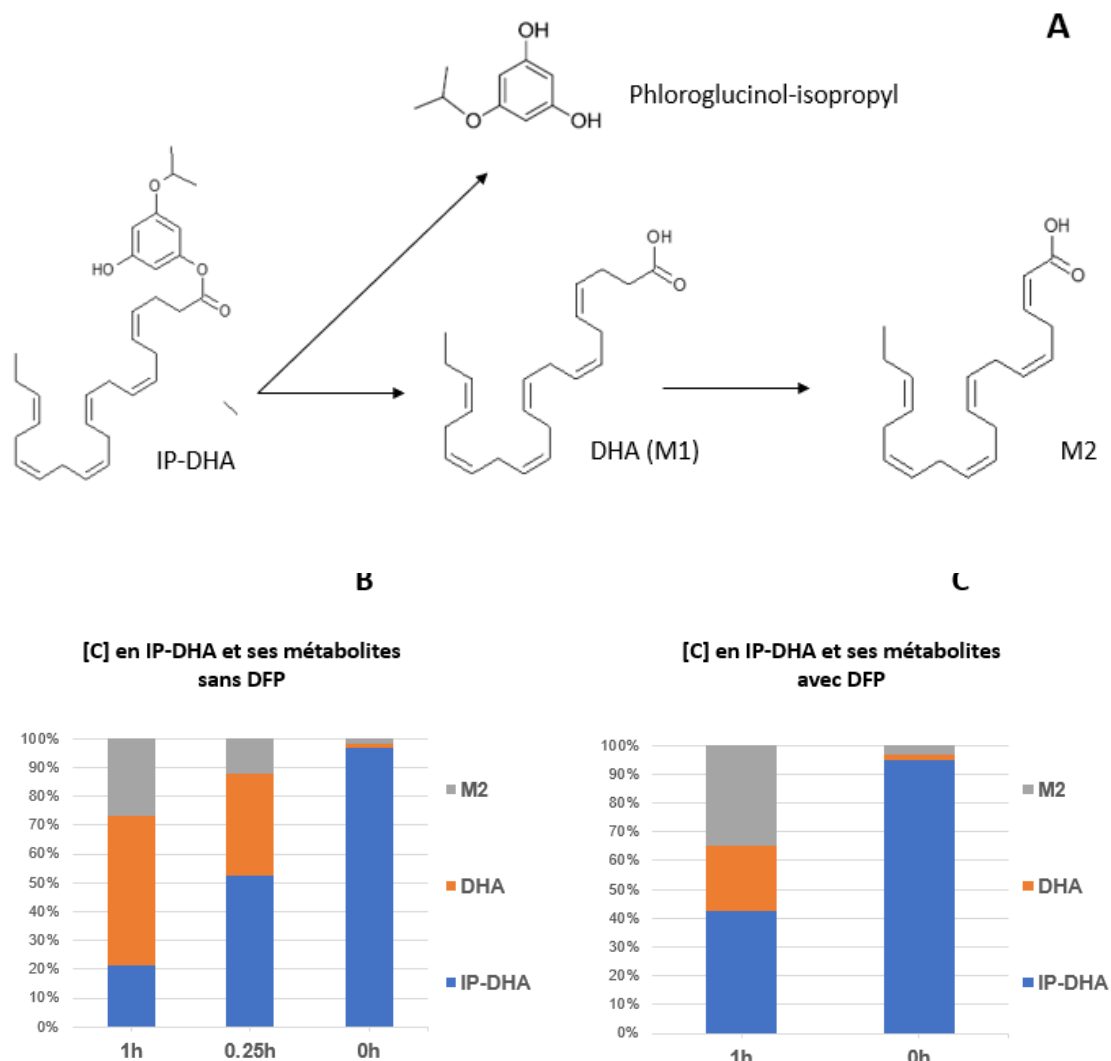


Figure 50 : Structure chimique des métabolites de l'IP-DHA dans le plasma (A) et quantification de l'IP-DHA et des métabolites M1 et M2 dans le plasma sans (B) et avec inhibiteur d'estérase (C)

L'étude des métabolites a mis en évidence la formation du métabolite DHA (M1) et d'un second métabolite issu de la dégradation du DHA (M2). Dans cette étude, le phloroglucinol-isopropyl n'a pas été quantifié. L'analyse sans DFP (**figure 50B**) nous permet de suivre la dégradation de l'IP-DHA dans le sang qui passe de 97,0% à 22,5% (-75,5%) en 1h. En parallèle, le métabolite DHA passe de 1,3% à 51,5% (+50,2%) et le métabolite M2 passe de 1,6 à 26,9% (+25,3%). Avec la DFP (**figure 50C**), la concentration d'IP-DHA passe de 94,8% à 42,3% en 1h (-52,5%). La DFP permettant de limiter la dégradation de l'IP-DHA de 23%, nous avons donc bien

une dégradation partielle de l'IP-DHA par les estérases sanguines ; d'autres mécanismes participent donc à sa dégradation.

Conclusion

L'étude pharmacocinétique par voie IV a révélé que lors de l'administration par voie IV, l'IP-DHA est dégradé rapidement dans le sang avec un $T_{1/2} < 15\text{min}$. Par voie orale, l'IP-DHA est retrouvé dans le sang mais en faible concentration quelle que soit la formulation administrée ; une légère amélioration est cependant observée avec les SNEDDS. La dégradation rapide de l'IP-DHA dans le sang est en partie liée à l'action des estérases sanguines qui clivent la fonction ester pour donner deux molécules : le phloroglucionol-isopropylé et le DHA. Le DHA va ensuite être lui-même dégradé en une seconde molécule par un mécanisme de β -oxydation.

Toutefois, malgré une rapide métabolisation plasmatique, les résultats d'efficacité obtenus par voie IV lors des études précédentes ont montré la capacité de l'IP-DHA à protéger les photorécepteurs de manière significative après induction d'un stress lumineux aigu chez la souris ABCA4KO (chapitre 2, partie 2.1.2). Pour expliquer ces résultats, nous pouvons suggérer deux hypothèses : (i) l'IP-DHA est rapidement absorbé à travers la BHR après une administration IV et permet de protéger efficacement les photorécepteurs malgré sa dégradation rapide dans le sang ou bien (ii) les métabolites de l'IP-DHA sont actifs et sont eux aussi absorbés à travers la BHR et exercent un effet protecteur sur les photorécepteurs. Les deux hypothèses peuvent avoir une action synergique sur la protection des photorécepteurs de la rétine. Ces hypothèses seront à vérifier par la suite pour établir les mécanismes induisant l'efficacité de cette molécule.

III. Evaluation de l'efficacité des solutions micellaires d'IP-DHA et de Q-IP-DHA par voie IV

3.1 Matériel & Méthodes

3.1.1 Animaux

Les souris ABCA4KO ont été utilisées pour évaluer l'efficacité de l'IP-DHA et la Q-IP-DHA par voie IV. Ces animaux ont été décrits dans le chapitre 6 section 1.1.1

3.1.2 Administration de la formulation IV

Des souris âgées de 8 à 16 semaines (des deux sexes), ont été pesées afin d'ajuster la quantité de formulation à administrer pour obtenir une dose de 30mg/kg. 100µL de la formulation M-Q-IP-DHA, M-IP-DHA à 6mg/mL ou du véhicule (Kolliphor® HS 15/solution saline 0,9%) ont été injectés dans la veine caudale. Les souris ont été injectées dans l'obscurité 15 minutes avant l'exposition à la lumière. L'Emixustat® (EMX) à 5mg/kg a également été administré par voie IV comme contrôle positif (traitement efficace chez les animaux mais arrêté en essai clinique car rapport bénéfice/risque défavorable).

3.1.3 Induction de la dégénérescence des photorécepteurs par un stress lumineux aigu sur des souris Abca4KO

Les souris ont été placées dans l'obscurité (dark adapted DA) pendant 24h (**figure 51**). 30min avant leur exposition à la lumière, leurs pupilles ont été dilatées avec du tropicamide à 0,5 %. Les souris ont été ensuite exposées à une lumière constante (2 lampes fluorescentes blanc froid, OSRAM de 26 watts, 1800 lm, efficacité photopique maximale de ~470nm, intensité lumineuse moyenne de 24mW/cm² correspondant à ~20.000Lux) pendant 1h30 dans un bac en plastique blanc muni d'un ventilateur. Les souris ont été ensuite conservées dans l'obscurité pendant 5 jours avant de faire les évaluations rétinienne. Tout au long de l'expérience, la température ambiante était de 22 °C, identique à celle du box d'élevage pour éviter une augmentation de la température corporelle et une atteinte de la rétine.

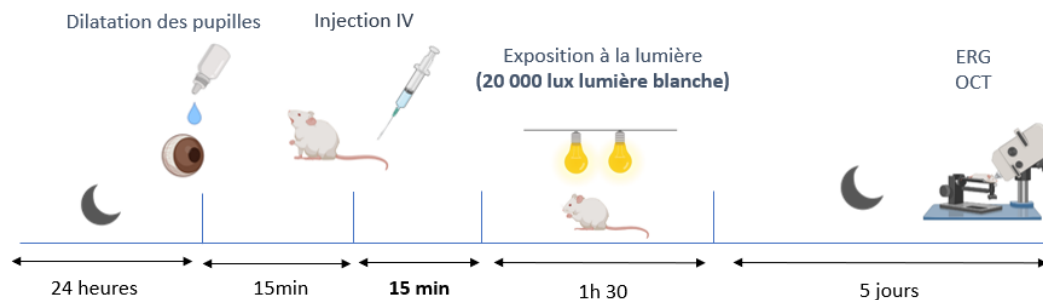


Figure 51 : Protocole d'évaluation de l'efficacité des formulations chez la souris ABCA4KO

3.1.4 Tomographie par cohérence optique dans le domaine spectral

(SD-OCT)

Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (70mg/kg) et de xylazine (14mg/kg), et une anesthésie locale a été réalisée avec une goutte d'oxybuprocaine (cébésine à 0,4 %) sur la cornée. L'hydratation de la cornée a été maintenue avec le collyre lubrifiant Systane Ultra (Alcon, Fort Worth, TX). Les pupilles ont été dilatées en appliquant du tropicamide à 0,5 % sur la cornée. La tomographie par cohérence optique à domaine spectral (SD-OCT) a été réalisée séparément sur chaque œil avec le dispositif SD-OCT Envisu R2000 (Bioptigen, Durham, NC). Les analyses ont été effectuées par balayage rectangulaire (1,4 mm × 1,4 mm avec 1000 balayages A par balayage B × 100 balayages B) tout en étant centré sur le nerf optique. L'épaisseur de la couche nucléaire interne (INL) et de la couche nucléaire externe (ONL), a été mesurée en unités arbitraires à l'aide du logiciel ImageJ. Vingt mesures ont été effectuées par analyse et la moyenne a été calculée pour les deux yeux.

3.1.5 Electrorétinographie (ERG)

Tous les examens électrophysiologiques ont été réalisés à l'aide du Visiosystem® (SIEM, France). Les animaux ont été préparés et anesthésiés, avant que l'enregistrement de l'électrorétinogramme (ERG binoculaire plein champ) soit effectué avec des électrodes en coton. Les électrodes de coton sont fabriquées à partir de coton chirurgical pur qui a été étiré et roulé pour obtenir une mèche très fine. La mèche de coton est ensuite attachée à une pince crocodile et imprégnée d'une solution saline de NaCl 0,9%. Cette imprégnation permet la conductibilité électrique des électrodes et améliore l'adhérence à la cornée de la souris. Toutes les expériences ont été réalisées le matin sous une faible lumière rouge dans une pièce

sombre. Chaque animal a été anesthésié avec de la kétamine (70mg/kg) et de la xylazine (14mg/kg). Les pupilles ont été dilatées en appliquant du tropicamide à 0,5 % sur la cornée. Une électrode aiguille placée en sous-cutané près de la queue était mise à la terre, et deux électrodes aiguilles de référence étaient placées en sous-cutané de chaque côté de la tête, près de l'oreille. Les ERG ont été enregistrés simultanément à partir des deux yeux. L'activité électrique des ondes a et b, a été enregistrée après induction de flashes d'intensités différentes (-1 ; -0,7 ; -0,5 ; -0,3 ; 0,0 ; 0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 log cd.s.m⁻²).

3.1.6 Calcul du pourcentage de l'intégrité et de la fonction des photorécepteurs chez les souris

Le pourcentage de perte de l'intégrité et de la fonction des photorécepteurs issues des résultats ERG et histologiques obtenus a été calculé en suivant les équations suivantes :

$$\% \text{ d'intégrité des photorécepteurs} : \frac{\frac{INL}{ONL} \text{ de la souris traitée} \times 100}{\frac{INL}{ONL} \text{ de la souris DA}}$$

$$\% \text{ d'activité des photorécepteurs} : \frac{\text{amplitude de l'onde a ou b} \times 100}{\text{amplitude l'onde a ou b de la souris DA}}$$

3.1.7 statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 5.0. L'ANOVA à sens unique a été utilisée pour comparer plus de deux échantillons. L'ajustement multicomparaison de Bonferroni a été utilisé comme test post hoc pour calculer les niveaux de signification. Une valeur p de <0,05 a été considérée comme significative.

3.2 Résultats et discussion

L'objectif de cette étude *in vivo* était d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la formulation M-Q-IP-DHA sur la maladie de Stargardt avec des souris ABCA4KO. La régénération du pigment visuel (opsine + 11cRAL) a été obtenue en maintenant les souris dans l'obscurité pendant 24 heures avant l'induction de la dégénérescence rétinienne par un stress lumineux (lumière blanche intense (20 000 Lux) pendant 90 minutes). Les effets de la formulation M-Q-IP-DHA

(30mg/kg) et de l'EMX (5mg/kg), utilisé comme contrôle positif, ont été évalués par injection IV sur les souris 15min avant l'induction de la dégénérescence rétinienne. La dégénérescence des photorécepteurs de la rétine induite par la lumière est une méthode couramment utilisée pour étudier les traitements potentiels de la maladie de Stargardt ou de DMLA atrophique [1]. Après l'exposition, les souris sont gardées 5 jours dans l'obscurité puis l'état de la rétine est évalué par analyse fonctionnelle (ERG) et analyse de l'intégrité (SD-OCT) (**figure 51**).

3.2.1 Evaluation de l'efficacité des M-Q-IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse SD-OCT

La SD-OCT permet de photographier les différentes couches de la rétine, notamment la couche nucléaire externe (ONL) qui contient les photorécepteurs et la couche nucléaire interne qui contient les cellules amacrines, horizontales et bipolaires [2].

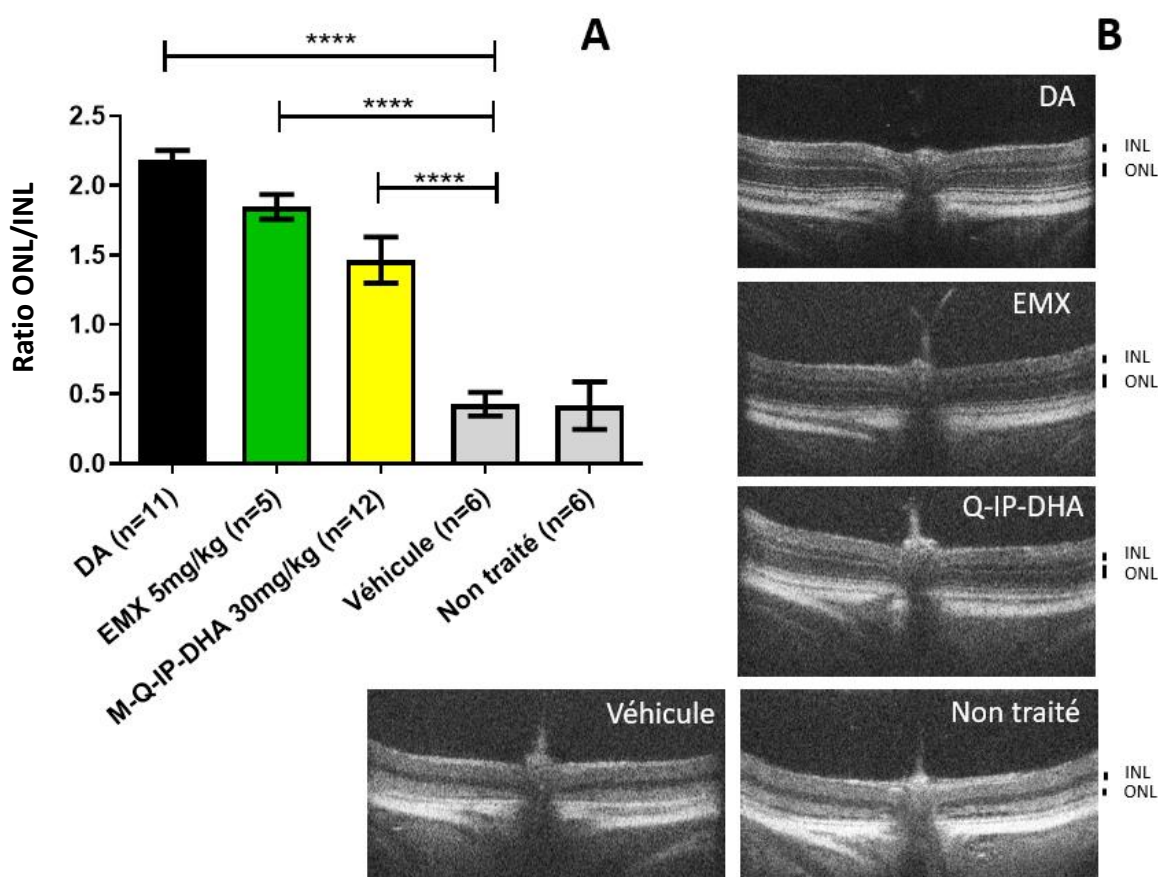


Figure 52 : Ratio des couches ONL/INL (A) et images SD-OCT (B) avec différents prétraitements des souris ABCA4KO suivi d'une induction de la dégénérescence rétinienne par un stress lumineux aigu. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM avec analyse statistique : ANOVA à sens unique avec test de multi-comparaison de Tukey : **** p < 0.0001

La dégénérescence et la mort cellulaire des photorécepteurs sont indiquées par une diminution de l'épaisseur de la couche ONL. La couche INL reste intacte. L'analyse SD-OCT nous permet de visualiser la mort de ces photorécepteurs en calculant le rapport ONL/INL avec le logiciel ImageJ. Le rapport des couches ONL/INL mesuré chez les souris avec les différentes injections IV de Q-IP-DHA est présenté dans la **Figure 52**.

Tableau 34 : Résultats de l'épaisseur des couches ONL/INL issues de l'analyse histologique en pourcentage

	% de l'épaisseur de la couche ONL/INL restants / DA	% gain (ONL/INL) / véhicule
DA	100	NA
EMX 5mg/kg	84	64
M-Q-IP-DHA 30mg/kg	67	47
Véhicule	20	0
Non traité	19	NA

Le rapport des couches ONL/INL mesuré chez les souris (**figure 52**) nous permet de quantifier la dégénérescence des photorécepteurs. Les souris qui sont restées dans l'obscurité (DA) n'ayant pas subi de dégénérescence des photorécepteurs (100% de photorécepteurs) sont utilisées comme référence positive. Les souris traitées par EMX (5mg/kg) ont été utilisées comme contrôle positif car l'EMX est une molécule connue pour protéger les photorécepteurs de la dégénérescence induite par la lumière sur des souris [3] mais elle induit également des effets indésirables en inhibant le cycle visuel et n'a pas montré d'effets bénéfiques lors d'un essai clinique randomisé [4]. Les souris injectées avec le véhicule (Kolliphor® HS 15/solution saline 0,9%) ou non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif.

Les résultats montrent que les souris utilisées comme témoins négatifs perdent 80 % et 81 % (véhicule/non traité vs DA) de leurs photorécepteurs après induction d'un stress lumineux. Le véhicule seul ne présente aucun effet protecteur contre la dégénérescence induite par la lumière. Les souris traitées avec l'EMX et les M-Q-IP-DHA ont montré une protection significative des photorécepteurs avec un maintien de l'intégrité respectivement de +64% et +47% (différence significative) par rapport aux souris traitées avec le véhicule (EMX/Q-IP-DHA

vs Véhicule). Avec le traitement EMX 84% de la couche ONL est maintenue et 67% avec le traitement M-Q-IP-DHA à 30mg/kg.

3.2.2 Evaluation de l'efficacité des M-Q-IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse ERG

L'activité électrique de la rétine a été déterminée par une analyse ERG.

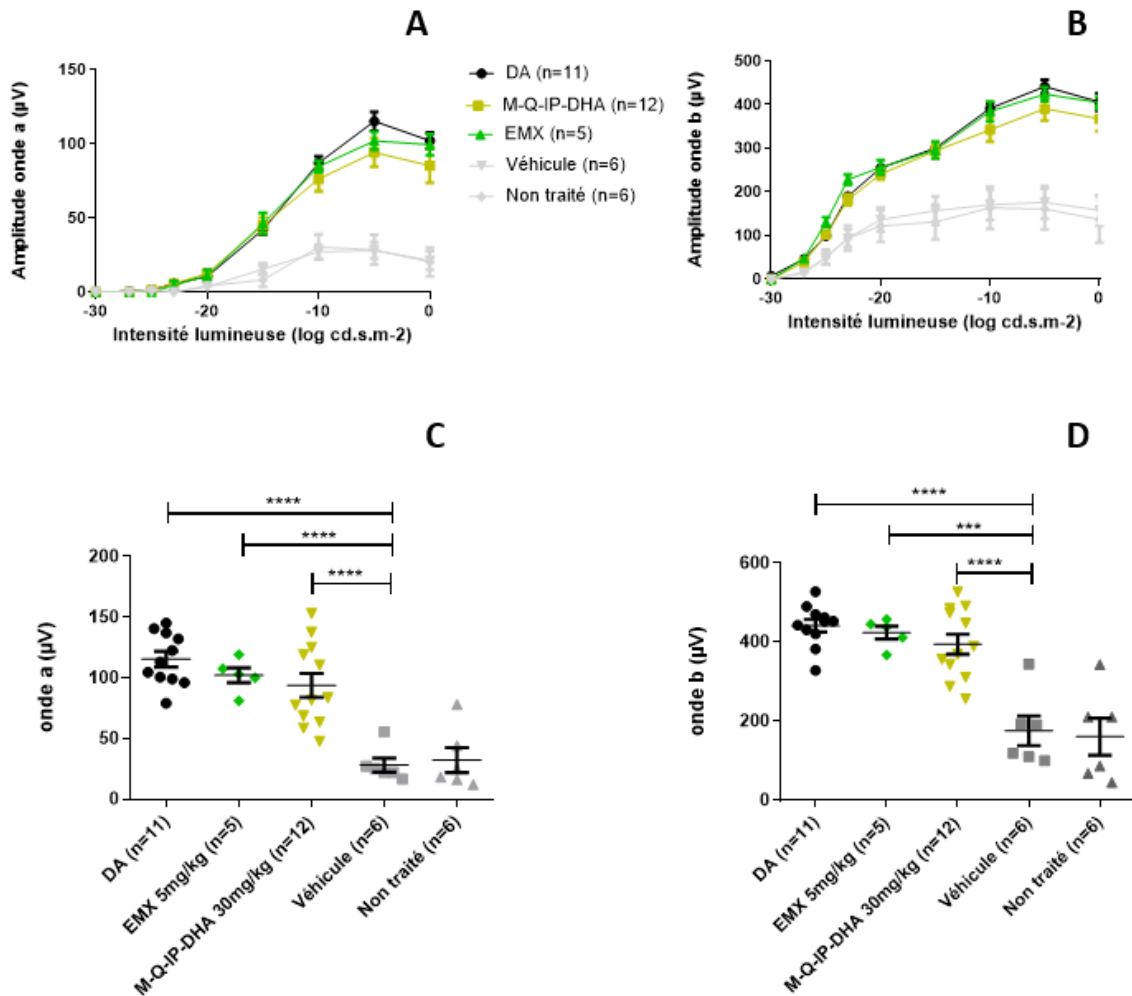


Figure 53 : Courbes de sensibilité rétinienne représentant l'évolution des amplitudes des ondes « a » (A) et « b » (B) en fonction de l'intensité lumineuse et des amplitudes maximales des ondes a (C) et b (D) des souris ABCA4KO après administration orale de divers prétraitements suivie d'une induction de la dégénérescence rétinienne par un stress lumineux aigu. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM avec analyse statistique : ANOVA à sens unique avec test de multi-comparaison de Tukey : *** p < 0,001, **** p < 0,0001

L'onde a correspond à la réponse des photorécepteurs et l'onde b correspond à la transmission du signal entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires [5]. La réponse de l'onde b est dépendante de la réponse de l'onde a. L'amplitude des ondes a et b à différentes intensités lumineuses est représentée dans la **figure 53A et 53B** et le maximum des amplitudes a et b est représenté dans la **figure 53C et 53D**. Cette étude nous permet de déterminer si les photorécepteurs sont encore fonctionnels après l'induction de leur dégénérescence. Les souris DA n'ayant pas été exposées à la lumière sont prises comme contrôle positif avec une activité photoréceptrice de 100%.

Tableau 35 : Résultats de l'amplitude de l'onde a et b issues de l'analyse ERG en pourcentage

	% de l'amplitude de l'onde a / DA	% de l'amplitude de l'onde b / DA	% gain (onde a) / véhicule	% gain (onde b) / véhicule
DA	100	100	NA	NA
EMX 5mg/kg	88	96	64	56
M-Q-IP-DHA 30mg/kg	81	89	57	49
Véhicule	24	40	0	0
Non traité	28	36	NA	NA

Comme pour l'étude SD-OCT précédente, les souris injectées avec le véhicule ou non traitées ont perdu respectivement 76 et 72% de leur maximum d'intensité pour l'onde a et 60 et 64% pour l'onde b (**figure 53C, D**) par rapport aux souris DA (non soumises à la dégénérescence induite par la lumière) (DA vs véhicule/non traité). Les souris qui ont été traitées avec l'EMX (5mg/kg) et les M-Q-IP-DHA (30mg/kg) ont montré une amélioration significative de l'intensité maximale observée respectivement de +64% et +57% avec l'onde a et +56% et +49% avec l'onde b, par rapport au véhicule (véhicule vs EMX/M-Q-IP-DHA).

Les résultats obtenus avec l'ERG confirmant ceux de l'OCT, la formulation M-Q-IP-DHA administrée par voie IV à 30mg/kg protège significativement l'intégrité des photorécepteurs avec maintien de l'activité après induction d'un stress lumineux aigu. En comparaison avec l'EMX, la formulation M-Q-IP-DHA a été administrée à une dose 6 fois plus élevée et a montré une efficacité de protection plus faible. Cependant, la Q-IP-DHA est une molécule qui part son mécanisme d'action et sa nature chimique devrait engendrer peu ou pas de toxicité sur le

cycle visuel comme cela a été mis en évidence avec son analogue l'IP-DHA, basé sur la même structure chimique (phénol + DHA + isopropyle)[6] contrairement à l'EMX.

Il est à noter que cette étude confirme des résultats obtenus sur des souris ABCA4KO qui ont montré avec la quercétine et la Myricetin (molécules flavonoïdes) administrées par injection intrapéritonéale (IP) à 20mg/kg 30min avant l'induction de la dégénérescence des photorécepteurs par une lumière blanche intense (10 000lux pendant 45min) une prévention de la dégénérescence des photorécepteurs après analyse fonctionnelle et morphologique [1]. Dans une autre étude, deux dérivés de Tempol (antioxydant) ont été administrés à 100mg/kg par voie IP, sur des rats albinos, 30min avant d'induire des dommages rétiniens à l'aide d'une lumière blanche (6 heures à 2700lux) et ont permis de protéger les photorécepteurs [7]. Ces résultats sont intéressants mais non comparables avec les nôtres car les conditions expérimentales ne sont pas identiques.

De plus, ces deux études ont été réalisées par administration IP car, comme nous l'avons vu, les actifs lipophiles sont difficiles à solubiliser. Cependant, l'administration de médicaments par voie IP présente des inconvénients car les actifs peuvent reprécipiter dans le péritoine ou sont soumis à un effet de premier passage hépatique presque similaire à celui de l'administration orale [8] qui peut diminuer la biodisponibilité du médicament administré [9]. Dans notre étude, nous avons réussi à développer des formulations pour la voie IV afin d'évaluer leur efficacité pour le nouveau dérivé de notre molécule LEAD. La Q-IP-DHA est donc la seconde molécule lipophénolique à obtenir une preuve de concept de son efficacité *in vivo* après son administration par voie IV chez la souris ABCA4KO. Ces résultats confirment l'intérêt de ce lipophénol.

3.2.3 Comparaison de l'efficacité de l'IP-DHA sous solution micellaire et complexé à la BSA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse ERG

La solution micellaire (Kolliphor® HS 15/solution saline 0,9%) ayant permis d'établir la capacité de protection de la Q-IP-DHA sur les souris ABCA4KO a aussi été utilisée pour formuler l'IP-DHA. Dans une étude précédente, l'IP-DHA avait été complexé à la BSA pour pouvoir être administré par voie IV car elle possède des sites de fixation aux acides gras polyinsaturés

comme le DHA. Les deux formulations ont été administrées à dose égale afin de pouvoir évaluer l'impact de la formulation sur la capacité de l'IP-DHA à protéger les photorécepteurs. L'état de la rétine a ensuite été analysé uniquement par ERG, l'OCT n'étant pas fonctionnel au moment des expérimentations.

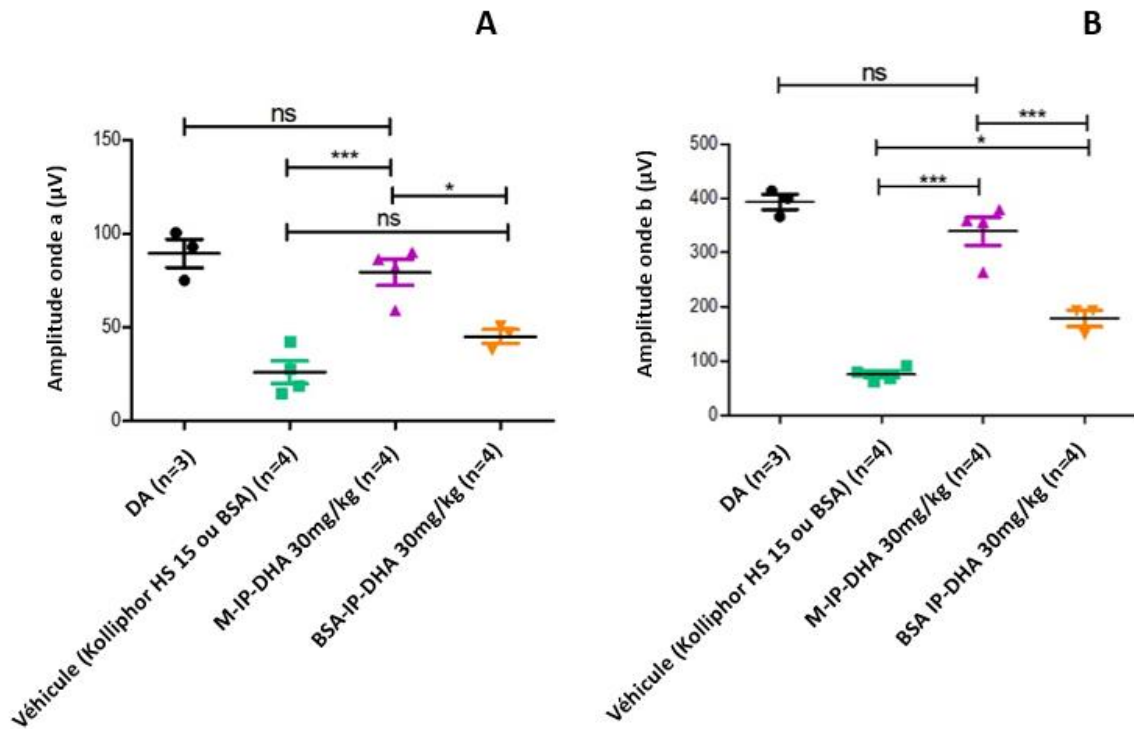


Figure 54 : Amplitudes maximales de l'onde a (A) et b (B) des souris ABCA4KO après administration IV de l'IP-DHA formulé dans les micelles ou avec la BSA, des véhicules (BSA seul et micelle seul) et induction de la dégénérescence rétinienne par un stress lumineux aigu. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM avec analyse statistique : ANOVA à sens unique avec test de multi-comparaison de Tukey : *** p < 0,001, ,

Tableau 36 : Résultats de l'amplitude de l'onde a et b issues de l'analyse ERG en pourcentage

	% de l'amplitude de l'onde a / DA	% de l'amplitude de l'onde b / DA	% gain (onde a) / véhicule	% gain (onde b) / véhicule
DA	100	100	NA	NA
M-IP-DHA 30mg/kg	94	89	63	69
BSA-IP-DHA 30mg/kg	57	41	26	21
Véhicule	31	20	0	0

Le prétraitement avec l'IP-DHA à 30mg/kg complexé avec la BSA permet d'améliorer de +26% dans les conditions réalisées ce jour-là sur l'amplitude maximale de l'onde a en comparaison

des souris administrées avec les véhicules (différence non significative) (**figure 54A**). Pour l'amplitude maximale de l'onde b, un gain d'amplitude de +21% est mesuré avec l'IP-DHA complexé avec la BSA vs véhicule (différence significative) (**figure 54B**). Avec l'IP-DHA à 30mg/kg sous solution micellaire, un gain d'amplitude respectivement de +63% et de +69% pour l'onde a et b est mesuré en comparaison avec les véhicules (différence significative).

Entre les deux traitements d'IP-DHA (BSA vs micelles), la solution micellaire permet donc une meilleure protection avec une amélioration de +36% pour l'amplitude de l'onde a et de +44% pour l'amplitude de l'onde b. Ces résultats montrent l'importance du choix de la formulation sur l'efficacité d'un actif ; la formulation micellaire permettrait de diminuer la dégradation dans le sang en limitant les interactions entre l'IP-DHA et les protéines sanguines et en étant pas reconnu par les macrophages (chapitre 5, partie 1.3.1). La formulation micellaire pourrait également permettre d'améliorer son passage à travers la BHR jusqu'à la rétine.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons démontré que la Q-IP-DHA formulée dans des micelles et administrée par voie IV à une dose de 30mg/Kg permet de protéger partiellement la fonction et l'intégrité des photorécepteurs des souris ABCA4KO (modèle de la maladie de Stargardt) après induction de la dégénérescence des photorécepteurs. Nous avons également démontré que la formulation micellaire permettait d'augmenter l'efficacité de l'IP-DHA (molécule LEAD) par rapport à la formulation initialement développée de l'IP-DHA complexé avec la BSA.

L'IP-DHA et la Q-IP-DHA présentent donc un effet de protection des photorécepteurs des souris après une administration IV à une dose de 30mg/kg. Ceci constitue une preuve de concept pour poursuivre leur évaluation. Nous devons maintenant déterminer l'efficacité de ces composés par voie orale avec de nouvelles formulations pour avoir une voie d'administration plus adaptée à un traitement chronique.

IV. Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA par voie orale avec un modèle aigu de dégénérescence des photorécepteurs

4.1 Matériel & Méthodes

4.1.1 Animaux

Les souris ABCA4KO ont été utilisées pour évaluer l'efficacité de l'IP-DHA et les souris BALB/c ont été utilisées pour évaluer l'efficacité de la Q-IP-DHA. Les souris BALB/c ont été utilisées suite aux problèmes d'induction de la dégénérescence de la rétine des souris ABCA4KO. Les souris BALB/c âgées de 8 semaines ont été fournies par Charles River.

4.1.2 Administration par voie orale

Des souris âgées de 8 à 16 semaines (des deux sexes), ont été pesées afin d'ajuster la quantité de Q-IP-DHA administrée par voie orale pour une dose à 100, 75 et 50mg/kg et d'IP-DHA pour une dose de 17, 50 et 100mg/kg. Les souris ont été gavées 1h avant l'induction de la dégénérescence des photorécepteurs avec une sonde de gavage de calibre 22. Les différentes formulations administrées ont été les suivantes :

- LNC-Q-IP-DHA à 7mg/mL
- Solution de Q-IP-DHA solubilisée dans le Labrafac® à 10mg/mL
- Solution d'IP-DHA dispersée dans l'huile de soja à 20mg/mL
- SNEDDS-IP-DHA à 30mg/kg
- Véhicules : LNC vide, Labrafac®, SNEDDS vide et huile de soja

4.1.3 Induction de la dégénérescence des photorécepteurs par un stress lumineux aigu sur des souris BALB/c et ABCA4KO

La dégénérescence induite par la lumière a été effectuée de la même manière que pour l'évaluation IV décrite dans le chapitre 5, partie 2.1.3

4.1.4 Analyse histologique

Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Rapidement, les yeux ont été énucléés et fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 24h à 4°C. Les yeux ont été inclus dans de la paraffine et coupés en sections sagittales de 5µm. Pour la coloration hématoxyline/éosine/saffron (HES), les sections ont été déparaffinées, marquées avec HES selon les protocoles standard, rincées et montées dans du Moeviol. L'épaisseur de la couche nucléaire interne (INL) et de la couche nucléaire externe (ONL) a été mesurée et exprimée en unités arbitraires à l'aide du logiciel ImageJ.

4.1.5 Electrorétinographie (ERG)

L'analyse de l'activité de la rétine des souris BALB/C a été réalisée de la même manière que pour l'évaluation par voie IV décrite dans le chapitre 6, partie 3.1.5

4.1.6 Calcul du pourcentage de l'intégrité et de la fonction des photorécepteurs restant chez les souris

Le calcul des pourcentages des couches ONL/INL et de l'amplitude des ondes a et b issues des analyses histologiques et d'erg est décrit dans le chapitre 6, partie 3.1.6

4.1.7 Statistiques

L'analyse statistique est identique à celle réalisée pour la voie IV décrite dans le chapitre 6 partie 2.1.6

4.2 Résultats et discussion

Comme pour la voie IV, nous avons utilisé des souris ABCA4KO, modèles animaux de la maladie de Stargardt, pour l'évaluation par voie orale de l'efficacité de l'IP-DHA. L'évaluation de l'efficacité de la Q-IP-DHA par voie orale se fait sur un modèle de souris différent : les BALB/c. L'utilisation des souris BALB/c n'était pas prévu. En effet, nous avons remarqué au cours des expériences que le stress lumineux aigu n'induisait plus suffisamment la dégénérescence des photorécepteurs sur les différentes générations successives issues de la lignée de souris ABCA4KO. Ceci a rendu la lignée obsolète pour évaluer l'efficacité des composés. Nous avons donc choisi une lignée alternative comme modèle : les souris BALB/c, modèle couramment

utilisé pour étudier les traitements potentiels de la DMLA atrophique [10]. Les souris BALB/c ne portent pas de délétion du gène *Abca4* et sont par conséquent plus représentatives de la DMLA que de la maladie de Stargardt. Cette étude nous permet de vérifier l'efficacité de cette molécule sur un modèle animal de DMLA.

Dans les 2 cas, les souris ont été maintenues dans l'obscurité pendant 24h avant l'induction de la dégénérescence rétinienne (lumière blanche intense, 20 000 Lux) pendant 90 minutes afin de régénérer le pigment visuel (opsine + 11cRAL). L'état de la rétine a été évalué 5 jours après l'exposition, **avec une analyse fonctionnelle par ERG et une analyse de l'intégrité par histologie**. Les souris ont été maintenues dans l'obscurité pendant ces 5 jours. Les effets des différentes formulations d'IP-DHA, solubilisé dans l'huile de soja (100 mg/kg), des SNEDDS-IP-DHA (17, 50 et 100 mg/kg) et de la Q-IP-DHA solubilisée dans le Labrafac® (50 et 100mg/kg) ou dans des LNC-Q-IP-DHA (50, 75 et 100mg/kg) ont été évalués en gavant les souris 60 minutes avant l'exposition à la lumière. L'analyse histologique a été substituée à l'analyse OCT précédemment réalisée par voie IV en raison d'une panne sur l'OCT. En temps normal, l'analyse OCT est privilégiée car il s'agit d'une analyse non invasive qui permet de ne pas sacrifier l'animal contrairement à l'analyse histologique.

4.2.1 Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse ERG

L'activité électrique de la rétine a été déterminée par une analyse ERG. Les souris qui ont été gavées avec les véhicules (huile de soja et SNEDDS) n'ont pas été protégées contre la dégénérescence induite par la lumière, et ont perdu respectivement 76 et 63% de leur activité (DA vs huile de soja/SNEDDS), (**figure 55C**). L'IP-DHA solubilisé dans l'huile de soja et administré à 100 mg/kg n'a pas montré de protection significative par rapport au véhicule (42 vs 24% pour l'onde a et 39 vs 35% pour l'onde b). La protection conférée par les SNEDDS-IP-DHA était proportionnelle à la dose ; Les SNEDDS-IP-DHA à 17 mg/kg ont semblé protéger légèrement mieux que les véhicules (différence non significative). À 50 mg/kg, nous avons observé une légère protection par rapport au véhicule SNEDDS pour l'onde a (55 contre 37% des photorécepteurs restants, différence non significative) et pour l'onde b (62 contre 38% des photorécepteurs restants, différence significative). A 100 mg/kg, cette protection a

augmenté pour les ondes a et b, à 76 et 82% (**tableau 37**) soit un gain d'amplitude pour l'onde a et b respectivement de +39 et +44%. Il est intéressant de noter que par voie IV dans des conditions expérimentales similaires, la formulation d'IP-DHA associée à de la BSA, injectée à 30 mg/kg, a induit un degré de protection similaire (80-85%). Pour finir à dose égale (100mg/kg), l'IP-DHA formulé avec les SNEDDS améliore l'amplitude de l'onde a et b respectivement de +21 et +40% en comparaison avec l'administration de l'IP-DHA solubilisé dans l'huile de soja.

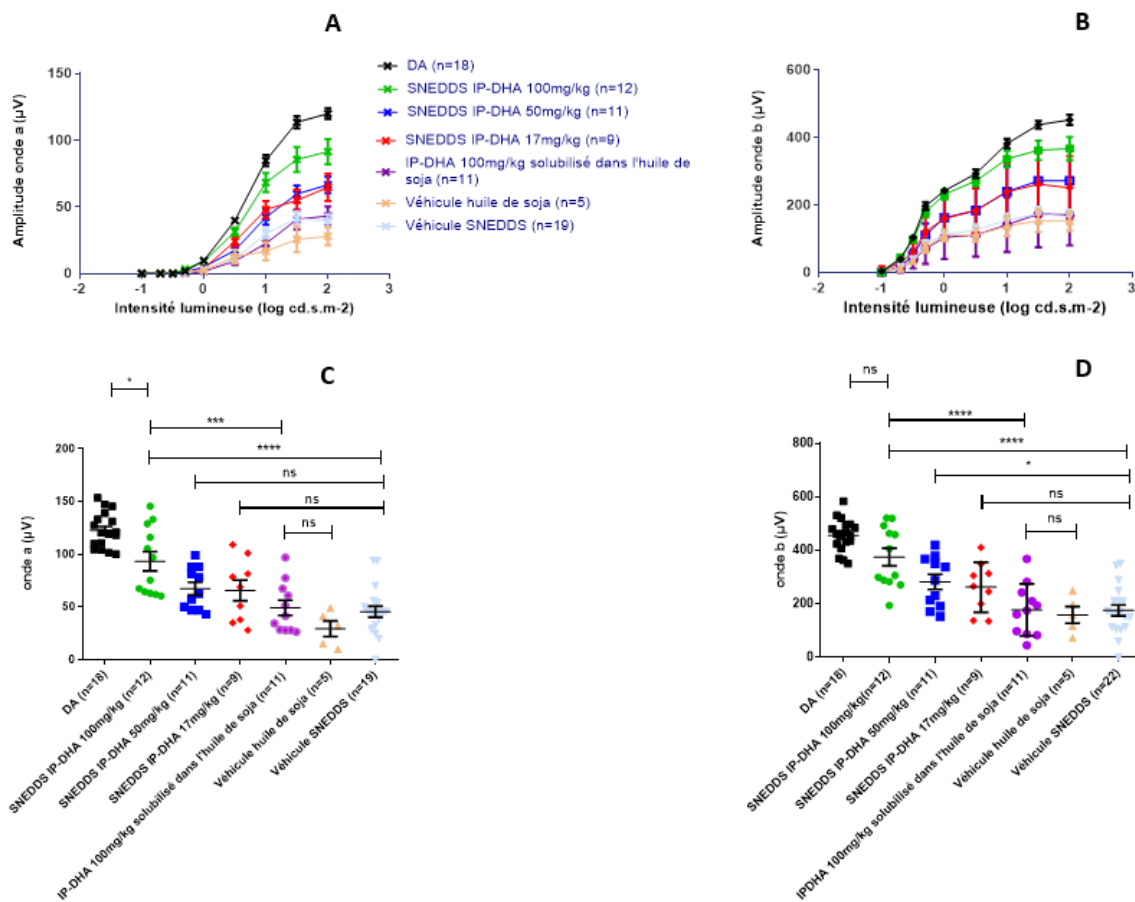


Figure 55 : Courbes de sensibilité rétinienne représentant l'évolution des amplitudes des ondes a (A) et b (B) en fonction de l'intensité lumineuse et des amplitudes maximales des ondes a (C) et b (D) des souris ABCA4KO après administration orale de divers prétraitements et dégénérescence rétinienne induite par un stress lumineux aigu. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM avec analyse statistique : ANOVA à sens unique avec test de multi-comparaison de Tukey : *** p < 0,001, **** p < 0,0001, * p < 0,1, ns : non significatif

Tableau 37 : Résultats de l'amplitude de l'onde a et b issues de l'analyse ERG en pourcentage

	% de l'amplitude de l'onde a / DA	% de l'amplitude de l'onde b / DA	% gain (onde a) / véhicule	% gain (onde b) / véhicule
DA	100	100	NA	NA
SNEDDS-IP-DHA 100mg/kg	76	82	39	44
SNEDDS-IP-DHA 50mg/kg	55	62	18	24
SNEDDS-IP-DHA 17mg/kg	54	57	17	19
IP-DHA à 100mg/kg dans l'huile de soja	42	39	18	4
Véhicule SNEDDS	37	38	0	0
Véhicule huile de soja	24	35	0	0

4.2.2 Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse histologique

Pour compléter l'évaluation de l'ERG, nous avons réalisé une étude histologique. En effet, l'analyse histologique est considérée comme une analyse anatomique. Ainsi, nous l'avons utilisée pour déterminer l'épaisseur des couches nucléaires interne (INL) et externe (ONL) de la rétine. Nous avons montré que les SNEDDS-IP-DHA à 100mg/kg protégeaient efficacement l'activité des photorécepteurs chez les souris ABCA4KO. Avec cette analyse histologique, nous avons voulu évaluer la structure des couches ONL et INL. Les résultats ont été similaires à ceux observés avec l'analyse ERG (**figure 56 et tableau 38**). Les souris DA présentaient un rapport ONL/INL de 2,2 : la couche ONL était environ deux fois plus épaisse que la couche INL chez les souris non exposées à la lumière. Les véhicules (huile de soja et SNEDDS) et l'IP-DHA solubilisé dans l'huile de soja à 100mg/kg n'ont montré aucun effet protecteur et ont présenté des rapports ONL/INL respectivement de 0,6 ; 0,7 et 0,7. L'effet dose-réponse avec les souris traitées par SNEDDS-IP-DHA est dose dépendant et similaire à celui obtenu avec l'analyse ERG. Une légère amélioration de la préservation de l'épaisseur de la couche ONL chez les souris traitées par 17 et 50mg/kg a été observée en comparaison avec les véhicules, mais aucune différence significative n'a été observée. L'effet protecteur a été observé à la dose de 100mg/kg avec les SNEDDS-IP-DHA (rapport ONL/INL : 1,6) ; soit une conservation de l'épaisseur de la couche de 73% donc une amélioration de la protection de +39% en comparaison avec le véhicule. Cette protection était légèrement inférieure à celle obtenue

par voie IV à une dose plus faible de 30mg/kg. A 100mg/kg, l'IP-DHA formulé avec les SNEDDS améliore la conservation de l'épaisseur de la couche ONL respectivement de +40% en comparaison avec l'administration de l'IP-DHA solubilisé dans l'huile de soja.

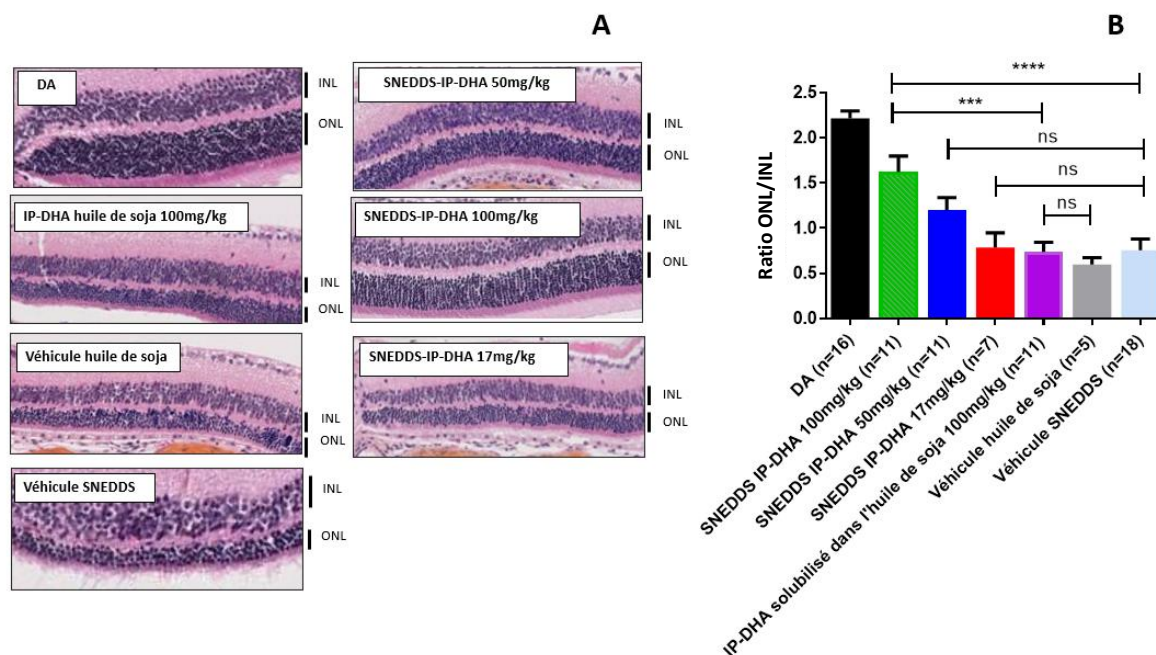


Figure 56 : Images de l'analyse histologique des souris ABCA4KO avec différents prétraitements après la dégénérescence rétinienne induite par le stress aigu de la lumière blanche (A) et rapport de l'épaisseur de l'ONL/INL de cette analyse histologique (B). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM avec analyse statistique : ANOVA à sens unique avec test de multi-comparaison de Tukey : *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Tableau 17 : Résultats de l'épaisseur des couches ONL/INL issues de l'analyse histologique en pourcentage

	% de l'épaisseur de la couche ONL/INL restants / DA	% gain (ONL/INL) / véhicule
DA	100	NA
SNEDDS-IP-DHA 100mg/kg	73	39
SNEDDS-IP-DHA 50mg/kg	54	20
SNEDDS-IP-DHA 17mg/kg	36	2
IP-DHA à 100mg/kg dans l'huile de soja	33	6
Véhicule SNEDDS	34	0
Véhicule huile de soja	27	0

La corrélation observée entre les résultats histologiques et les analyses ERG a révélé que l'IP-DHA avait un effet protecteur sur l'intégrité et la fonctionnalité des photorécepteurs après l'induction d'un stress lumineux aigu par la lumière blanche dans un modèle murin de la maladie de Stargardt. Cet effet protecteur a été observé après administration orale avec une formulation SNEDDS. À la même dose d'IP-DHA (100mg/kg), nous avons observé une différence majeure dans l'effet protecteur avec (SNEDDS) par rapport à celui avec huile de soja ; la formulation SNEDDS a permis une augmentation significative de la biodisponibilité de la molécule et, par conséquent, une augmentation de la quantité de molécule active atteignant les photorécepteurs. Les véhicules SNEDDS n'ont pas montré d'effets protecteurs et n'ont donc pas été impliqués dans l'effet de protecteur observé.

Des études antérieures ont démontré l'efficacité de divers composés *in vivo* administrés par voie orale dans un modèle de dégénérescence rétinienne aiguë induite par la lumière. L'astaxantine, un puissant antioxydant de la famille des caroténoïdes, dissout dans l'huile d'olive et administré par voie orale à 100mg/kg à des souris préserve partiellement les photorécepteurs suite à l'induction de la dégénérescence rétinienne par la lumière blanche (3h à 8000 Lux) [11]. Cette étude est intéressante car elle montre qu'avec une simple solution huileuse, l'administration par voie orale d'un puissant antioxydant lipophile permet d'obtenir une efficacité chez l'animal. Dans un autre travail, la NSP-116, piègeur de radicaux libres, en suspension dans l'eau avec 0,5% de carboxyméthylcellulose sodique (CMC) a été administrée par voie orale à 30mg/kg à des souris 30 minutes avant l'induction de la dégénérescence rétinienne par la lumière blanche (8000 Lux pendant 3 h). Malgré l'étude PK qui a montré une quantité plutôt faible de NSP-166 dans le plasma (C_{max} = 7ng/mL pour une dose administrée de 25mg/kg), elle a été efficace pour protéger les photorécepteurs des souris [12]. Dans notre étude, nous avons démontré l'importance de la formulation SNEDDS pour améliorer l'efficacité de l'IP-DHA (**Figures 55 et 56**) ; une formulation plus adaptée de l'astaxantine et de la NSP-116 pourrait potentiellement augmenter leur biodisponibilité et donc leur activité.

4.2.3 Evaluation de l'efficacité de la Q-IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse ERG

L'activité électrique de la rétine a été déterminée par une analyse ERG (**figure 57 et tableau 39**). Solubilisé dans le Labrafac® à une dose de 50mg/kg la Q-IP-DHA administrée par voie orale a permis d'améliorer légèrement l'amplitude de l'onde a de +17% et l'amplitude de l'onde b de +12% en comparaison avec le véhicule Labrafac® seul, (différence non significative). A une dose de 100mg/kg, les gains en amplitude de l'onde a et b ont augmentés de +45% toujours en comparaison avec le véhicule Labrafac® seul (différence significative). Pour les formulations, les LNC-Q-IP-DHA à 50, 75 et 100mg/kg ont permis d'augmenter l'amplitude de l'onde a respectivement de 25, 64 et 76% et pour l'onde b de 30, 66 et 75% en comparaison avec les LNC vides. A dose égale de Q-IP-DHA, on a observé une amélioration de la protection de la fonction des photorécepteurs après administration des LNC. A 50mg/kg, les LNC-Q-IP-DHA ont permis de conserver respectivement 51 et 62% de l'amplitude de l'onde a et b contre 39 et 40% avec le Labrafac® Q-IP-DHA, soit un gain de 12 et 22% sur la fonction visuelle (différence non significative). Avec les LNC-Q-IP-DHA à 100mg/kg, l'amplitude des ondes a et b était plus importante que celles obtenues avec les souris non exposées à la lumière (contrôle positif (DA)). A cette dose, les LNC-Q-IP-DHA ont permis d'obtenir une amplitude d'onde a et b respectivement de 102 et 107% contre 67 et 73% avec la Q-IP-DHA solubilisée dans le Labrafac®, soit un gain de 35 et 34% sur la fonction visuelle.

Tableau 39 : Résultats de l'amplitude de l'onde a et b issues de l'analyse ERG en pourcentage

	% de l'amplitude de l'onde a / DA	% de l'amplitude de l'onde b / DA	% gain (onde a) / véhicule	% gain (onde b) / véhicule
DA	100	100	NA	NA
LNC-Q-IP-DHA 100mg/kg	102	107	76	75
LNC-Q-IP-DHA 75mg/kg	90	98	64	66
LNC-Q-IP-DHA 50mg/kg	51	62	25	30
Labrafac® Q-IP-DHA 100mg/kg	67	73	45	45
Labrafac® Q-IP-DHA 50mg/kg	39	40	17	12
LNC véhicule	26	32	0	0
Labrafac® véhicule	22	28	0	0

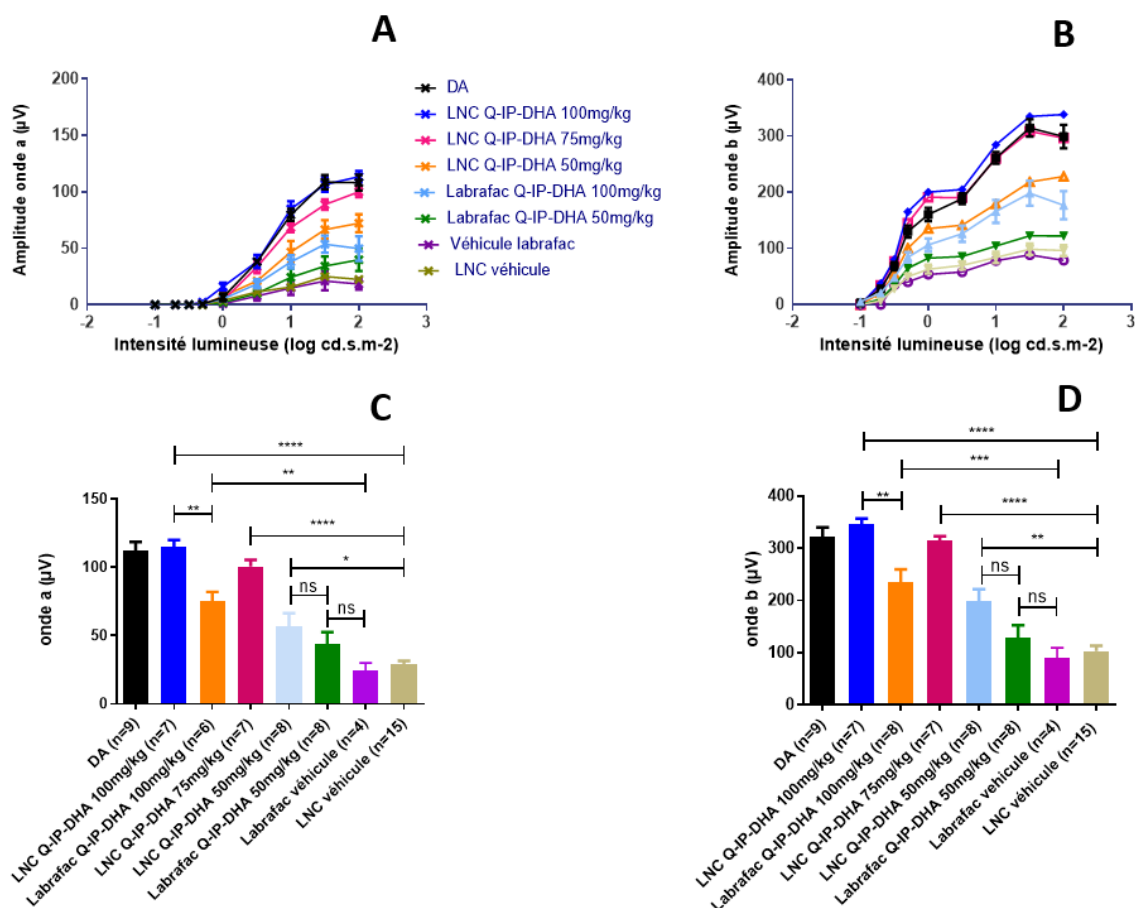


Figure 57 : Courbes de sensibilité rétinienne représentant l'évolution des amplitudes des ondes a (A) et b (B) en fonction de l'intensité lumineuse et des amplitudes maximales des ondes a (C) et b (D) des souris BALB/C après administration orale de divers prétraitements et de l'induction de la dégénérescence rétinienne induite par un stress lumineux aigu. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM avec analyse statistique : ANOVA à sens unique avec test de multi-comparaison de Tukey : *** p < 0,001, **** p < 0,0001, ** p < 0,01, ns : non significatif

4.2.4 Evaluation de l'efficacité de la Q-IP-DHA sur modèle de dégénérescence aigu par analyse histologique

Les coupes histologiques réalisées ainsi que le ratio de l'épaisseur des couches INL et ONL des rétines sont représentés dans la **figure 58**. Comme pour les résultats observés par ERG, la Q-IP-DHA solubilisée dans le Labrafac® et administrée par voie orale à une dose de 50mg/kg a permis d'améliorer de +10% la protection de l'intégrité des photorécepteurs en comparaison avec le véhicule Labrafac® seul (différence non significative). Par contre, à une dose de 100mg/kg, la Q-IP-DHA solubilisée dans le Labrafac® a permis d'améliorer le ratio des épaisseurs des couches ONL/INL de +34% et en comparaison avec le véhicule Labrafac® seul

(différence significative). Dans le cas des LNC-Q-IP-DHA administrées par voie orale à 50, 75 et 100mg/kg, le ratio ONL/INL a augmenté respectivement de 10, 40 et 62% en comparaison avec les LNC vides. A dose égale de LNC-Q-IP-DHA, on a observé une amélioration de la protection de l'intégrité des photorécepteurs A 100mg/kg, le ratio des épaisseurs des couches ONL/INL était de 1,91 avec les LNC-Q-IP-DHA contre 1,25 avec la Q-IP-DHA solubilisé dans le Labrafac® à la même dose, soit un gain de 31% (différence significative).

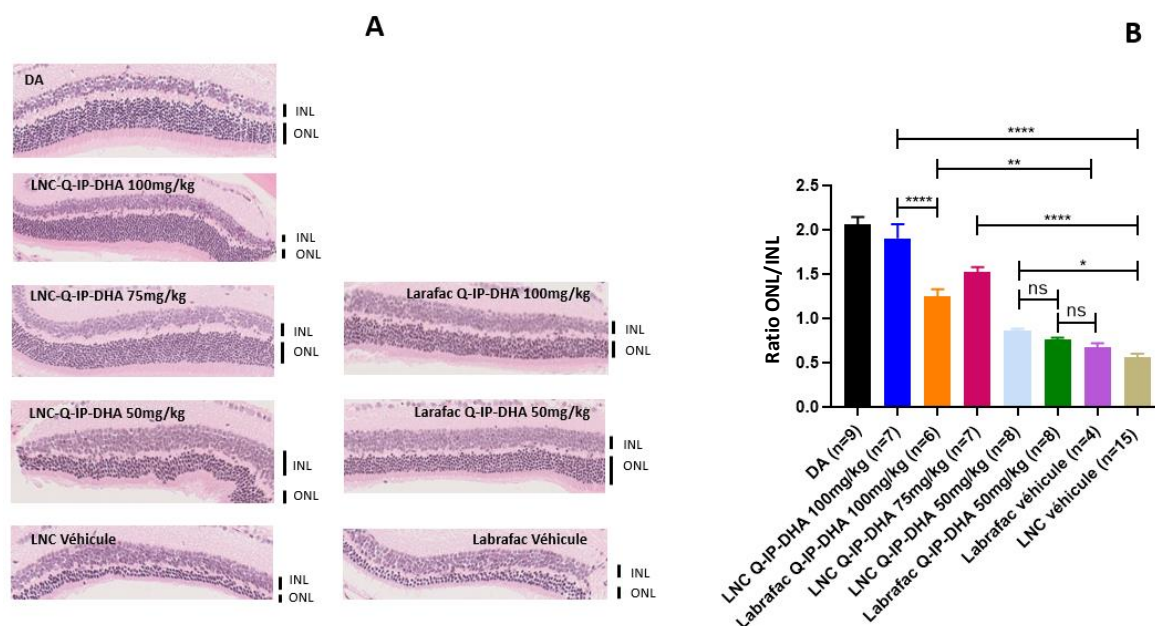


Figure 58 : Coupes histologiques (A) et ratio des couches ONL/INL (B) avec différents prétraitements des souris BALB/c suivi d'une induction par un stress lumineux aigu. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM avec analyse statistique : ANOVA à sens unique avec test de multi-comparaison de Tukey : **** p < 0,0001, ** p < 0,01, * p < 0,1, ns : non significatif

Tableau 40 : Résultats de l'épaisseur des couches ONL/INL issues de l'analyse histologique en pourcentage

	% de l'épaisseur de la couche ONL/INL restants / DA	% gain (ONL/INL) / véhicule
DA	100	NA
LNC-Q-IP-DHA 100mg/kg	92	60
LNC-Q-IP-DHA 75mg/kg	74	42
LNC-Q-IP-DHA 50mg/kg	42	10
Labrafac® Q-IP-DHA 100mg/kg	61	34
Labrafac® Q-IP-DHA 50mg/kg	37	10
LNC véhicule	32	0
Labrafac® véhicule	27	0

Considérant que la Q-IP-DHA est une molécule faiblement perméable à travers les entérocytes, il est surprenant qu'elle soit aussi efficace lorsqu'elle est administrée dans le Labrafac®. Son efficacité soulève plusieurs questions : (i) l'activité est-elle due à la molécule seule, ses métabolites, ou les deux car sa fonction ester pourrait être clivée par les estérases intestinales libérant la molécule quercétine-isopropylée et une molécule de DHA. Ces deux molécules ne devraient pas être absorbées de la même manière que la Q-IP-DHA ; (ii) quelle est la concentration efficace au sein du tissu rétinien ? Si seule la Q-IP-DHA est active pour protéger les photorécepteurs de la dégénérescence induite par la lumière, alors la quantité nécessaire pour protéger les photorécepteurs devrait être de l'ordre du ng/mL compte tenu de la faible perméabilité de la molécule et de sa potentielle dégradation par les estérases sanguines et intestinales. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre le mécanisme d'action de protection de la Q-IP-DHA qui pourrait être médié par l'activation de défenses antioxydantes.

Conclusion

Dans cette étude, les molécules Q-IP-DHA et IP-DHA administrées par voie orale chez la souris ont démontré leur effet de protection de la fonction et de l'intégrité des photorécepteurs après induction de leur dégénérescence induite par la lumière de manière aiguë.

La Q-IP-DHA solubilisée dans le Labrafac® a permis de protéger les photorécepteurs chez la souris BALB/c à une dose de 100mg/kg, la formulation LNC a permis d'améliorer cette protection de manière significative à la même dose. L'IP-DHA solubilisé dans l'huile de soja n'a pas permis de protéger les photorécepteurs des souris ABCA4KO même à 100mg/kg alors qu'avec la formulation SNEDDS, une protection significative a été observée. Dans les deux cas, la formulation LNC et la formulation SNEDDS ont permis d'augmenter respectivement l'efficacité de la Q-IP-DHA et de l'IP-DHA. La Q-IP-DHA semble plus efficace *in vivo* que l'IP-DHA, car à dose égale, en solution huileuse, la Q-IP-DHA permet d'obtenir une protection significative ce qui n'est pas le cas avec l'IP-DHA. De plus, avec les formulations, toujours à dose égale, la Q-IP-DHA permet une protection plus importante que l'IP-DHA. Cependant, nous ne pouvons pas déterminer de manière rigoureuse quelle est la molécule la plus efficace car nous les avons évaluées sur deux modèles animaux différents.

V. Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA sur un modèle de dégénérescence rétinienne chronique induit par un stress lumineux

5.1 Introduction

La dégénérescence induite par la lumière blanche nous a permis de mettre en évidence l'effet protecteur de l'IP-DHA après un seul gavage, et sur une courte période (90 min). Pour travailler dans des conditions plus proches de celles observées dans la DMLA atrophique, nous avons induit la dégénérescence des photorécepteurs de souris, en utilisant une faible intensité lumineuse sur 7 jours avec un cycle d'exposition/non-exposition de 12/12 h et sans dilatation de la pupille. Nous avons utilisé des souris BALB/c qui représentent un modèle de DMLA, sans délétion du gène *Abca4* avec deux lampes différentes : lumière blanche classique et une lumière LED bleue à différentes intensités pour nous permettre de définir les conditions permettant une dégénérescence des photorécepteurs d'environ 60 - 80% sur 1 semaine.

5.2 Matériel & Méthodes

5.2.1 Mise en place d'un modèle de dégénérescence des photorécepteurs de façon chronique

L'impact de la lumière utilisée a été évalué en utilisant deux types de lumière sur plusieurs souris BALB/c : une lumière blanche classique et une lumière LED bleue. Plusieurs intensités de lumière ont été testées : 700 et 1000 Lux pour déterminer l'intensité de lumière optimale pour dégénérer les photorécepteurs de manière significative. Les souris ont été maintenues sous une lumière bleue (lumière LED plein spectre 165w, dimmable, C-Disount) ou blanche à 700 ou 1000 Lux pendant 7 jours avec un cycle lumière/obscurité de 12/12h dans une cage d'élevage. A la fin des 7 jours, les souris ont été placées dans l'obscurité pendant 5 jours avant l'analyse de leur rétine. Tout au long de l'expérience, la température ambiante était de 22°C, identique à celle du box d'élevage, afin d'éviter une augmentation de la température corporelle, qui pourrait endommager davantage la rétine.

5.2.2 Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA, sur modèle de dégénérescence chronique

Les souris ont été maintenues dans une cage d'élevage dans les conditions optimales (section 5.2.1). Les souris gavées avec une dose de 100mg/kg/jour ont été divisées en trois groupes : (i) gavage une fois par jour (1x 100mg/kg) 1h avant l'exposition à la lumière, (ii) gavage deux fois par jour (2x 50mg/kg) 1h avant l'exposition à la lumière et 6h après la première administration, (iii) gavage trois fois par jour (3x 33mg/kg) 1h avant l'exposition à la lumière et 4 et 8h après la première administration. A la fin des 7 jours, les souris sont placées 5 jours dans l'obscurité avant analyse de leur rétine (**figure 59**).

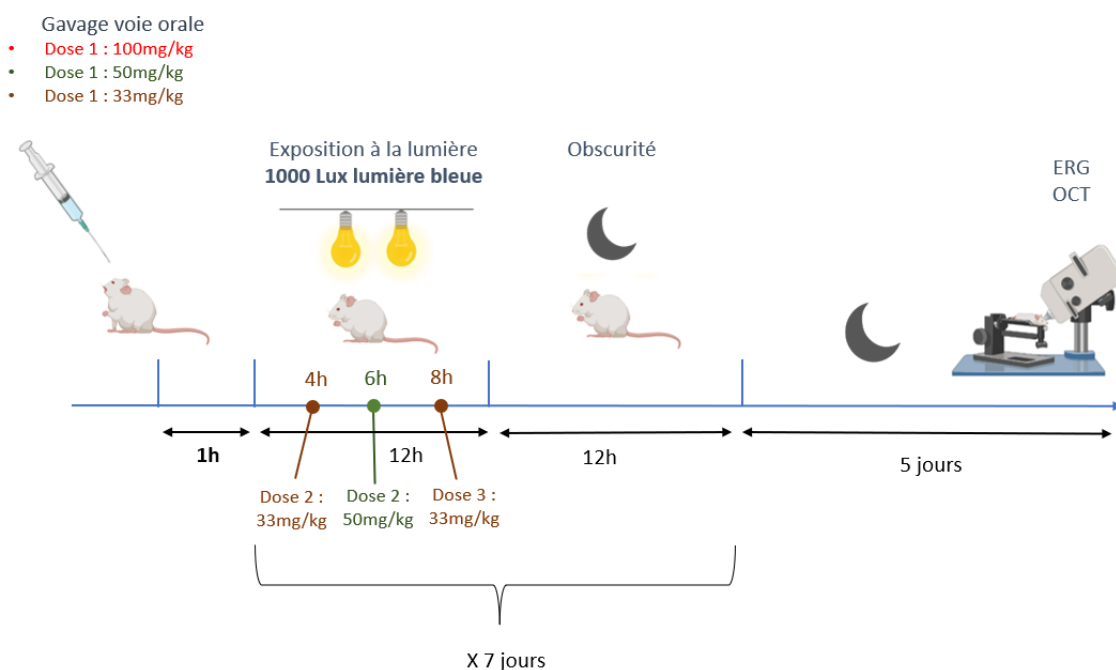


Figure 59 : Protocole d'évaluation de l'efficacité des SNEDDS-IP-DHA sur le modèle de dégénérescence chronique de la rétine mis en place

5.2.3 Analyse de la rétine

L'analyse de la rétine se fait par histologie et ERG, les méthodes ont été respectivement décrites dans le chapitre 6, partie 3.1.5 et 4.1.4

5.1.4 Calcul du pourcentage de l'intégrité et de la des photorécepteurs restant chez les souris

Le calcul des pourcentages des couches ONL/INL et de l'amplitude des ondes a et b issues des analyses histologiques et d'erg est décrit dans le chapitre 6, partie 3.1.6

5.1.5 Statistiques

L'analyse statistique est identique à celle réalisée pour la voie IV décrite dans le chapitre 6 partie 2.1.6

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Mise en place d'un modèle de dégénérescence des photorécepteurs de façon chronique

L'objectif de la mise en place de ce modèle est de se rapprocher des conditions réelles de la physiopathologie en soumettant les souris à une faible intensité lumineuse sur un temps plus long pour obtenir une dégénérescence des photorécepteurs comprise entre 60 et 80% afin d'évaluer l'efficacité des composés. Pour cela, les souris BALB/c ont été soumises à une intensité lumineuse de 1000 Lux (lumière blanche) pendant 1 semaine avec un cycle journalier de 12h d'exposition à la lumière suivi de 12h d'obscurité. L'effet de la lumière blanche à 1000 Lux sur souris a ensuite été évalué (**figure 60**).

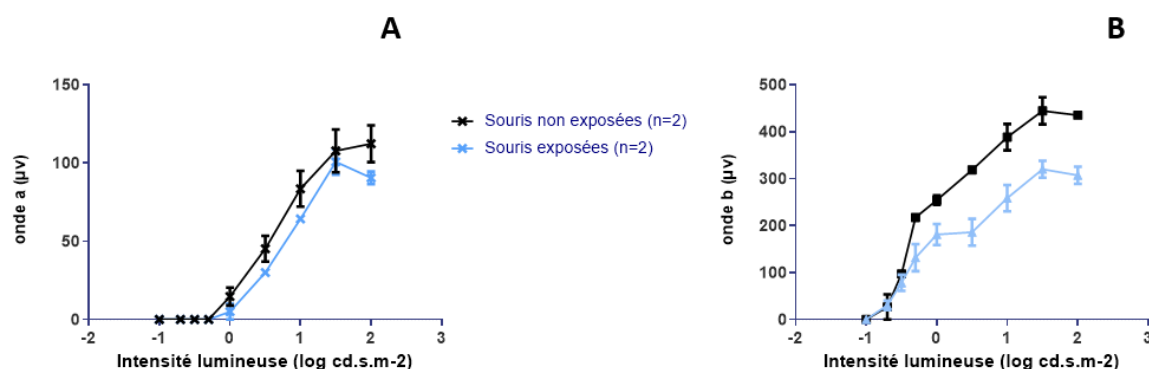


Figure 60 : Analyse de la fonction des photorécepteurs avec la mesure de l'amplitude de l'onde a (A) et de l'onde b (B) par ERG des souris BALB/c soumises à une lumière blanche de 1000Lux pendant 1 semaine avec un cycle de 12h d'exposition à la lumière et de 12h d'obscurité

La lumière blanche à 1000 Lux pendant 1 semaine a permis de diminuer les maxima d'amplitude de -20% pour l'onde a et de -30% pour l'onde b, soit une baisse de seulement -25% en moyenne de l'activité de la rétine. Cette baisse étant trop faible pour obtenir un écart d'amplitude de l'onde a suffisant entre les souris exposées et non exposées à la lumière. Cet écart doit être suffisamment grand pour pouvoir évaluer précisément l'efficacité de l'IP-DHA sur ce modèle. Il nous faut soit augmenter l'intensité lumineuse, soit la durée de l'exposition ou encore changer de lampe.

Nous avons décidé de prendre une lumière LED bleue pour faire dégénérer rapidement les photorécepteurs. Nous avons évalué l'impact de la lumière bleue à 700 (figure 61A et B) et 1000 Lux (figure 61C et D) sur l'activité de la rétine des souris.

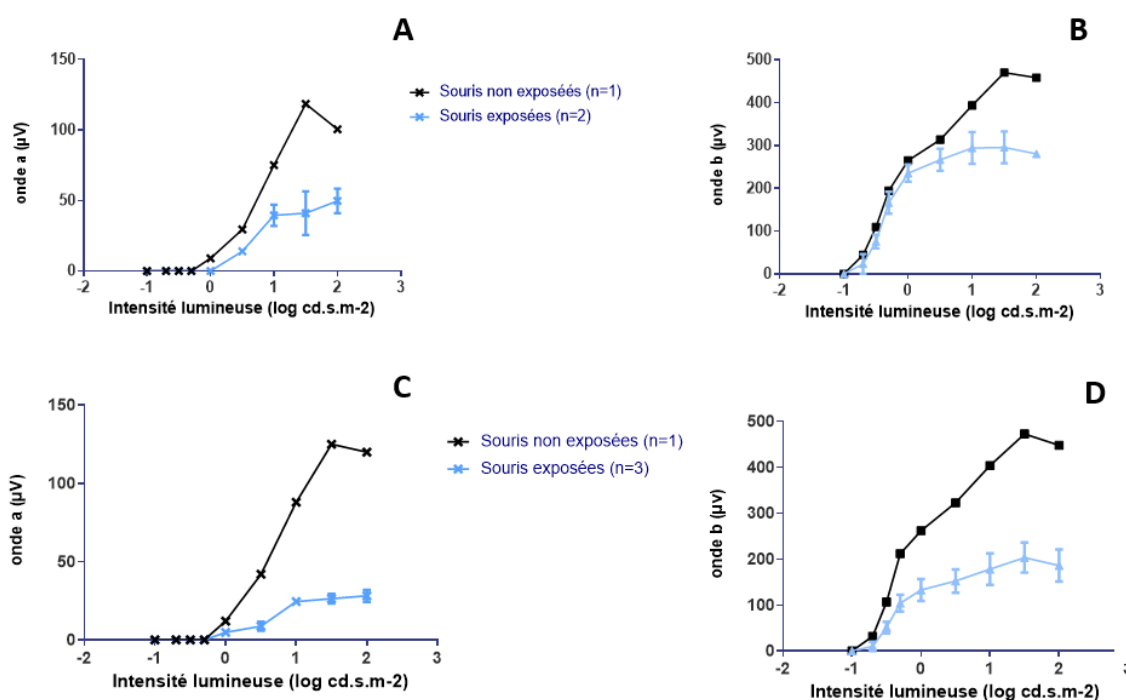


Figure 61 : Analyse de la fonction des photorécepteurs avec la mesure de l'amplitude de l'onde a (A) et de l'onde b (B) des souris BALB/C soumises à une lumière LED bleue de 700Lux (A et B) et de 1000Lux (C et D) pendant 1 semaine avec un cycle de 12h d'exposition à la lumière et de 12h d'obscurité

A 700 Lux, la lumière bleue a permis de faire diminuer l'onde a de -50% et l'onde b de -61% en comparaison avec les souris non exposées. La lumière bleue était donc plus efficace dans l'induction de la dégénérescence des photorécepteurs car elle a permis d'abaisser la fonction

visuelle des souris mais, une dégénérescence des photorécepteurs de -55,5% n'était toujours pas suffisante car il nous fallait abaisser la fonction visuelle de plus de 70%.

A 1000 Lux, la lumière bleue, a fait diminuer les amplitudes des ondes a et b respectivement de 77 et 58%, soit en moyenne une baisse de fonction visuelle des souris de -67,5%. Cette dégénérescence correspondait à l'objectif défini.

Plusieurs études ont déjà utilisé la lumière bleue pour induire la dégénérescence des photorécepteurs comme modèle pour les études sur la DMLA [13], et l'impact de cette lumière sur la DMLA a également été démontré [14,15]. Nous avons donc utilisé ce modèle avec une dégénérescence des photorécepteurs induite par la lumière bleue à 1000 lux sur un cycle de 12h d'exposition et 12h dans l'obscurité, sur une durée de 1 semaine, pour évaluer l'efficacité des SNEDDS-IP-DHA.

5.3.2 Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA sur modèle de dégénérescence chronique par analyse ERG

L'IP-DHA a été administré à la même dose journalière sur une semaine en faisant varier la fréquence d'administration. Il a été administré soit une fois par jour à 100mg/kg, soit deux fois par jour à 50mg/kg ou trois fois par jour à 33mg/kg avant d'évaluer l'état de la rétine des souris. Les résultats de l'ERG ont démontré que les véhicules SNEDDS ne protégeaient pas de la lumière bleue à une intensité de 1000 Lux avec 27% de photorécepteurs restant en comparaison avec les souris non exposées à la lumière : DA (100 %). À une dose quotidienne unique de 100mg/kg, le SNEDDS-IP-DHA n'a montré aucune augmentation de l'effet protecteur avec seulement 29% de photorécepteurs restants. En maintenant la même dose quotidienne, mais en administrant des doses plus faibles à des intervalles de temps plus courts, 2x 50mg/kg/jour et 3x 33mg/kg/jour, nous avons réussi à observer une augmentation significative de la protection de l'activité des photorécepteurs respectivement de +25 % et +22% pour l'onde a et de +25 et +26% pour l'onde b en en comparaison avec le véhicule (**figure 62 et tableau 41**).

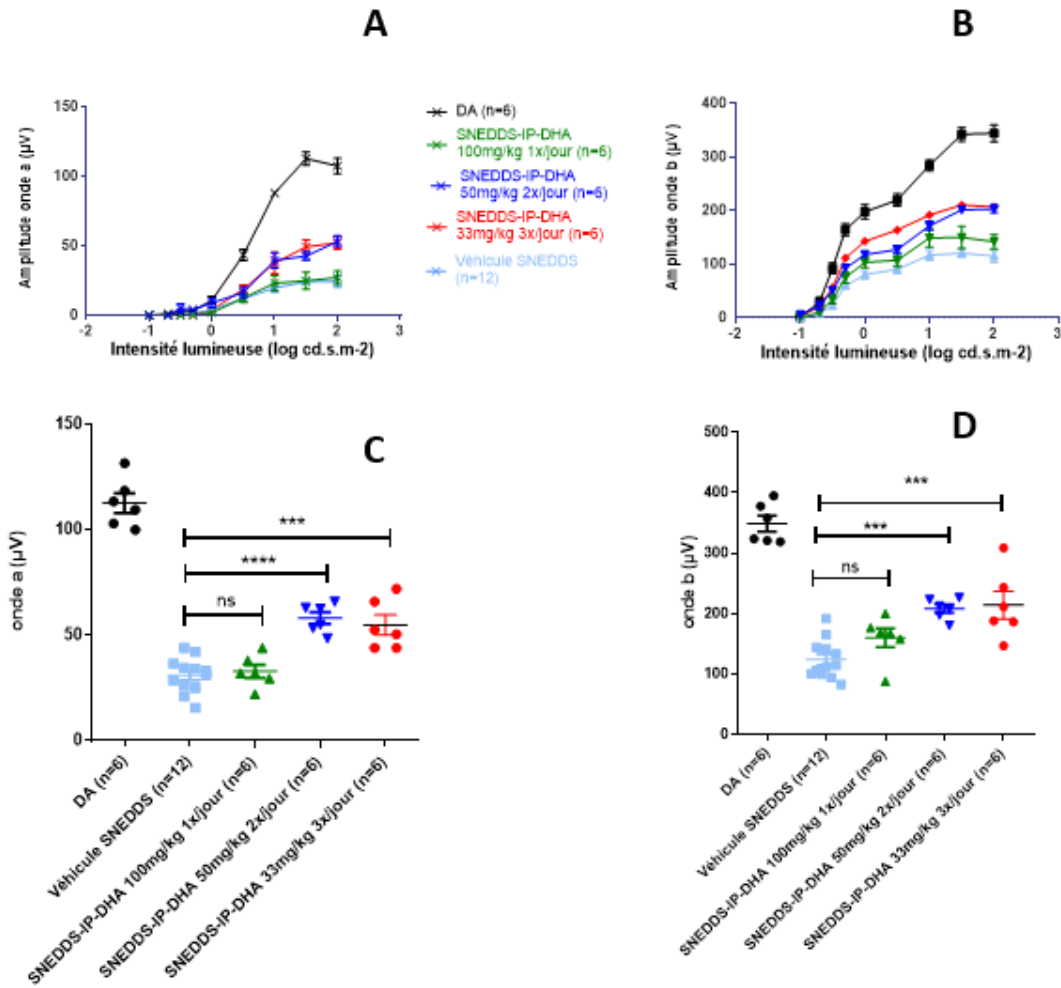


Figure 62 : Courbes de sensibilité rétinienne représentant l'évolution des amplitudes des ondes a (A) et b (B) en fonction de l'intensité lumineuse et des amplitudes maximales des ondes a (C) et b (D) des souris BALB/C avec administration orale de divers prétraitements et après un stress chronique à la lumière bleue induit par une dégénérescence rétinienne. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM avec analyse statistique : ANOVA à sens unique avec test de multi-comparaison de Tukey : *** p < 0,001, **** p < 0,0001, ns : non significatif

Tableau 41 : Résultats de l'amplitude de l'onde a et b issues de l'analyse ERG en pourcentage

	% de l'amplitude de l'onde a / DA	% de l'amplitude de l'onde b / DA	% gain (onde a) / véhicule	% gain (onde b) / véhicule
DA	100	100	NA	NA
SNEDDS-IP-DHA 100mg/kg 1x/j	29	46	2	11
SNEDDS-IP-DHA 50mg/kg 2x/j	52	60	25	25
SNEDDS-IP-DHA 33mg/kg 3x/j	49	61	22	26
Véhicule	27	35	0	0

5.3.3 Evaluation de l'efficacité de l'IP-DHA, sur modèle de dégénérescence chronique, par analyse histologique

Les résultats de l'ERG ont été complétés par l'analyse histologique qui a confirmé que le pourcentage de photorécepteurs a diminué dans la couche ONL des souris traitées de la même façon avec le véhicule SNEDDS et SNEDDS-IP-DHA à 1 x 100mg/kg/jour respectivement de -73 et -75% après avoir été soumises à un stress lumineux chronique sous lumière bleue. L'analyse a également confirmé la protection de l'intégrité des photorécepteurs chez les souris ayant reçu des traitements de 2x 50mg/kg/jour et de 3x 33mg/kg/jour. Les pourcentages de photorécepteurs restants avec cette analyse étaient respectivement de 69% et 51%, soit un gain de +42% et de +30% en comparaison avec le véhicule (**figure 63 et tableau 42**).

Les analyses avec ce modèle de dégénérescence chronique nous ont permis d'observer que la protection de l'IP-DHA était non seulement dose-dépendante, mais aussi fréquence-dépendante. Le fait qu'aucune protection n'ait été observée lors d'une administration unique par jour à 100mg/kg confirme l'impact de la faible demi-vie de l'IP-DHA. Dégradé trop rapidement dans le sang et/ou dans l'œil, il n'a pas protégé efficacement la rétine pendant la durée de l'exposition (12h/jour). Cependant, avec une fréquence d'administration de deux ou trois fois par jour, une protection plus importante a été constatée, ce qui suggère que la quantité d'IP-DHA dans l'œil pendant la journée est restée suffisante pour protéger les photorécepteurs pendant toute la durée de l'exposition. Toutefois, le fait que l'administration de 2x 50mg/kg/jour soit plus efficace que l'administration de 3x 33mg/kg/jour suggère que à une dose de 33mg/kg, la concentration d'IP-DHA n'est pas suffisante pour limiter de façon optimale la dégénérescence des photorécepteurs. Au vu de ces résultats, il est probable qu'une administration plus fréquente à une dose égale ou supérieur à 50mg/kg ou une forme à libération prolongée soit nécessaire pour améliorer le niveau de protection.

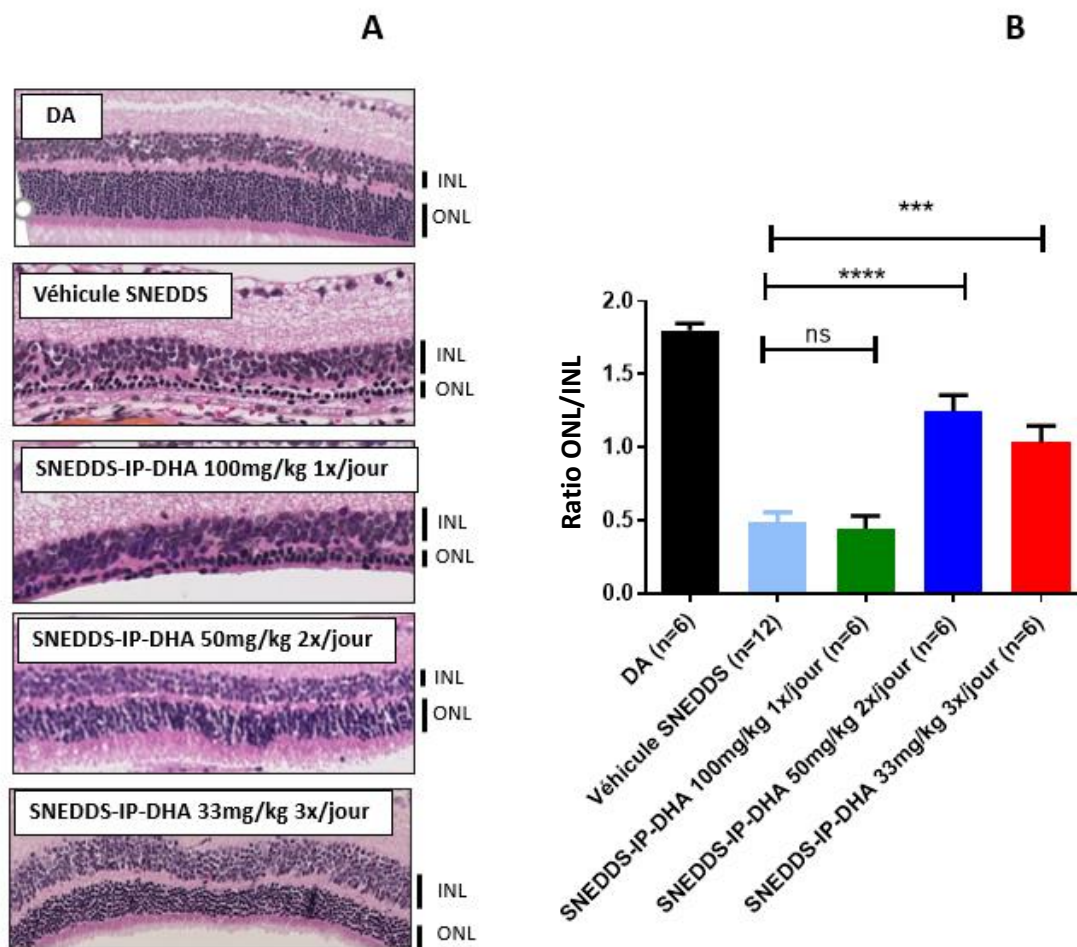


Figure 63 : Rapport de l'épaisseur de l'ONL/INL de souris BALB/c avec différents prétraitements à partir d'une analyse histologique après une dégénérescence rétinienne induite par un stress chronique à la lumière bleue (A,B). . Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM avec analyse statistique : ANOVA à sens unique avec test de multi-comparaison de Tukey : *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns : non significatif

Tableau 42 : Résultats de l'épaisseur des couches ONL/INL issues de l'analyse histologique en pourcentage

	% de l'épaisseur de la couche ONL/INL restants / DA	% gain (ONL/INL) / véhicif
DA	100	NA
SNEDDS-IP-DHA 100mg/kg 1x/j	25	-2
SNEDDS-IP-DHA 50mg/kg 2x/j	69	42
SNEDDS-IP-DHA 33mg/kg 3x/j	57	30
Véhicule	27	0

Des études antérieures ont évalué l'effet thérapeutique *in vivo* de différentes molécules en induisant une dégénérescence rétinienne par un stress lumineux chronique sous lumière bleue. Par exemple, la lutéine (antioxydant lipophile de la famille des caroténoïdes) administrée par voie orale à 25mg/kg/jour avec de l'huile de maïs a démontré son efficacité pour la protection des photorécepteurs pendant 30 jours, avec une exposition à la lumière de 1,5h/jour (1500 Lux) après prétraitement sur des rats [16]. Dans une autre étude, les auteurs ont administré Cistanche Tubulosa (antioxydant issu d'extraits de plantes) par voie orale à des rats à raison de 100 mg/kg/jour pendant 74 jours et ont induit une dégénérescence avec une lumière bleue (150 Lux) 3h/jour pendant les 60 derniers jours et ont démontré l'effet protecteur de Cistanche Tubulosa *in vivo* [17]. Ces études ont montré que les composés antioxydants administrés par voie orale peuvent avoir un effet bénéfique dans le traitement de la DMLA. Ces résultats ne sont pas comparables avec notre étude en raison des conditions expérimentales différentes. Notre étude a démontré la capacité de l'IP-DHA à protéger partiellement la rétine pendant 12 heures. D'autres études seront menées pour optimiser les doses administrées et la fréquence d'administration par jour. Après avoir déterminé la forme pharmaceutique et le dosage idéal, il pourrait être également intéressant de mener une étude sur une plus longue période.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons développé un modèle de dégénérescence chronique des photorécepteurs induite par lumière bleue sur des souris BALB/C afin de diminuer la fonction visuelle des souris de 67,5%. L'effet protecteur de l'IP-DHA formulé avec les SNEDDS a pu être évalué sur la fonction et l'intégrité des photorécepteurs de ces souris avec ce modèle. Il a ainsi été mis en évidence qu'une fréquence d'administration de l'IP-DHA plus élevée mais avec des doses plus faibles permettait de protéger plus efficacement les photorécepteurs des souris.

VI. Conclusion sur l'évaluation de l'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA

L'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA dans différentes formulations (micelles, LNC et SNEDDS) a été évaluée pour la voie IV et orale sur souris ABCA4KO et BALB/c (**tableau 43**).

Tableau 43 : Résumé de l'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA dans les différents modèles

Composé administré / formulation	Dose administrée (mg/kg)	% d'activité des photorécepteurs		% d'Intégrité des photorécepteurs	% de photorécepteurs restants en moyenne (fonction et intégrité)
		Onde a	Onde b		
Voie IV – modèle de dégénérescence aigu – souris ABCA4KO					
M-Q-IP-DHA	30	81 ± 9	89 ± 6	67 ± 8	76
Voie Orale – modèle de dégénérescence aigu – souris ABCA4KO					
SNEDDS-IP-DHA	100	76 ± 7	82 ± 9	73 ± 8	77
	50	55 ± 5	62 ± 6	54 ± 7	57
	17	54 ± 8	57 ± 7	36 ± 7	49
IP-DHA - huile de soja	100	42 ± 6	39 ± 6	33 ± 5	38
Voie Orale – modèle de dégénérescence aigu – souris BALB/c					
LNC-Q-IP-DHA	100	102 ± 5	107 ± 4	92 ± 7	100
	75	90 ± 4	98 ± 2	74 ± 2	87
	50	51 ± 8	62 ± 7	42 ± 1	52
Q-IP-DHA - Labrafac®	100	67 ± 6	73 ± 8	61 ± 4	67
	50	39 ± 8	40 ± 8	37 ± 1	39
Voie Orale – modèle de dégénérescence chronique – souris BALB/c					
SNEDDS-IP-DHA	100 1x/jour	29 ± 3	46 ± 4	25 ± 5	33
	50 2x/jour	52 ± 2	60 ± 2	69 ± 6	60
	33 3x/jour	49 ± 4	61 ± 7	57 ± 6	56

Durant ces études expérimentales *in vivo*, les formulations développées ont démontré leur capacité à améliorer l'efficacité de ces SA lipophénoliques par rapport à la référence faite avec une solution huileuse. Sur modèle animal ABCA4KO ou BALB/c, par voie IV et orale, après avoir

induit une dégénérescence des photorécepteurs pas un stress lumineux aigu et chronique (lumière bleue ou blanche), ces deux molécules ont montré leur capacité à maintenir partiellement l'activité et à protéger l'intégrité et la fonction des photorécepteurs. Ces résultats prometteurs nous encourageant à poursuivre le développement de ces molécules.

Références

- [1] J.T. Ortega, T. Parmar, M. Golczak, B. Jastrzebska, Protective Effects of Flavonoids in Acute Models of Light-Induced Retinal Degeneration, *Mol Pharmacol.* 99 (2021) 60–77. <https://doi.org/10.1124/molpharm.120.000072>.
- [2] M. Bhende, S. Shetty, M. Parthasarathy, S. Ramya, Optical coherence tomography: A guide to interpretation of common macular diseases, *Indian J Ophthalmol.* 66 (2018) 20. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_902_17.
- [3] J. Zhang, P.D. Kiser, M. Badiie, G. Palczewska, Z. Dong, M. Golczak, G.P. Tochtrop, K. Palczewski, Molecular pharmacodynamics of emixustat in protection against retinal degeneration, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 2781–2794. <https://doi.org/10.1172/JCI80950>.
- [4] P.J. Rosenfeld, P.U. Dugel, F.G. Holz, J.S. Heier, J.A. Pearlman, R.L. Novack, K.G. Csaky, J.M. Koester, J.K. Gregory, R. Kubota, Emixustat Hydrochloride for Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration, *Ophthalmology.* 125 (2018) 1556–1567. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.03.059>.
- [5] N.S. Peachey, S.L. Ball, Electrophysiological analysis of visual function in mutant mice, *Doc Ophthalmol.* 107 (2003) 13–36. <https://doi.org/10.1023/a:1024448314608>.
- [6] N. Taveau, A. Cubizolle, L. Guillou, N. Pinquier, E. Moine, D. Cia, V. Kalatzis, J. Vercauteren, T. Durand, C. Crauste, P. Brabet, Preclinical pharmacology of a lipophenol in a mouse model of light-induced retinopathy, *Exp Mol Med.* 52 (2020) 1090–1101. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0460-7>.
- [7] M. Tanito, F. Li, M.H. Elliott, M. Dittmar, R.E. Anderson, Protective Effect of TEMPOL Derivatives against Light-Induced Retinal Damage in Rats, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 (2007) 1900. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1057>.
- [8] G. Lukas, S.D. Brindle, P. Greengard, The route of absorption of intraperitoneally administered compounds, *J Pharmacol Exp Ther.* 178 (1971) 562–564.
- [9] A. Al Shoyaib, S.R. Archie, V.T. Karamyan, Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies?, *Pharm Res.* 37 (2020) 12. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>.
- [10] H. Izawa, Y. Inoue, Y. Ohno, K. Ojino, K. Tsuruma, M. Shimazawa, H. Hara, Protective Effects of Anti-placental Growth Factor Antibody Against Light-Induced Retinal Damage in Mice, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (2015) 6914. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-16748>.
- [11] T. Otsuka, M. Shimazawa, T. Nakanishi, Y. Ohno, Y. Inoue, K. Tsuruma, T. Ishibashi, H. Hara, The Protective Effects of a Dietary Carotenoid, Astaxanthin, Against Light-Induced Retinal Damage, *J Pharmacol Sci.* 123 (2013) 209–218. <https://doi.org/10.1254/jphs.13066FP>.
- [12] H. Izawa, M. Shimazawa, Y. Inoue, S. Uchida, H. Moroe, K. Tsuruma, H. Hara, Protective effects of NSP-116, a novel imidazolyl aniline derivative, against light-induced retinal

- damage in vitro and in vivo, *Free Radical Biology and Medicine*. 96 (2016) 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.036>.
- [13] A.R. Wielgus, R.J. Collier, E. Martin, F.B. Lih, K.B. Tomer, C.F. Chignell, J.E. Roberts, Blue light induced A2E oxidation in rat eyes – experimental animal model of dry AMD, *Photochem. Photobiol. Sci.* 9 (2010) 1505. <https://doi.org/10.1039/c0pp00133c>.
- [14] P.V. Algvere, J. Marshall, S. Seregard, Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard: *Acta ophthalmologica scandinavica* 2006, *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 84 (2006) 4–15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0420.2005.00627.x>.
- [15] A. King, E. Gottlieb, D.G. Brooks, M.P. Murphy, J.L. Dunaief, Mitochondria-derived Reactive Oxygen Species Mediate Blue Light-induced Death of Retinal Pigment Epithelial Cells, *Photochemistry and Photobiology*. 79 (2007) 470–475. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2004.tb00036.x>.
- [16] J. Yang, D. Li, Y. Zhang, L. Zhang, Z. Liao, S. Aihemaitijiang, Y. Hou, Z. Zhan, K. Xie, Z. Zhang, Lutein protected the retina from light induced retinal damage by inhibiting increasing oxidative stress and inflammation, *Journal of Functional Foods*. 73 (2020) 104107. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104107>.
- [17] M.-R. Wu, C.-H. Lin, J.-D. Ho, G. Hsiao, Y.-W. Cheng, Novel Protective Effects of *Cistanche Tubulosa* Extract Against Low-Luminance Blue Light-Induced Degenerative Retinopathy, *Cell Physiol Biochem*. 51 (2018) 63–79. <https://doi.org/10.1159/000495162>.

Conclusion générale

Conclusion générale

La durée de vie de la population mondiale ne cesse d'augmenter et les pathologies liées au vieillissement augmentent avec elle. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie oculaire fréquente débutant vers l'âge de 60 ans, qui représente un enjeu sanitaire majeur pour les années à venir. La DMLA touche plus de 196 millions de personnes en 2020 et touchera 288 millions en prévision en 2040 [1]. Cette pathologie neurodégénérative affecte les cellules photoréceptrices par la production entre autres d'un rétinoloïde cytotoxique (A2E), et par l'accumulation de lipofuscine. Le mécanisme physiopathologique de cette dégénérescence est causé par un double stress carbonylé et oxydant. Ce mécanisme est également impliqué dans les dystrophies maculaires héréditaires, comme la maladie de Stargardt dont la prévalence est de 1/10000 [2]. Actuellement, il n'existe aucun traitement sur le marché pour traiter ou prévenir ces maladies. Les recherches scientifiques actuelles portent sur de nombreux axes de recherche différents tels que le développement de molécules pharmacologiques, la thérapie génique, la thérapie cellulaire et les thérapies au laser.

Dans ce contexte, l'équipe du SLB de l'IBBM a développé des dérivés lipophénoliques capables d'agir contre le stress carbonylé et oxydant (COS) afin de limiter la dégénérescence des photorécepteurs de la macula : le phloroglucinol-Oisopropyl-ODHA (IP-DHA) et la quercétine-7-Oisopropyl-3-ODHA (Q-IP-DHA). La molécule LEAD (IP-DHA) avait déjà démontré *in vitro* un effet protecteur contre le stress carbonylé, un effet contre le stress oxydant plus faible et l'absence de toxicité pour les cellules rétinienne [3]. Après administration IV, l'IP-DHA avait démontré une efficacité pour protéger la dégénérescence des photorécepteurs sur des souris modèles de la maladie de Stargardt (ABCA4KO) validant ainsi une première preuve de concept *in vivo* [4]. La molécule backup-LEAD (Q-IP-DHA) quant à elle, avait démontré *in vitro* une activité intéressante à la fois contre le stress oxydant et carbonylé mais son efficacité *in vivo* n'a pas été évaluée. Ces molécules présentant des solubilités très limitées dans l'eau, cela rendait difficile leur administration par voie IV et limitait leur biodisponibilité par voie orale.

L'objectif principal de ces travaux de thèse était de développer des formulations pour ces molécules lipophénoliques afin de valider une protection par voie orale contre la DMLA atrophie et la maladie de Stargardt. Pour cela, une formulation orale a été développée pour la molécule LEAD, afin de pouvoir l'administrer chez l'animal et évaluer son efficacité. Le

Conclusion générale

second objectif était d'avancer sur le développement de la molécule backup-LEAD : proposer une formulation IV de la Q-IP-DHA, pour l'administrer chez l'animal et obtenir une preuve de concept *in vivo* comme cela a été précédemment réalisé pour l'IP-DHA. Les résultats *in vivo* prometteurs nous ont également permis de travailler sur la formulation orale pour évaluer l'efficacité de la molécule.

Dans un premier temps, l'étude des caractéristiques physico-chimiques de ces lipophénols a mis en avant leur caractère lipophile ($\text{Log P} > 5$) et leur faible solubilité aqueuse. L'analyse biopharmaceutique a révélé la faible perméabilité *in vitro* à travers les entérocytes (Caco-2) des deux actifs et que l'IP-DHA était rapidement métabolisé *in vitro* par les cellules hépatiques humaines ($T_{1/2} = 10\text{min}$) contrairement à la Q-IP-DHA ($T_{1/2} > 60\text{min}$). Suite à ces analyses, ces deux molécules ont donc été classées BCS classe IV (faiblement soluble et faiblement perméable). Ce type de molécule représente actuellement 5% des médicaments sur le marché [5], le développement galénique de ces molécules est un enjeu important en raison de leurs caractéristiques défavorables qui limitent fortement leur biodisponibilité par voie orale.

Afin de garantir une biodisponibilité suffisante par voie orale, l'IP-DHA a été formulé avec des formulations lipidiques SNEDDS composées de triglycérides, de surfactants lipophiles et hydrophiles. Lorsque ces SNEDDS entrent en contact avec le milieu aqueux du TGI, elles forment des nanoémulsions de 62nm chargés à 30mg/mL en IP-DHA. Ce taux de chargement est satisfaisant pour pouvoir évaluer l'efficacité des molécules à des doses élevées *in vivo*. Les analyses *in vitro* de ces formulations ont démontré que les SNEDDS permettaient d'améliorer la solubilité de l'IP-DHA en milieu aqueux et de limiter sa dégradation par les enzymes intestinales. De plus, une partie de la dégradation de l'IP-DHA par le foie pourrait être limitée car la molécule possède un log P élevé et une bonne solubilité dans les triglycérides, ce qui améliorerait son passage lymphatique et éviterait en partie l'effet de premier passage hépatique.

Concernant la Q-IP-DHA, elle a d'abord été formulée pour la voie IV grâce à une formulation micellaire à base de Kolliphor® HS 15. La caractérisation de cette formulation a démontré un taux de chargement de 6mg/mL en Q-IP-DHA permettait d'obtenir des micelles

Conclusion générale

monodisperses de 16nm. Ce taux de chargement garantit de pouvoir administrer des doses de 30mg/kg par voie IV chez la souris (dose utilisée pour la preuve de concept de l'IP-DHA) sans risque de précipitation de l'actif après injection dans le sang. Pour la voie orale, une formulation LNC de taille de 25nm a été optimisée pour pouvoir charger 3,24% de Q-IP-DHA. Les LNC ont l'avantage d'être stables en milieu gastro-intestinal, diffusent à travers le mucus intestinal et sont absorbées par transcytose à travers les entérocytes tout en gardant leur intégrité [6]. Ces formulations devraient donc permettre d'améliorer la biodisponibilité des SA de BCS classe IV.

L'identification et la quantification des métabolites issus de l'IP-DHA, a conduit à identifier plusieurs étapes de métabolisation. Dans un premier temps, le clivage de la fonction ester de l'IP-DHA par les estérases sanguines principalement a conduit à la libération du DHA et du phloroglucinol-isopropylé et ensuite, dans un second temps une β -oxydation du DHA conduisant à la formation d'un nouveau métabolite lipidique. Cette analyse a mis en avant la métabolisation rapide de l'IP-DHA dans le sang.

L'efficacité de ces lipophénols a été évaluée *in vivo*, en administrant les molécules par voie IV et orale, puis en induisant la dégénérescence des photorécepteurs avec un stress lumineux aigu avec une intensité de lumière blanche forte (20 000 Lux) sur un temps court (1h 30). Par voie IV, solubilisée dans des micelles, la Q-IP-DHA à 30mg/kg a montré une efficacité de \approx 76% sur la protection des photorécepteurs sur des souris ABCA4KO. Par voie orale, les LNC-Q-IP-DHA administrées à 100mg/kg ont présenté une efficacité de \approx 100% sur des souris BALB/c et les SNEDDS-IP-DHA de \approx 77% dans la protection de l'intégrité et de la fonction des photorécepteurs sur des souris ABCA4KO. Dans les deux cas, l'augmentation de la biodisponibilité a été indirectement mise en avant, car les formulations ont permis d'augmenter l'efficacité des actifs respectivement de +39% et de +33% pour l'IP-DHA et la Q-IP-DHA en comparaison des actifs administrés en solution huileuse à dose égale (100mg/kg). Cependant les résultats d'efficacité ne sont pas comparables car ils ont été réalisés sur des modèles animaux différents. Les souris ABCA4KO étaient utilisées comme modèle de la maladie de Stargardt pour évaluer l'efficacité des composés, cependant au fil du temps et des générations successives de souris, la dégénérescence rétinienne induite par la lumière était

Conclusion générale

de moins en moins efficace, rendant le modèle inutilisable. Pour pallier ce problème, nous avons été contraints de choisir un autre modèle animal. Après des recherches bibliographiques et plusieurs tests préliminaires, les souris BALB/c se sont révélées être une bonne alternative car elles sont sensibles à la lumière et ne présentent pas la délétion du gène *Abca4*, ce qui en fait un bon modèle pour la pathologie de la DMLA.

Pour se rapprocher des conditions physiopathologiques de la DMLA, un modèle de dégénérescence des photorécepteurs des souris avec une intensité de lumière bleue faible (1000 Lux) sur un temps plus long (7 jours) a été validé. Les SNEDDS-IP-DHA administrés par voie orale ont permis de protéger en partie l'activité et l'intégrité des photorécepteurs respectivement de 60% et de 56% en étant administrés deux fois par jour à 50mg/kg et trois fois par jour à 33mg/kg sur 1 semaine. Cette analyse a mis en avant l'importance de la fréquence d'administration sur l'efficacité de l'IP-DHA.

En conclusion, une formulation micellaire pour la voie IV et deux formulations orales SNEDDS et LNC ont été développées, optimisées et caractérisées pour pouvoir évaluer l'efficacité de deux nouveaux lipophénols BCS classe IV. Les deux lipophénols se sont montrés efficaces pour protéger les photorécepteurs des souris après une administration IV et orale, malgré la métabolisation de la molécule LEAD. Le potentiel de ces deux molécules avec un traitement par voie orale pour limiter la progression de la DMLA atrophique et la maladie de Stargardt a donc été validé en phase préclinique.

Ces résultats sont prometteurs et encourageants pour continuer le développement de ces candidats médicament ; cependant, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour améliorer les connaissances notamment sur le mécanisme d'action des lipophénols. Le premier mécanisme d'action mis en évidence est le piégeage direct ou indirect par les lipophénols des réactifs aldéhydiques à l'origine de la formation des bis-rétinoïdes cytotoxiques limitant ainsi le stress carbonylé induit notamment par un excès de tout *trans*-rétinal. Le second mécanisme d'action potentiel est l'activation de systèmes de défenses enzymatiques antioxydants médiée par la voie Nrf2. Des études préliminaires ont été effectuées à l'INM de qRT-PCR sur cellules ARPE-19 pour évaluer l'expression génique de

Conclusion générale

gènes impliqués dans l'inflammation, le stress oxydant, les mécanismes de cycle cellulaire et de métabolisme lipidique ainsi que des études western-blot pour évaluer l'expression de protéines antioxydantes induites par la voie Nrf2 modulée par l'IP-DHA. Ces études montrent que l'IP-DHA pourrait diminuer la toxicité induite par le tout *trans*-rétinal en modulant certains gènes liés au stress oxydant (Hmox1, Chac1, Cth, Gclm, Atf3) et ceux liés à l'inflammation (Il6, Tnfsf9, Nfil3, Cxcl3, P2rx6) et en augmentant l'expression de protéines antioxydantes majeures de la voie Nrf2 : l'hème oxygénase (HO-1), la superoxyde Dismutase (SOD) et la glutathion-S-transférase Pi (GSTP1). Ces résultats restent à confirmer en augmentant le nombre d'expérimentation.

Comme nous l'avons démontré, la molécule LEAD est fortement métabolisée et les études sur les mécanismes d'action mis en avant *in vitro* doivent être validées *in vivo*. En effet, on ne sait pas si l'effet protecteur observé provient de la molécule active (IP-DHA), de ses métabolites ou d'un effet synergique de l'IP-DHA et de ses métabolites. La quantification des lipophénols et de leurs métabolites au niveau de la rétine et de l'EPR au cours du temps après une administration IV et orale nous donnerait des indications sur les molécules qui pénètrent jusqu'au site d'action et à quelle concentration. L'étude comparative de l'efficacité de l'IP-DHA et du DHA après administration orale chez la souris a montré que le DHA n'a pas d'effet protecteur à 100mg/kg [4], ce qui met en avant l'avantage de l'utilisation de l'IP-DHA. En ce qui concerne la molécule backup-LEAD (Q-IP-DHA), elle présente trois avantages majeurs en comparaison avec l'IP-DHA : une faible métabolisation hépatique, une activité contre la photo-oxydation de l'A2E et antioxydante plus importante. Ces caractéristiques pourraient faire de la Q-IP-DHA une molécule plus efficace que l'IP-DHA. Il semblerait que les résultats d'efficacité *in vivo* tendent en ce sens mais pour confirmer cette hypothèse, une étude comparative de l'efficacité de l'IP-DHA et de la Q-IP-DHA dans les mêmes conditions sera nécessaire. Dans l'idéal, il faudrait également pouvoir évaluer sa métabolisation par les estérases intestinales et sanguines et sa capacité à moduler l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydant et l'inflammation et des protéines impliquées dans la voie Nrf2, pour pouvoir la comparer à la molécule LEAD.

Conclusion générale

Une des principales analyses à effectuer dans un futur proche serait l'évaluation de la toxicité de ces lipophénols sur l'ensemble de l'organisme. Les études *in vivo* ont mis en avant l'importance d'administrer des doses élevées pour pouvoir être efficace, or après une administration IV ou orale, l'ensemble des tissus de l'organisme devrait être exposé à ces lipophénols. Il est donc important d'évaluer la toxicité de ces molécules afin de pouvoir évaluer la balance bénéfice/risque. Comme ces lipophénols visent à ralentir la progression de ces pathologies chroniques, il serait important d'évaluer leur toxicité sur des administrations répétées sur un temps long (toxicité chronique).

Il serait également intéressant de mieux connaître les mécanismes d'absorption afin d'éventuellement moduler la composition des formulations en fonction de l'importance des rôles des excipients dans le processus d'absorption en mettant en place des études de perméabilité comparatives sur des modèles de cellules intestinales Caco-2.

D'autres perspectives sont également envisagées pour développer une formulation à libération prolongée pour la voie orale. En effet, comme nous avons démontré l'importance de la fréquence d'administration pour que l'IP-DHA soit efficace, une forme à libération prolongée permettrait de diminuer cette fréquence d'administration tout en maintenant l'efficacité de l'IP-DHA sur la journée. Un autre point envisagé est de développer des formulations pour une instillation topique. Au laboratoire, nous avons commencé à étudier le développement de nanoformulations telles que les liposomes avec divers phospholipides et diverses méthodes de fabrication (injection éthanolique, hydratation). Une incompatibilité chimique entre l'IP-DHA et les phospholipides conduisant à la formation d'agrégats dans l'eau, nous a contraint à abandonner le développement de cette formulation. Cependant, d'autres nanoformulations peuvent être administrées par voie topique en modifiant leur surface (chitosan, poloxamer, ...) afin d'améliorer le ciblage de la rétine neurale.

Toutes ces approches pourront être envisagées et promettent encore des futures recherches passionnantes au sein de notre équipe dans l'objectif de proposer un traitement pour ces pathologies.

Références

- [1] W.L. Wong, X. Su, X. Li, C.M.G. Cheung, R. Klein, C.-Y. Cheng, T.Y. Wong, Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis, *The Lancet Global Health*. 2 (2014) e106–e116. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1).
- [2] S. Chatterjee, S. Gupta, V.N. Chaudhry, P. Chaudhry, A. Mukherjee, M. Mutsuddi, Whole exome sequencing identifies a novel splice-site mutation in IMPG2 gene causing Stargardt-like juvenile macular dystrophy in a north Indian family, *Gene*. 816 (2022) 146158. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146158>.
- [3] A.V. Cideciyan, T.S. Aleman, M. Swider, S.B. Schwartz, J.D. Steinberg, A.J. Brucker, A.M. Maguire, J. Bennett, E.M. Stone, S.G. Jacobson, Mutations in ABCA4 result in accumulation of lipofuscin before slowing of the retinoid cycle: a reappraisal of the human disease sequence, *Human Molecular Genetics*. 13 (2004) 525–534. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh048>.
- [4] N. Taveau, A. Cubizolle, L. Guillou, N. Pinquier, E. Moine, D. Cia, V. Kalatzis, J. Vercauteren, T. Durand, C. Crauste, P. Brabet, Preclinical pharmacology of a lipophenol in a mouse model of light-induced retinopathy, *Exp Mol Med*. 52 (2020) 1090–1101. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0460-7>.
- [5] M. Markovic, M. Zur, I. Ragatsky, S. Cvijić, A. Dahan, BCS Class IV Oral Drugs and Absorption Windows: Regional-Dependent Intestinal Permeability of Furosemide, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1175. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121175>.
- [6] E. Roger, J.-C. Gimel, C. Bensley, A.S. Klymchenko, J.-P. Benoit, Lipid nanocapsules maintain full integrity after crossing a human intestinal epithelium model, *Journal of Controlled Release*. 253 (2017) 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.005>.

Formulations de dérivés lipophénoliques, évaluation *in vitro* et *in vivo* de leur efficacité contre la dégénérescence maculaire

La dégénérescence maculaire liée à l'âge est une pathologie neurodégénérative affectant les cellules photoréceptrices par la production d'un rétinolide cytotoxique (A2E) liée à l'accumulation de lipofuscine. Ce mécanisme est également impliqué dans les dystrophies maculaires héréditaires, comme la maladie de Stargardt, par un double stress carbonylé et oxydant. Des dérivés lipophénoliques (IP-DHA et Q-IP-DHA) capables d'agir contre le stress carbonylé et oxydant ont été synthétisés afin de limiter la dégénérescence des photorécepteurs de la macula. Des résultats prometteurs ont été obtenus *in vivo* après administration de l'IP-DHA à 30mg/kg par voie intraveineuse en induisant la dégénérescence des photorécepteurs par un stress lumineux aigu. L'objectif de ces travaux de thèse est d'évaluer les caractéristiques physico-chimiques et biopharmaceutiques de ces lipophénols afin de proposer des formulations intraveineuse et orale adaptées pour pouvoir évaluer leur efficacité sur des modèles animaux. La caractérisation de ces lipophénols révèle que ces molécules sont de BCS classe IV (faiblement soluble, faiblement perméable). Ainsi, une formulation micellaire améliorant la solubilité de la Q-IP-DHA et garantissant que l'actif ne précipite pas après injection intraveineuse a été développée avec succès ; cette formulation a permis d'obtenir une protection de l'activité et de l'intégrité des photorécepteurs de 76% à une dose de 30mg/kg chez la souris. Pour la voie orale, une formulation auto-nanoémulsifiante (SNEDDS), stable à la dilution, a permis d'améliorer la solubilité et la stabilité de l'IP-DHA dans le tractus gastro-intestinal. Une seconde formulation orale de nanocapsules lipidique a été optimisée pour la Q-IP-DHA permettant un taux de chargement et un pourcentage d'encapsulation élevé. *In vivo*, ces deux formulations administrées par voie orale à 100mg/kg, permettent de limiter la dégénérescence de photorécepteurs des souris de 77% pour l'IP-DHA et de 100% pour la Q-IP-DHA après avoir induit leur dégénérescence par un stress lumineux aigu. Après mise au point d'un modèle chronique de dégénérescence des photorécepteurs des souris, la protection de l'IP-DHA sous formulation SNEDDS administrée par voie orale 2 fois par jour à 50mg/kg et 3 fois par jour à 33mg/kg a mis en avant sa capacité de protéger respectivement de 60% et 56% les photorécepteurs des souris sur 1 semaine. En conclusion, les formulations développées permettent la délivrance intraveineuse et orale de lipophénols et mettent en avant leur capacité à protéger les photorécepteurs de différents modèles animaux, montrant ainsi leur potentiel dans le développement de traitements de la dégénérescence maculaire et de la maladie de Stargardt.

Mots clés : dégénérescence maculaire, lipophénols, administration orale, administration intraveineuse nanoformulation, système auto-nanoémulsifiant, nanocapsule lipidique, solution micellaire