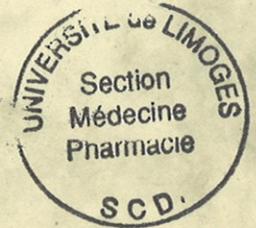


UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE 2002

SCD UNIV.LIMOGES.



D 065 089904 8

THESE N°

314/11

Les perfluorocarburés

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le : 14 juin 2002

par

Julien QUIN

Né le 21 octobre 1977 à Créteil

EXAMINATEURS de la THESE

Mr le Professeur G. HABRIOUX

Mme le Professeur D. CHULIA

Mme le Docteur A. CHEIPE

Melle M.P. KRAFFT CR CNRS UPR 22 Strasbourg

Président

Juge

Juge

Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOSGIRAUD Caudine	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE - PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACIE GALENIQUE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE et MINERALE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE et CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

**SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES
ADMINISTRATIFS**

Madame **ROCHE** Doriane

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE et BROMATOLOGIE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE et CRYPTOLOGAMIE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIME ANALYTIQUE et BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE et CRYPTOLOGAMIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
ROUSSEAU Annick	PHYSIQUE - INFORMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE PHY SIQUE et CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES et INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

ASSISTANT

FAURE Monique

PHARMACIE GALENIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Claude

ANGLAIS

ATER

CALLISTE Claude

BIOPHYSIQUE

MARFAK Abdelghafour

BIOPHYSIQUE

RIAH DEHKORDI Homayoun

PHYSIOLOGIE - PARASITOLOGIE

TALLET Dominique

PHARMACOLOGIE

REMERCIEMENTS

L'auteur tient à remercier l'ensemble du corps professoral de la Faculté de Pharmacie de Limoges pour leurs grandes compétences, leurs savoir-faire et faire-savoir pendant toutes ces années d'études.

Un merci tout particulier aux membres du jury qui, malgré leur importante charge de travail, surent toujours rester disponibles, se montrer patients, pour le guider et le conseiller au mieux dans la réalisation de cette étude :

Monsieur Gérard HABRIOUX
Doyen de la Faculté de Pharmacie de Limoges
Professeur de biochimie fondamentale

Madame Dominique CHULIA
Professeur de pharmacie galénique
Faculté de Pharmacie de Limoges

Madame Annie CHEIPE
Docteur en médecine
Direction Régionale de la Jeunesse et des Sports de Limoges

Mademoiselle Marie Pierre KRAFFT
Docteur en Chimie
Chargée de recherches au CNRS de Strasbourg
Institut Charles Sadron - UPR 22

Un merci également aux membres des bibliothèques universitaires des Facultés de Médecine, Pharmacie et Sciences de Limoges, sans oublier famille et amis qui participèrent de près ou de loin à ce travail.

Les erreurs matérielles et éventuelles lacunes qui pourraient être constatées relèvent de la seule responsabilité de l'auteur.

PLAN

INTRODUCTION

Chapitre 1 LES SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE

1. Historique
2. Solutions d'hémoglobine libre non modifiée
3. Solutions d'hémoglobine modifiée

Chapitre 2 LES PERFLUOROCARBURES

1. Historique
2. Structure - nomenclature
3. Synthèse
4. Propriétés physicochimiques
5. Différentes générations d'émulsion
6. Transport et délivrance d'oxygène par les fluorocarbures
7. Formes galéniques
8. Pharmacocinétique
9. Effets secondaires
10. Applications cliniques potentielles
11. Utilisation détournée

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

La transfusion de sang homologue (celui d'une autre personne) est une opération délicate qui permet de restaurer la volémie et de prévenir l'hypoxie tissulaire dans les situations hémorragiques. Cette intervention, devenue banale, pose pourtant de nombreux problèmes vis à vis de la disponibilité, du stockage et du transport du sang. L'utilisation de cette méthode n'est pas non plus dénuée de risques. La transmission d'agents infectieux (virus : VIH, VHC...; bactéries : staphylocoque...; parasites : paludisme ; agents transmissibles non conventionnels), la survenue d'accidents cardiocirculatoires (trouble du rythme cardiaque, thromboembolie) et immunologiques (incompatibilité ABO, allo-anticorps) sont devenus de réels problèmes (Wautier, 1999).

La transfusion sanguine serait-elle devenue une pratique à éviter ? Il semble bien difficile d'apporter une réponse à cette question. Néanmoins, la nécessité d'économiser les produits sanguins et de limiter le recours à la transfusion est devenue une priorité dans le monde médical. Afin d'y parvenir, l'emploi des solutés de remplissage vasculaire (cristalloïdes et colloïdes de synthèse) aurait pu être intéressant mais ils ne permettent pas d'assurer l'oxygénation tissulaire. Les recherches se sont donc orientées vers la mise au point de produits capables de transporter et d'échanger l'oxygène et le gaz carbonique tout en maintenant la volémie. Ces nouveaux produits ne doivent pas pour autant être qualifiés de "substituts sanguins" ou de "sang artificiel". Ces deux termes sont ici inappropriés et cela pour deux raisons au moins. La première est que les produits actuellement développés en clinique n'assurent que le transport des gaz respiratoires sans remplir les autres fonctions du sang (régulation, métabolisme, défense de l'hôte). La seconde est que ce transport n'est assuré que d'une façon temporaire (Riess, 1995 a). Mieux vaut donc parler de transporteurs d'oxygène injectables.

Pour répondre à leurs objectifs, les transporteurs d'oxygène injectables doivent être efficaces, dénués de toxicité significative, de risque infectieux, et d'effets antigéniques. Ils doivent en outre pouvoir être stockés pendant une période suffisamment longue, si possible à

la température ambiante et être d'un emploi commode. Enfin, ils doivent pouvoir être reproduits à grande échelle et posséder un coût acceptable (Riess, 1995 b). Actuellement, seuls les solutions d'hémoglobines et les perfluorocarbures (PFC) répondent au moins en partie à ces critères.

Ces deux catégories de transporteurs d'oxygène injectables seront abordées successivement. La première partie résume les solutions d'hémoglobines. La seconde largement consacrée aux émulsions de perfluorocarbures permet de comprendre comment l'oxygène est véhiculé par ces émulsions. Elle insiste également sur leur formulation et leurs applications cliniques potentielles. La pharmacocinétique et les effets secondaires de ces transporteurs d'oxygène injectables viennent compléter cette étude sans oublier leur utilisation détournée.

Chapitre I

LES SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE

1. HISTORIQUE

La première utilisation d'érythrocytes hémolysés fut rapportée en 1868 et s'accompagna de séquelles sévères (défaillance cardiorespiratoire, coagulation intravasculaire disséminée) (Lamy et al, 1996).

En 1916, une étude mit en évidence la néphrotoxicité de l'hémoglobine libre tandis que son effet vasopresseur fut découvert en 1937 (Remy et al, 1999).

Finalement, la première expérience "positive" fut publiée en 1949 par Amberson et al. Les auteurs décrivaient le cas d'une patiente traitée avec succès par administration d'une solution d'hémoglobine lors d'un choc hémorragique du post-partum (Lamy et al, 1996). Chez cette personne, l'injection de la solution d'hémoglobine avait augmenté la pression artérielle et donné lieu à une reprise de la conscience (Remy et al, 1999).

Vingt ans plus tard, Rabiner et al traitèrent efficacement vingt patients, en état de choc hémorragique, avec une solution d'hémoglobine purifiée. Savitsky et al rapportèrent également l'administration, sans incident majeur, d'une solution d'hémoglobine purifiée chez huit volontaires sains (Sirieix et al, 1997).

Enfin, dans les années 1990, les chercheurs expérimentèrent la préparation d'hémoglobine au moyen des biotechnologies. Ces nouvelles méthodes de génie génétique consistaient à faire produire de l'hémoglobine, naturelle ou modifiée, à des bactéries (*Escherichia coli*), levures (levure de bière) ou animaux transgéniques (porc) (Labrude, 1992).

2. SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE LIBRE NON MODIFIEE

L'emploi comme transporteur d'oxygène de solutions d'hémoglobine libre provenant de la lyse d'érythrocytes périmés, a été étudié depuis plus d'un demi siècle. Aujourd'hui, il est possible d'affirmer que ces solutions présentent de multiples inconvénients, parmi lesquels :

- une pression oncotique importante. La concentration d'une solution d'hémoglobine libre ne doit pas excéder 7 g/dL afin de respecter la pression oncotique du plasma. Cette contrainte limite la quantité d'oxygène transportée par l'hémoglobine (Labrude, 1992).

- une forte affinité pour l'oxygène. En dehors des globules rouges et en l'absence de son effecteur allostérique, le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG), la P_{50} de l'hémoglobine (pression partielle pour laquelle l'hémoglobine est saturée à 50 % d'oxygène) est déplacée vers les faibles tensions (12-14 mm Hg). L'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène devient alors trop élevée pour permettre une délivrance adéquate de l'oxygène aux tissus (Riess, 1995 b ; Rémy et al, 1999).

- une persistance intravasculaire limitée. En phase extracellulaire, l'hémoglobine tétramérique $\alpha_2\beta_2$ se dissocie facilement en dimères $\alpha\beta$. Ces dimères sont rapidement éliminés du flux sanguin par le système réticulohistiocytaire et par filtration glomérulaire. La persistance intravasculaire de l'hémoglobine libre est donc très courte, obligeant à administrer des quantités importantes pour obtenir une efficacité suffisante. Dans ces conditions, la quantité de dimères filtrée par le rein devient excessive et est à l'origine d'une toxicité rénale (Riess, 1995 b; Rémy et al, 1999).

- la survenue d'effets indésirables. L'hémoglobine libre est capable de réagir avec le monoxyde d'azote (NO) libéré par les cellules endothéliales. Cette réaction aboutit à la production de radicaux libres toxiques (Alayash, 1998). Elle serait aussi la cause probable des phénomènes de vasoconstriction observés par de nombreux auteurs après l'injection de solutions d'hémoglobine. De plus, tous les essais cliniques réalisés avec des solutions

d'hémoglobine libre non purifiée montrèrent que ces solutions étaient fortement toxiques. La toxicité de ces solutions fut attribuée à la présence, dans ces préparations, de contaminants membranaires lipidiques et protéiques. L'obtention d'une hémoglobine purifiée, dépourvue de stroma (Stroma Free Hemoglobin ou SFH), c'est-à-dire des restes de la membrane cellulaire, permit de réduire considérablement ces effets indésirables (Lamy et al, 1996).

- la formation de méthémoglobine non fonctionnelle lors du stockage (Lamy et al, 1996).

Malgré une purification soignée de l'hémoglobine, il est devenu rapidement évident que l'utilisation des solutions d'hémoglobine libre non modifiée pouvait être dangereuse. Actuellement on préfère utiliser comme transporteur d'oxygène des solutions d'hémoglobine modifiée.

3. SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE MODIFIEE

L'hémoglobine ne pouvant être administrée sous la forme d'une simple solution, il fallait la modifier dans l'espoir de pouvoir l'utiliser comme transporteur d'oxygène. Des solutions d'hémoglobine modifiée sont désormais fabriquées par plusieurs compagnies pharmaceutiques. Chaque société utilise des hémoglobines de natures diverses et des techniques de modification différentes.

3.1. Caractéristiques des solutions d'hémoglobine modifiée

Pour être utilisables cliniquement, les solutions d'hémoglobine modifiée doivent présenter, en l'absence de 2,3-DPG, une affinité normale pour l'oxygène. De ce fait, elles doivent posséder des propriétés de transport au moins équivalentes à celles du sang, avec une P_{50} proche de 26 mm Hg.

Leur persistance intravasculaire doit également être suffisante afin d'éviter les administrations répétées, qui pourraient endommager la fonction rénale.

Enfin, la viscosité, la pression oncotique, l'osmolarité et les propriétés rhéologiques de ces solutions doivent être comparables à celles du sang (Sirieix et al, 1997).

3.2. Nature de l'hémoglobine

3.2.1. Hémoglobine humaine

Les solutions d'hémoglobine modifiée peuvent être fabriquées à partir de sang humain en utilisant généralement des concentrés érythrocytaires périmés. Dans ce cas, la disponibilité de la matière première reste évidemment limitée (Sirieix et al, 1997).

3.2.2. Hémoglobine bovine

La préparation de solutions d'hémoglobine modifiée à partir de sang bovin permet de surmonter la difficulté précédente mais pose les problèmes inhérents aux produits biologiques d'origine animale. L'utilisation de cette hémoglobine reste donc limitée en raison

des risques de transmission de l'encéphalopathie spongiforme et des difficultés de purification (Riess, 1995 b ; Sirieix et al, 1997).

3.2.3. Hémoglobine recombinante

Les biotechnologies peuvent utiliser des bactéries, levures ou animaux transgéniques pour la production d'hémoglobine modifiée recombinante.

3.3. Techniques de modifications

L'hémoglobine naturelle peut être modifiée chimiquement ou génétiquement.

3.3.1. Méthodes chimiques

Les modifications chimiques sont toujours réalisées sur une hémoglobine, humaine ou bovine, purifiée c'est-à-dire dépourvue de stroma (SFH).

3.3.1.1. La pyridoxylation

L'hémoglobine pyridoxylée est obtenue par le couplage covalent de phosphate de pyridoxal sur une fonction amine de l'hémoglobine. Le phosphate de pyridoxal, par effet mimétique, simule l'effecteur allostérique naturel (2,3-DPG) perdu lors de la lyse des érythrocytes. Cette modification chimique restaure simplement une affinité normale de l'hémoglobine pour l'oxygène et a permis le développement de produits faisant l'objet d'essais cliniques (tableau I-1 page 13) (Sirieix et al, 1997).

3.3.1.2. Le pontage intramoléculaire

Il consiste à relier, par l'intermédiaire d'un pont covalent, les groupes amino terminaux des chaînes α ou β de la molécule d'hémoglobine (figure I-1).

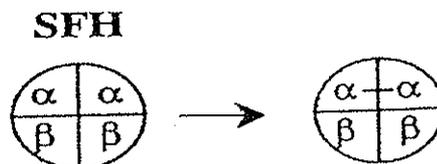


Figure I-1. Hémoglobine modifiée par pontage intramoléculaire (α - α) (Rémy et al, 1999).

Parmi les approches les plus prometteuses, il faut citer la réalisation de liaisons covalentes avec le "diaspirine", c'est-à-dire le bis (3,5-dibromosalicyl) fumarate, qui lie solidement les deux monomères α . Cette modification limite la dissociation du tétramère en dimères $\alpha\beta$, ce qui prolonge la persistance intravasculaire de l'hémoglobine et réduit sa toxicité rénale. Son affinité pour l'oxygène est également diminuée (Riess, 1995 b ; Lamy et al, 1996 ; Sirieix et al, 1997).

3.3.1.3. La polymérisation

Cette technique consiste à relier plusieurs molécules d'hémoglobine entre elles en utilisant le glutaraldehyde ou le O-raffinose (figure I-2).

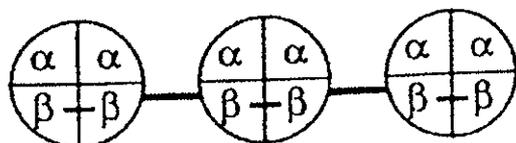


Figure I-2. Hémoglobine polymérisée (Rémy et al, 1999).

La polymérisation de l'hémoglobine, comme le pontage intramoléculaire, est principalement destinée à ralentir l'élimination rénale. L'augmentation de la masse moléculaire permet aussi de réduire la pression oncotique et de limiter l'oxydation de l'hémoglobine. Diverses hémoglobines polymérisées ont été décrites et font l'objet d'essais cliniques (tableau I-1 page 13) (Riess, 1995 b ; Sirieix et al, 1997 ; Tsuchida, 1998).

3.3.1.4. La conjugaison

Cette méthode consiste à greffer l'hémoglobine sur un polymère hémocompatible (dextran, polyoxyéthylène, hydroxyéthylamidon) (figure I-3).

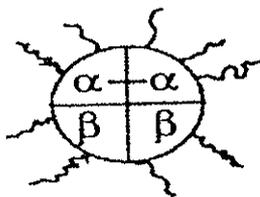


Figure I-3. Hémoglobine conjuguée (Rémy et al, 1999).

La conjugaison empêche la fixation du monoxyde d'azote sur l'hémoglobine et atténue les effets secondaires vasoconstricteurs. Ces conjugués possèdent également une affinité plus faible pour l'oxygène. L'accroissement des masses moléculaires aboutit aussi à une diminution de la pression oncotique, ce qui permet d'augmenter la concentration du conjugué d'hémoglobine. Enfin, cette modification ralentit la conversion en méthémoglobine lors du stockage de la solution (Labrude, 1992 ; Riess, 1995 b).

3.3.1.5. L'encapsulation

L'encapsulation de l'hémoglobine (figure I-4) au sein de liposomes peut être réalisée afin de prolonger la durée d'action des hémoglobines modifiées et de limiter leur interférence avec le monoxyde d'azote.

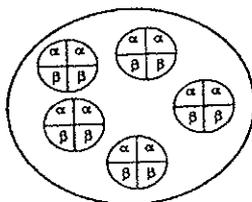


Figure I-4. Hémoglobine encapsulée (Rémy et al, 1999).

Ces hémoglobines encapsulées ont une forte affinité pour l'oxygène, sont stables pendant leur stockage, ont une demi-vie acceptable (jusqu'à 20 heures) et n'ont pas de toxicité rénale, ni d'antigénicité. Leur préparation en grande quantité est toutefois encore difficile. Leur phagocytose massive par les macrophages hépatiques ou spléniques, conduisant à une saturation du système réticulohistiocytaire, reste un problème majeur (Sirieix et al, 1997 ; Lamy et al, 1996). En 1999, encore aucune hémoglobine encapsulée n'avait fait l'objet d'un développement clinique.

3.3.2. Génie génétique

Il est possible de produire de l'hémoglobine recombinante en introduisant des gènes, modifiés ou non, de la molécule d'hémoglobine dans différents systèmes comme des bactéries, des levures ou des animaux transgéniques. La société Somatogen a ainsi réussi à faire produire à *E. coli* un mutant de l'hémoglobine humaine dans lequel les deux chaînes α

sont liées par une glycine. Cette liaison empêche la dissociation du tétramère en dimères, ce qui augmente la persistance intravasculaire de l'hémoglobine et réduit sa toxicité rénale.

Pour l'instant, le coût élevé et le faible rendement de ces techniques de génie génétique limitent encore leur utilisation (Looker et al, 1992 ; Lamy et al, 1996).

3.4. Indications - développement

La capacité des solutions d'hémoglobine modifiée à restaurer la volémie et à véhiculer l'oxygène rendrait leur emploi intéressant dans de nombreuses situations (Winslow, 1998; Remy et al, 1999) :

- choc hémorragique
- hémodilution
- infarctus du myocarde, angioplastie
- accident vasculaire cérébral
- chirurgie
- cancérologie

Les solutions d'hémoglobine modifiée ont déjà donné naissance à de nombreuses spécialités. En 1999, elles faisaient l'objet d'essais cliniques en vue de préciser leurs indications (tableau I-1 page 13) et leurs conditions d'utilisation. La spécialité Hemassist[®], est la seule exception. Ses essais ont été stoppés en 1998 en raison d'une mortalité importante chez les patients traités (Tsuchida, 1998). La spécialité avait pourtant fait ses preuves dans des études de phase III, à la dose de 750 mL (3 unités de 250 mL). Deux études chez l'homme (chirurgie orthopédique et cardiaque) avait permis une économie sanguine de 19 % en chirurgie cardiaque et de 33 % en chirurgie orthopédique, sans effets indésirables (Remy et al, 1999).

3.5. Effets secondaires

3.5.1. Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est l'un des effets secondaires les plus fréquemment observés après l'administration intravasculaire de solutions d'hémoglobine modifiée. Il est admis que cet effet hypertenseur est en partie lié à l'inhibition du NO, après fixation de ce dernier sur l'hémoglobine (Alayash, 1998). De plus, il est probable que les solutions d'hémoglobine

stimulent la libération des catécholamines et d'autres agents vasoconstricteurs comme l'endothéline (Sirieix et al, 1997).

L'encapsulation et la conjugaison de l'hémoglobine libre sont deux techniques de modification développées pour limiter cet effet indésirable. Leur principal objectif serait d'empêcher la fixation du NO sur l'hémoglobine.

3.5.2. Néphrotoxicité

Les altérations de la fonction rénale, secondaires à l'administration des solutions d'hémoglobine, sont en relation avec la dissociation du tétramère en dimères, éliminés ultérieurement par le rein (Lamy et al, 1996). Cette toxicité rénale pourrait être réduite en renforçant la cohésion entre les monomères constitutifs de l'hémoglobine. La polymérisation et le pontage intramoléculaire sont deux techniques de modification permettant d'y parvenir.

3.5.3. Divers

Des effets secondaires mineurs (céphalées, myalgies, frissons, hyperthermie) ont parfois été observés, malgré l'utilisation d'hémoglobine modifiée dépourvue de stroma. Tous ceux-ci régressaient rapidement après l'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Sirieix et al, 1997).

Tableau I-1. Les solutions d'hémoglobine modifiée, en bref (Tsuchida, 1998 ; Winslow 1998 ; Rémy et al, 1999).

Spécialités (société)	Nature de l'hémoglobine (Hb)	Modification	Persistence intravasculaire (h)	Pression oncotique	Viscosité	Vasoactivité	Indications	Essais cliniques (1997)
Hemassist® (Baxter Health care)	Humaine	Liaison interne α - α par diaspirine	12	↗	↗	+++	Traumatologie Hémodilution	Phase III Phase III Essais suspendus en 1998
		Substitution d'un acide aminé \oplus liaison interne α - α par glycine		↗	↗		Hémodilution Erythropoïèse	Phase II Phase I / II
Hemopure® (Biopure)	Bovine	Polymérisation par glutaraldéhyde	12-24	↗	↗	++	Hémodilution Anémie falciforme	Phase II Phase II
Hemolink® (Hemosol)	Humaine	Polymérisation par O-raffinose		↗	↗		Traumatologie Hémodilution Traumatologie	Phase II Phase II Phase II
Polyheme® (Northfield)	Humaine	Pyridoxylation \oplus polymérisation glutaraldéhyde	24-48	↗	↗	++	Chirurgie	Phase III
PHP (Apex)	Humaine	Pyridoxylation \oplus conjugaison à un PEG		↗	↗		Choc septique	Phase I / II
PEG-Hb (Enzon)	Bovine	Conjugaison à un PEG	24-48	↗	↗	++	Tumeurs solides radiosensibles	Phase II

Chapitre II

LES PERFLUOROCARBURES

1. HISTORIQUE

C'est en 1926 que deux français (Lebeau et Damiens) synthétisent pour la première fois des perfluorocarbures.

Ces molécules présentent une remarquable inertie chimique qui facilita la manipulation des dérivés d'uranium de la première bombe atomique dans les années 1940 (projet Manhattan) (Charles, 2000).

A cette époque, personne ne parlait encore de transporteur d'oxygène, voire même de "substitut sanguin" et il faut attendre 1965 pour faire le rapprochement. Cette année là, Howlett utilise la capacité des fluorocarbures à dissoudre l'oxygène. Grâce à cette propriété, il réalise de façon satisfaisante l'oxygénation extracorporelle du sang (Riess et Follana, 1984).

En 1966, Clark et Gollan pensent pouvoir réaliser la prévention des accidents de plongée à l'aide d'une solution de fluorocarbures. Pour cela, ils décident d'immerger totalement une souris dans du F - n butyltétrahydrofurane (FX - 80) pur saturé d'oxygène. Il fut impossible de "noyer" l'animal puisque, contraint de respirer le liquide, le mammifère y trouvait sous forme dissout(e) l'oxygène nécessaire à sa survie (Clark et Gollan, 1966).

Après cette expérience spectaculaire, l'idée de faire des fluorocarbures des transporteurs d'oxygène s'impose. Pourtant, l'utilisation intravasculaire de ces composés semble compromise, car les fluorocarbures sont insolubles dans l'eau et donc dans le plasma. Pour Sloviter et Kamimoto, le problème paraît bénin. En 1967, ils réalisent les premières émulsions de FX - 80 résolvant à la fois le problème du transport simultané des gaz respiratoires et des sels minéraux, insolubles dans les composés purs (Gille et al, 1984).

En 1968, c'est au tour de Geyer de franchir une nouvelle étape. Il procède, chez un rat, aux premières injections intravasculaires d'émulsions de Fx - 80. Malheureusement, la volatilité du PFC est telle qu'elle est à l'origine du décès de l'animal par emphysème pulmonaire.

Les efforts de Geyer sont récompensés en 1973. En effet, l'injection d'un autre fluorocarbure (perfluorotributylamine) permet la survie de rats dépourvus de plus de 95 % de leur sang (Castro et al, 1984). Certains se mettent alors à parler, à tort, de "sang artificiel". D'autant plus que la même année, les médecins de l'armée de l'air américaine publient les résultats encourageants des premiers essais cliniques débutés en 1970. 25 hommes atteints d'hépatite virale gravissime étaient inclus dans cet essai. Aucune thérapeutique ne se révélait efficace. En dernier recours, il est réalisé des exsanguino transfusions avec une émulsion de fluorocarbures, suivies de transfusions sanguines. Neuf de ces patients furent guéris (Gille et al, 1984).

Mais l'utilisation des fluorocarbures en thérapeutique humaine aurait pu s'arrêter là pour la simple et bonne raison que la perfluorotributylamine de Geyer était retenue dans les organes du système réticuloendothélial pendant plusieurs années. Il fallait impérativement surmonter cet obstacle et trouver des fluorocarbures plus rapidement éliminés.

En 1974, Clark d'un côté, Naïto de l'autre, découvrent la perfluorodécane, éliminée de l'organisme en quelques semaines. Le développement d'un substitut sanguin à base de ce nouveau fluorocarbure apparaît possible. La Green Cross Corporation (Osaka, Japon) essaie alors de commercialiser la perfluorodécane sous le nom de Fluosol-DC®. Malheureusement, l'utilisation médicale de ce produit échoue rapidement car les surfactifs utilisés ne rendent pas l'émulsion suffisamment stable. En revanche, l'addition de perfluorotripropylamine dont les émulsions sont beaucoup plus stables, permet de stabiliser l'ensemble (Riess et Follana, 1984).

L'association perfluorodécane - perfluorotripropylamine fut commercialisée sous la forme d'émulsion par la firme japonaise en 1978. Cette émulsion portait le nom de Fluosol-DA® ou Fluosol®. Les premières expérimentations humaines eurent lieu en 1979. Les autorisations gouvernementales furent enregistrées en 1982.

Au début des années 1980, les recherches visant à améliorer la qualité des émulsions s'intensifient. C'est ainsi qu'apparaissent, en 1986, les émulsions de fluorocarbures de deuxième génération. Le chef de file est le bromure de perfluorooctyle ou "perflubron" dont l'émulsion est commercialisée par Alliance Pharmaceutique (San Diego, USA) sous le nom d'Oxygent®, (Remy et al, 1999).

2. STRUCTURE - NOMENCLATURE

Les perfluorocarbures peuvent être répartis en deux groupes distincts :

- les dérivés à structure cyclique avec comme chef de file la perfluorodécaline
- les dérivés à structure linéaire dont fait partie le bromure de perfluorooctyle

Quel que soit le groupe auxquels ils appartiennent, les fluorocarbures sont majoritairement constitués d'atomes de carbone et de fluor. Certains composés possèdent en plus dans leur structure un atome d'azote (perfluorotripropylamine), de brome (bromure de perfluorooctyle) ou de chlore (perfluorodichlorooctane) (tableau II-1 page 19).

Tableau II-1. Dénomination, structure, formule brute et masse moléculaire des fluorocarbures les plus étudiés en vue d'une utilisation comme transporteurs d'oxygène injectables (classement croissant en fonction de la masse moléculaire) (Krafft, 1998 ; Rüdiger et al, 2000).

Dénomination	Structure	Formule brute	Masse moléculaire
Perfluorodécaline (FDC)		$C_{10}F_{18}$	462
Bis (perfluorobutyl) éthène (F-44E)		$C_{10}F_{18}H_2$	464
Perfluorodichlorooctane (PFDCO)		$C_8F_{16}Cl_2$	471
Perfluorométhylisoquinoléine (FMIQ)		$C_{10}F_{19}N$	495
Bromure de perfluorooctyle (PFOB, perflubron)		$C_8F_{17}Br$	499
Perfluorotripropylamine (FTPA)		$(C_3F_7)_3N$	521
Perfluorométhyladamantane (FMA = FDN)		$C_{12}F_{22}$	562
Perfluorométhylcyclohexyl pipéridine (FMCP)		$C_{12}F_{23}N$	596

3. SYNTHÈSE

Matériaux de la famille du téflon, les perfluorocarbures sont des hydrocarbures synthétiques inertes, dans lesquels la totalité ou une partie des atomes d'hydrogène a été remplacée par du fluor (Rüdiger, 2000).

Ils peuvent être produits de deux façon différentes :

- par substitution
- par oligomérisation

3.1. Méthode substitutive

Cette méthode est basée sur la substitution de tous les atomes d'hydrogène d'un composé hydrocarboné, par des atomes de fluor, et aussi sur la saturation des liaisons multiples quand elles existent (Rüdiger, 2000). Elle est valable pour la préparation de fluorocarbures cycliques, polycycliques ou ramifiés (Krafft, 1998).

Cette technique présente un inconvénient majeur. En effet, la substitution d'un atome d'hydrogène par un atome de fluor libère une quantité d'énergie importante. Si tous les atomes d'hydrogène sont substitués, la quantité d'énergie produite devient très grande. Cette énergie peut alors entraîner la rupture de certaines liaisons et aboutir à la synthèse de composés non désirés, parfois toxiques.

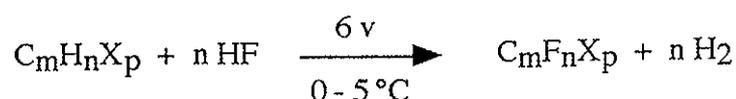
L'élimination complète de ces impuretés est une nécessité absolue pour l'utilisation médicale des fluorocarbures. L'emploi de la méthode substitutive pour la synthèse des fluorocarbures impose obligatoirement une purification fastidieuse (Krafft, 1998).

Les différentes techniques permettant de réaliser la substitution sont présentées ci-dessous.

3.1.1. La fluoration électrochimique

3.1.1.1. Principe

La fluoration électrochimique consiste à faire subir au substrat hydrogéné une électrolyse dans le fluorure d'hydrogène anhydre. Quand le potentiel appliqué au niveau des électrodes est suffisamment élevé (≈ 6 V), le substrat est, en principe, entièrement fluoré selon la réaction (Riess et Leblanc, 1988) :



Parmi les méthodes substitutives, la fluoration électrochimique est la technique la plus utilisée notamment pour la synthèse de fluorocarbures aminés (FTPA, FTBA). Les principaux fluorocarbures synthétisés par cette technique sont les suivants : FTPA, FMIQ, FMCP, PFDCO.

3.1.1.2. Avantages

D'un point de vue industriel, le principal avantage de la fluoration électrochimique est l'utilisation de fluorure d'hydrogène anhydre, en raison de son faible coût (Riess et Leblanc, 1988).

3.1.1.3. Inconvénients

Les inconvénients de l'ECF incluent (Riess et Leblanc, 1988) :

- un rendement chimique très faible, de l'ordre de 30 %
- une sélectivité médiocre : le produit final correspond plus à un mélange complexe, qu'à un fluorocarbure unique. La procédure de purification est ici très fastidieuse.
- un manque de reproductibilité.

3.1.2. La fluoration par les fluorures métalliques à valences élevées

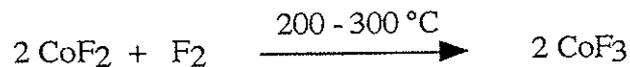
3.1.2.1. Principe

La fluoration par les fluorures métalliques est une méthode complexe utilisant principalement le trifluorure de cobalt (CoF_3) ou le fluorure d'argent (AgF) ou de manganèse (MnF_3). Il s'agit d'un procédé à deux étapes, qui nécessite une température élevée (200 - 300 °C) (Riess et Leblanc, 1988).

La première étape correspond à la fluoration elle-même :



La deuxième étape a pour but de régénérer l'agent métallique fluoré servant à la réaction.



En pratique, le trifluorure de cobalt doit être employé en large excès : 3 kg pour 50 g de substrat.

Le principal fluorocarbure synthétisé par cette méthode est la perfluorodécane.

3.1.2.2. Avantages

Il est difficile de trouver des avantages à cette méthode, si ce n'est peut-être qu'elle permet l'obtention de la perfluorodécane, autrefois largement utilisée avec la spécialité Fluosol®.

3.1.2.3. Inconvénients

Cette technique présente de nombreux inconvénients (Riess et Leblanc, 1988) :

- une sélectivité très faible.
- un coût excessif. Le fluor moléculaire utilisé dans la deuxième étape est beaucoup plus cher que le fluorure d'hydrogène anhydre utilisé dans la fluoration électrochimique.
- une purification avec de nombreuses étapes (distillation, chromatographie...) vient renforcer le coût excessif de la méthode.

3.2.2. Avantages

L'oligomérisation présente deux avantages non négligeables par rapport à la méthode substitutive. Il s'agit d'une technique à la fois reproductible et fournissant des produits d'une grande pureté. Ces deux caractéristiques font de cette méthode l'une des plus appropriées pour la production en grande quantité de fluorocarbures destinés à l'administration in-vivo (Riess et Leblanc, 1988).

3.2.3. Inconvénients

L'oligomérisation présente le désavantage de ne pas permettre la synthèse de fluorocarbures cycliques. Cet inconvénient paraît mineur dans la mesure où le fluorocarbure le plus étudié actuellement est un composé linéaire : le bromure de perfluorooctyle contenu dans la spécialité Oxygent®.

4. PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES

Les perfluorocarbures sont des liquides volatils (Lamy et al, 1996), non corrosifs (Lowe, 1998), incolores et inodores (Keipert, 1998) dont la densité varie de 1,5 à 2 (Gille et al, 1984).

Insolubles dans l'eau, ils doivent être administrés sous forme d'émulsion. Dans ces émulsions, la faible taille des gouttelettes de fluorocarbures (inférieure à 0,2 μm) est une caractéristique intéressante pour l'utilisation intravasculaire de ces composés.

Mais ce qui confère aux fluorocarbures des propriétés bien spécifiques est incontestablement la présence de nombreux atomes de fluor dans leur structure.

4.1. Forces intramoléculaires élevées

Le volume atomique du fluor étant plus important que celui de l'atome d'hydrogène (rayon de van der Waals : 1,47 Å pour le fluor contre 1,20 Å pour l'hydrogène) (Wakselman, 1999), les chaînes perfluorées sont donc plus volumineuses que leurs homologues hydrocarbonées. Leur rigidité est également supérieure.

De plus, la simple liaison C-F est la liaison la plus solide jamais rencontrée avec un carbone (énergie de dissociation 485,6 kJ pour C-F contre 425 kJ pour C-H) (Krafft, 1998). Cette énergie de dissociation augmente avec le nombre d'atomes de fluors substitués sur le même carbone (CF_3 : 531 kJ. mol⁻¹).

En conséquence, il existe des forces intramoléculaires très élevées au sein des fluorocarbures, ce qui leur confère une immense stabilité. Ce sont des composés dotés d'une inertie chimique, thermique et biologique exceptionnelle (Krafft, 2001 a).

4.2. Forces intermoléculaires faibles

Non seulement, le fluor est très électronégatif mais il est également faiblement polarisable (Meinert, 1992). C'est pourquoi, les interactions de van der Waals qui existent entre les chaînes fluorées sont très faibles (Ravis et al, 1991). Il en résulte pour les fluorocarbures de nombreuses propriétés (Riess et Krafft, 1999) comme :

- une tension de surface minimale, responsable d'une capacité d'étalement remarquable.
- une pression de vapeur élevée.
- une grande fluidité.
- une capacité inégalable à solubiliser les gaz O₂, CO₂, N₂...

4.3. Composés hydrophobes et lipophobes

La largeur de la chaîne fluorée ainsi que la faible polarisation de l'atome de fluor attribuent aux molécules de fluorocarbures un pouvoir hydrophobe important. Considérablement plus hydrophobes que leurs analogues hydrogénés, les chaînes fluorées sont en même temps lipophobes, ce qui est une caractéristique tout à fait unique.

4.4. L'électronégativité du fluor : un avantage certain

Le fluor est l'élément le plus électronégatif de la classification périodique de Mendeleïev. La densité électronique qui l'entoure est loin d'être négligeable puisqu'elle joue le rôle de "bouclier" en protégeant le fluorocarbure des éventuels "agresseurs" (Riess et Keipert, 1998).

L'élément fluor confère aux molécules perfluorées un ensemble de propriétés particulières, d'où découle un vaste potentiel d'applications en médecine. Ainsi, les fluorocarbures sont les meilleurs solvants des gaz que l'on puisse concevoir. Comparativement aux hydrocarbures de même structure, ils sont beaucoup plus inertes, plus denses, plus fluides, plus hydrophobes et ont un coefficient d'étalement plus élevé. L'absence de protons et pour certains la présence d'un atome lourd en font des agents de contraste pour le diagnostic (Riess, 1992 b).

5. DIFFERENTES GENERATIONS D'EMULSIONS

5.1. Les émulsions de fluorocarbures de première génération

5.1.1. Présentation

La première génération d'émulsions de perfluorocarbures injectables (tableau II-2 page 31) a été mise au point vers la fin des années 1970 et le début des années 1980. Le représentant principal de cette génération était le Fluosol®, développé en 1978 par la Green Cross Corporation (Osaka, Japon). Il s'agissait d'un mélange de perfluorodécane (14 % m/v) et de perfluorotripropylamine (6 % m/v) stabilisé par du Pluronic F-68 (2,7 % m/v) (Naito et Yokoyama, 1978). Les études cliniques avec le Fluosol®, ont été conduites dans de nombreux pays incluant les Etats-Unis, le Canada, la Hollande, le Japon et l'Italie (Ravis et al, 1991 ; Mitsuno et Ohyanagi, 1985, Spence et al, 1994). C'est finalement aux Etats-Unis, en 1989 que le Fluosol®, a été autorisé par la Food and Drug Administration, pour l'oxygénation du myocarde pendant l'angioplastie coronarienne transluminale percutanée (Lowe, 1998). Après quelques années d'utilisation, il fut retiré du marché en 1994, car l'émulsion n'était pas suffisamment stable.

Pendant la même période, d'autres préparations analogues ont également été développées en Russie (Obraztsov et al, 1994) et en Chine (Lowe, 1998) sous les noms respectifs de Perftran®, ou Ftorosan®, et Emulsion N°II®. L'Emulsion N°II® avait une composition similaire à celle du Fluosol®. Le Perftran®, se distinguait uniquement par la présence de perfluorométhylcyclopipéridine à la place de la perfluorotripropylamine. Les essais cliniques du Perftran®, débutèrent en 1984 pour être rapidement suspendus en 1986 en raison de résultats défavorables. Ils reprirent en septembre 1992 (Obraztsov et al, 1994). La spécialité fut mise sur le marché russe en 1996 (Krafft, 1998).

Une quatrième émulsion de première génération portait le nom d'Oxyphérol®, ou Fluosol 43®. Cette émulsion à base de perfluorotributylamine fut disponible pendant de nombreuses années pour l'utilisation expérimentale. Son utilisation clinique fut toujours impossible puisque la perfluorotributylamine était retenue dans les organes du système réticuloendothélial pendant plusieurs années (Krafft, 1998).

5.1.2. Caractéristiques

Les émulsions de fluorocarbures de première génération sont loin d'être idéales en termes de capacité de transport d'oxygène. Leur efficacité limitée à véhiculer l'oxygène est liée à la fois à leur faible teneur en fluorocarbures (20 % en poids soit environ 11 % en volume) et leur persistance intravasculaire limitée (Leese et al, 2000).

Par ailleurs, ces émulsions posent un problème de stabilité qui oblige à les transporter et à les stocker à l'état congelé et rend leur emploi malaisé. Il est en effet nécessaire de décongeler l'émulsion mère puis de la mélanger avec deux solutions annexes, selon un protocole long et contraignant, avant de pouvoir l'utiliser (Riess, 1992 b). L'émulsion, une fois reconstituée, doit alors être utilisée dans les huit heures (Flaim, 1994 a).

Parmi les autres défauts de ces émulsions de première génération, il faut mentionner la rétention prolongée de la perfluorotripropylamine dans les organes du système réticulohistiocytaire et les effets secondaires (activation du complément) observés avec le principal tensioactif utilisé, le Pluronic F-68® (Vercellotti et al, 1982).

Les équipes de recherche se sont progressivement orientées vers le développement d'une seconde génération d'émulsions, afin de palier les nombreuses imperfections de cette première génération de fluorocarbures.

5.2. Les émulsions de fluorocarbures de deuxième génération

5.2.1. Présentation

Les émulsions de perfluorocarbures de deuxième génération (tableau II-3 page 32) sont apparues à partir de 1986 (Flaim, 1994 a).

Au début des années 1990, la littérature faisait état de cinq émulsions destinées à l'administration intravasculaire :

- FMIQ Emulsion®
- Addox®
- Therox®

- Oxyfluor®
- Oxygent® (AFO144)

Les émulsions FMIQ Emulsion®, Addox®, et Therox®, ont rapidement été abandonnées. Actuellement, les seules émulsions de deuxième génération en cours d'évaluation clinique sont l'Oxyfluor®, qui renferme 78 % m/v de perfluorodichlorooctane, et l'Oxygent®, préparé avec 60 % m/v de bromure de perfluorooctyle (Krafft, 1998).

L'Oxygent®, représente le chef de file de cette seconde génération d'émulsion. L'utilisation de ce transporteur d'oxygène pendant l'hémodilution normovolémique périopératoire devrait réduire le recours à la transfusion de sang autologue tout en augmentant la marge de sécurité pour le patient (Riess, 1992 b ; Keipert, 1998). Les essais de phase III sont en cours aux Etats-Unis et la spécialité devrait être commercialisée très prochainement.

5.2.2. Caractéristiques

Ces nouvelles émulsions sont beaucoup plus efficaces que les précédentes. Leur concentration en fluorocarbures, et donc leur capacité de transport de l'oxygène, est quatre à cinq fois supérieure à celle du Fluosol®. La viscosité des préparations, qui augmente avec la concentration en fluorocarbure, reste pourtant acceptable. En effet, il a pu être trouvé un compromis satisfaisant en optimisant les proportions relatives des ingrédients.

Les émulsions de deuxième génération sont également beaucoup plus stables puisqu'elles peuvent être stérilisées à 121 °C puis conservées pendant un an à 5 -10 °C, ou plusieurs mois à température ambiante. Il en résulte aussi qu'elles sont prêtes à l'emploi (Riess, 1992 b).

D'un point de vue galénique, toutes ces émulsions sont stabilisées par des phospholipides de jaune d'œuf (Zuck et Riess, 1994). Ces tensioactifs présentent l'avantage d'être bien acceptés dans la pratique médicale depuis le développement des émulsions lipidiques injectables pour la nutrition parentérale (Rotenberg et al, 1991).

Seule ombre au tableau, ces émulsions présentent une persistance intravasculaire encore limitée avec des demi-vies (de présence) qui ne dépassent pas douze heures. Cette caractéristique limite les applications envisageables actuellement (Riess, 1992 b).

5.3. Vers une troisième génération d'émulsions

L'objectif actuel des recherches est de prolonger la persistance intravasculaire des émulsions, de réduire leurs effets secondaires et d'augmenter encore leur stabilité. De nouveaux procédés de stabilisation ont d'ailleurs été mis au point, permettant le stockage des émulsions à température ambiante (Riess et Postel, 1992). Les travaux sont moins avancés en ce qui concerne la persistance intravasculaire, mais diverses voies sont explorées. A n'en pas douter, la troisième génération d'émulsions verra sur ce plan des progrès significatifs (Riess, 2001).

NB : Outre les émulsions, les perfluorocarbures peuvent également être employés dans le domaine médical sous forme de liquides purs. Deux spécialités à base de bromure de perfluorooctyle (Liquivent® et Imagent®) sont actuellement développées.

Tableau II-2. Les émulsions de fluorocarbures de première génération (Krafft, 1998 ; Rüdiger et al, 2000).

Nom commercial	Fluorocarbure	Concentration		Surfactant	Compagnie	Utilisation
		v/v	m/v			
Fluosol®	FDC FTPA	11%	20%	Poloxamer PL jaune d'œuf	Green Cross Corporation (Japon)	Autorisé aux USA en 1989 pour l'ACTP. Retiré en 1994
Perforan®	FDC FMCP	11%	20%	Poloxamer PL jaune d'œuf	Perforan Compagnie (Russie)	Autorisé en Russie depuis 1996, dans les situations de choc hémorragique
Emulsion n° II®	FDC FTPA	11%	20%	Poloxamer PL jaune d'œuf	Institute Organic Chemistry (Chine)	-
Oxypherol®	FTBA	11%	20%	Poloxamer	Green Cross Corporation (Japon)	Seulement pour usage expérimental

Tableau II-3. Les émulsions de fluorocarbures de deuxième génération (Krafft, 1998 ; Rüdiger et al, 2000).

Nom commercial	Fluorocarbure	Concentration		Surfactant	Compagnie	Utilisation (année 2000)
		v/v	m/v			
FMIQ Emulsion®	FMIQ	13%	25%	PL jaune d'œuf	Green Cross Corporation (Japon)	Abandonné
Addox®	FMA	21%	40%	PL jaune d'œuf	Adamantech (USA)	Abandonné
Therox®	F-44E	40%	78%	PL jaune d'œuf	Dupont (USA)	Seulement pour usage expérimental
Oxyfluor®	PFDCO	40%	78%	PL jaune d'œuf	Hemagen (USA)	Cardioplégie : essais cliniques phase II (1997)
Oxygent®	PFOB	32%	60%	PL jaune d'œuf PFDB	Alliance Pharmaceutical Corporation (USA)	Hémodilution : essais cliniques phase III

6. TRANSPORT ET DELIVRANCE D'OXYGENE PAR LES FLUOROCARBURES

6.1. Principes

L'utilisation des perfluorocarbures, en tant que transporteur d'oxygène injectable, résulte essentiellement de leur grande inertie chimique et biologique ainsi que de leur capacité exceptionnelle à solubiliser les gaz.

6.1.1. De l'oxygène dissous...

Le caractère répulsif des molécules perfluorées, relié à la faiblesse des forces intermoléculaires, facilite l'insertion des gaz (O_2 , CO_2 , N_2 ...) entre les molécules de fluorocarbures. Les fluorocarbures qui fonctionnent comme de simples solvants sont donc capables de dissoudre facilement les gaz respiratoires (Riess, 1984). Mais, il n'existe aucune liaison spécifique entre fluorocarbures et oxygène, contrairement à l'hémoglobine où l'oxygène est fixé chimiquement par une liaison de coordination.

La quantité d'oxygène transportée par les fluorocarbures suit la loi de Henry, c'est à dire qu'elle augmente linéairement avec la pression partielle du gaz (figure II-1 page 34). Il n'existe donc pas de phénomène de saturation avec les fluorocarbures, à la différence de l'hémoglobine.

Ainsi, les émulsions de fluorocarbures seront d'autant plus efficaces que l'atmosphère respirée par le patient sera enrichie en oxygène (Riess, 1995 b). La quantité d'oxygène dissous, et donc disponible peut par conséquent être multipliée par cinq en utilisant de l'oxygène pur à la place de l'air. Or, respirer de l'oxygène pur est une pratique courante dans les milieux sportifs et hospitaliers (blocs opératoires) (Krafft, 2001 b). L'emploi de fortes concentrations d'oxygène qui pourraient être toxiques sur longues périodes (supérieures à 12, 24 h) ne semble pas poser de problèmes en situation périopératoire, en raison du faible temps d'exposition (inférieur à 8 h) (Riess et Keipert, 1998).

La figure II-1 montre également que la quantité d'oxygène, transportée par les fluorocarbures, dépend de la concentration de l'émulsion en fluorocarbures.

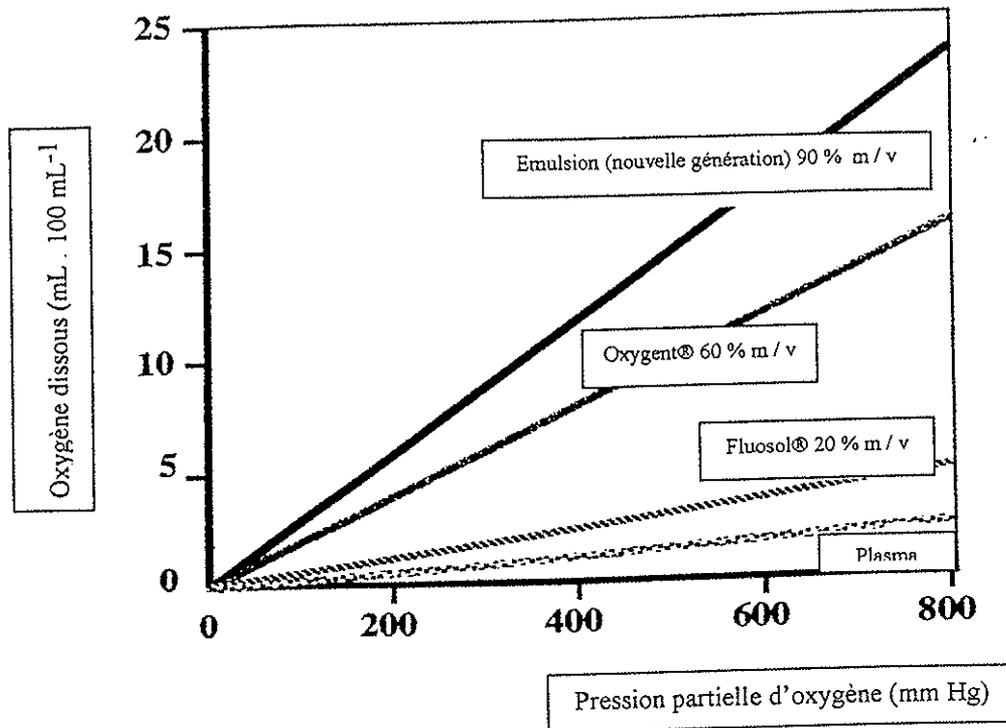


Figure II-1. Courbes de dissolution de l'oxygène par les fluorocarbures (Rémy et al, 1999).

6.1.2. ...et facilement disponible

Avec l'hémoglobine, l'oxygène est difficilement mobilisable puisqu'il est lié chimiquement au tétramère.

Dans un fluorocarbure, l'absence de liaison entre oxygène et transporteur permet aux gaz d'être immédiatement disponible. Dans ce cas, les taux d'extraction par les tissus sont élevés. En présence d'érythrocytes, l'oxygène dissous dans le fluorocarbure est consommé à 90 % et, pour l'essentiel, avant que l'hémoglobine ne commence à relarguer celui qu'elle transporte. L'oxygène transporté par cette dernière est ainsi tenu en réserve (Riess, 1995 b ; Krafft, 1998).

6.2 . Une meilleure exploitation de la microcirculation

La faible taille des particules de fluorocarbures, (inférieur à $0,2 \mu\text{m}$ soit 20 à 70 fois plus petit que le diamètre des globules rouges) associée à la faible viscosité des émulsions, permet à ces transporteurs d'oxygène de circuler aisément dans la microcirculation. A la fonction de convection de l'oxygène, s'ajoute donc pour les fluorocarbures, un phénomène de facilitation de la diffusion de l'oxygène entre érythrocytes et tissus. Ce phénomène devient plus performant lorsque les érythrocytes se raréfient.

Ainsi, les fluorocarbures, qui peuvent maintenir l'oxygénation tissulaire, réduisent les phénomènes d'hypoxie, même en cas d'ischémies importantes (Riess et Leblanc, 1984 ; Riess et Keipert, 1998).

7. FORMES GALENIQUES

7.1. Emulsions PFC/eau ou macro-émulsions

Les répulsions qui s'exercent entre les molécules de fluorocarbures et l'eau sont très fortes, plus fortes qu'entre les hydrocarbures et l'eau. Il en résulte une quasi insolubilité des matières organiques et des électrolytes dans les fluorocarbures, tout comme une insolubilité de ces derniers dans l'eau ou le plasma. D'où la nécessité de les mettre sous forme d'émulsions pour pouvoir les injecter dans le système vasculaire et assurer simultanément le transport des gaz respiratoires (grâce aux fluorocarbures) et des électrolytes, protéines, métabolites... (au moyen de la phase aqueuse).

Les émulsions étant des systèmes thermodynamiquement instables, l'émulsification du fluorocarbure, c'est-à-dire sa dispersion sous la forme de fines gouttelettes nécessite d'une part, l'addition d'un agent surfactif, et d'autre part, en ce qui concerne les émulsions classiques, la mise en œuvre d'un procédé mécanique utilisant les ultrasons ou de fortes pressions.

Obtenir des émulsions stables à température ambiante est un objectif primordial. Elles seront plus sûres, plus commodes d'emploi et trouveront une utilisation plus large. Les véhicules d'intervention médicale pourraient en être équipés.

7.1.1. Les constituants

7.1.1.1. Les fluorocarbures

Le choix du fluorocarbure se fera en fonction de sa densité, sa masse moléculaire, sa pression de vapeur et sa fluidité. Evidemment, une émulsion avec une teneur en fluorocarbures élevée voit son pouvoir oxyphorique augmenter et sa viscosité également.

Les émulsions renfermant 45 à 60 % de fluorocarbures (m/v) semblent idéales en terme de capacité de transport de l'oxygène.

7.1.1.2. Les surfactifs

Les surfactifs, encore appelés agents de surface ou agents tensioactifs sont des substances naturelles ou synthétiques de structure particulière : ce sont des molécules formées de deux parties d'affinité opposées ; une partie est hydrophile ou polaire, l'autre partie est hydrophobe, lipophile ou apolaire (figure II-2).

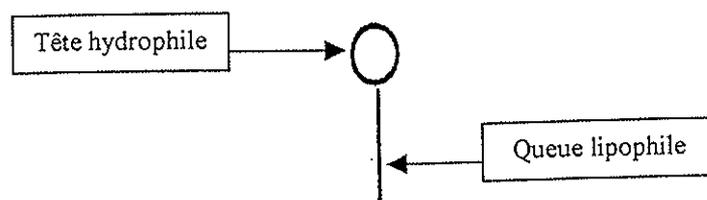


Figure II-2. Représentation schématique d'un surfactif.

De par leur double polarité, ces molécules sont appelées substances amphiphiles. Dans les émulsions de fluorocarbures, ce caractère amphiphile leur permet de s'adsorber aux interfaces fluorocarbures / phase aqueuse. Dans ce cas, ils sont destinés à réduire la tension interfaciale entre les deux liquides non miscibles et doivent permettre l'obtention d'émulsions stables, bien tolérées par l'organisme. Il paraît indispensable que ces produits soient métabolisés dans l'organisme en dérivés dénués de toxicité et que les globules lipidiques obtenus soient les plus "physiologiques" possibles.

Les surfactifs, qui seront utilisés, devront être facilement disponibles, ce qui restreint sévèrement les choix. Les seuls tensioactifs préconisés pour la formulation d'émulsions de fluorocarbures injectables sont :

- des agents synthétiques : les poloxamers, avec comme représentant principal le poloxamer 188
- des agents naturels : les phospholipides de jaune d'œuf

Une gamme de tensioactifs fluorés et de "chevilles moléculaires" a également été étudiée.

7.1.1.2.1. Les poloxamers : le Pluronic F-68®

• *Présentation*

Les poloxamers sont des surfactifs macromoléculaires, non ioniques, constitués de copolymères d'oxyde d'éthylène (POE), hydrophile, et d'oxyde de propylène (POB), hydrophobe (Hazane et al, 1983). Il existe de nombreux poloxamers, mais seul le membre 188 de la famille a été sélectionné pour la préparation des émulsions de fluorocarbures de première génération.

• *Nomenclature*

Les poloxamers sont commercialisés sous le nom de Pluronic. Le Pluronic F-68® désigne le poloxamer 188. Toutefois, en Russie ces tensioactifs sont connus sous le nom commercial de Proxanol et non de Pluronic (Obraztsov, 1994).

• *Organisation à l'interface PFC/eau*

Le caractère hydrophile des blocs de polyoxyéthylène est lié à l'atome d'oxygène, capable de former des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau. Le groupement méthyle du polyoxypropylène, fournit au Pluronic F-68® un caractère lipophile (Riess et Leblanc, 1988).

Grâce à cette structure, lorsque le Pluronic F-68® est utilisé pour stabiliser une émulsion PFC / eau, les deux chaînes hydrophiles sont solubilisées dans la phase aqueuse (Krafft, 1998), tandis que le groupement lipophile, qui ne présente pas d'affinités particulières pour les fluorocarbures, adhère obligatoirement à la surface des gouttelettes de fluorocarbures (figure II-3). Le poloxamer crée donc un encombrement stérique qui limite le contact entre les gouttelettes de fluorocarbure et permet de stabiliser l'émulsion.

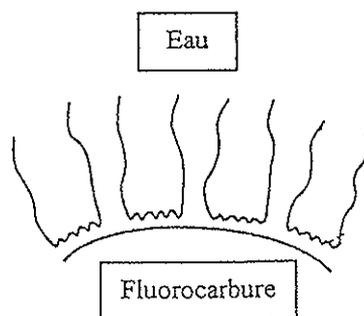


Figure II-3. Représentation schématique d'un film de Pluronic F-68® à l'interface fluorocarbure / eau (Krafft, 1998).

- *Avantages*

Le Pluronic F-68® et les autres poloxamers sont des matériaux synthétiques dotés d'un faible coût qui peuvent être produits en grande quantité.

Les domaines d'application de ces composés sont nombreux puisque les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques les utilisent déjà comme agents dispersants, émulsifiants et solubilisants (Reeve, 1997).

Le Pluronic F-68® est rapidement éliminé par voie urinaire, sous forme non métabolisée (Ravis et al, 1991). Par ailleurs, il pourrait avoir un intérêt dans le domaine cardiovasculaire, puisqu'injecté seul, il diminue la viscosité du sang et améliore la circulation sanguine. Il réduit également le risque d'embolies (Obraztsov, 1994).

- *Inconvénients*

- Faible affinité pour les fluorocarbures et activité de surface limitée. Ces deux inconvénients majeurs attribuent au Pluronic F-68® des propriétés stabilisantes mineures (Gross et Rüdiger, 1992). La capacité limitée du Pluronic à stabiliser les émulsions de fluorcarbure est plus due à son encombrement stérique qu'à la diminution de la tension interfaciale.

- Présence d'impuretés. Reeve (1997) a montré que la distribution de la masse moléculaire de Pluronic F-68 variait, de 6 000 à 13 000 (au lieu de 9 000 en théorie), en raison de la présence de nombreuses impuretés, non éliminées au cours de la synthèse, et retrouvées dans le produit final. La nature et la quantité de ces impuretés varient selon les lots de poloxamer 188 et les fournisseurs. Il a pu être retrouvé dans le Pluronic F-68® commercial des traces d'acétaldéhyde, de propionaldéhyde, d'acide formique, d'acide acétique... (Riess et Leblanc, 1988).

La purification de ces tensioactifs peut être réalisée en utilisant des résines échangeuses d'ions. Bentley et al (1989) ont procédé à la purification de poloxamer 188 commercial en utilisant une colonne contenant une résine silice Amberlite. Ces mêmes auteurs ont ensuite procédé à l'injection IV de ce produit purifié (4 % m/v) chez des rats mâles et femelles. Aucune hépato, ni splénomégalie n'a été observée contrairement à l'injection IV d'une même

dose de Pluronic F-68® non purifié chez ces mêmes animaux (chez le rat mâle, 24 heures après l'injection de Pluronic F-68® non purifié, il est constaté une augmentation du poids du foie de 14 %. De même, 7 jours après l'injection chez la femelle, le poids de la rate avait augmenté de 29 %). D'après ces résultats l'emploi de Pluronic F-68® purifié, pour la formulation d'émulsion de fluorocarbures de première génération, permettrait de limiter la survenue de certains effets indésirables.

Cependant, Lowe et Amstron (1990) ont également étudié l'effet du Pluronic F-68® sur le tissu hépatique. A l'inverse de Bentley et al, ils n'ont retrouvé aucune hépatomégalie après l'injection de Pluronic commercial (non purifié).

Ces deux études ne permettent pas de conclure catégoriquement à l'incidence néfaste des impuretés du Pluronic F-68® sur le tissu hépatique. Par mesure de précaution, une purification soignée du surfactif s'impose avant son utilisation intravasculaire.

La conservation du Pluronic F-68® nécessite l'addition d'un antioxydant comme le 0 ditertiobutylcrésol qui permet de limiter l'oxydation du tensioactif. (Riess et Leblanc, 1988).

- Point de fusion inférieur à la température de stérilisation par la chaleur. En fin de fabrication, la stérilisation par la chaleur est une méthode fréquemment employée pour purifier les émulsions de fluorocarbures. Cette technique consiste à placer l'émulsion dans un autoclave pendant 15 minutes à 121 °C.

Cependant le point de fusion du Pluronic F-68® (110 °C), inférieur à la température de stérilisation (121 °C), interdit l'autoclavage sous peine de dégradation du surfactif et donc de séparation de phases de l'émulsion.

Toutefois, il a été montré que l'addition d'huile de soja (2 %) relevait suffisamment le point de fusion du Pluronic F-68® pour permettre l'autoclavage de certaines émulsions, dans les conditions standard.

Inversement, l'addition d'électrolytes comme le NaCl diminue le point de vapeur rendant instables, les émulsions stabilisées avec du Pluronic F-68®, à partir de 100 °C (Riess et Postel, 1992).

- Formation de gels à température ambiante. Le poloxamer a tendance à former un gel à température ambiante ce qui diminue le volume de la phase continue et augmente la viscosité de l'émulsion.

Parallèlement, la quantité de poloxamer à utiliser pour stabiliser une émulsion augmente avec la concentration en fluorocarbures de cette émulsion. Ainsi, lorsque la concentration en fluorocarbure devient supérieure à 30 % v/v, la quantité importante de surfactif utilisé augmente inévitablement la viscosité de l'émulsion. (Krafft, 1998).

Limiter la concentration en fluorocarbures de l'émulsion permettrait certes de réduire la quantité de surfactif à utiliser, et donc la viscosité de l'émulsion, mais réduirait également la capacité de transport de l'oxygène, c'est-à-dire l'efficacité thérapeutique du produit.

- Une certaine toxicité

- Réactions anaphylactoïdes. Après l'injection intravasculaire de fluorocarbures de première génération il a été observé, chez certains patients, des réactions anaphylactoïdes. Elles provenaient de l'activation du complément par les impuretés du Pluronic F-68® (Vercellotti et Hammerschmidt, 1982 ; Tremper et al, 1982 ; Lowe, 1998).

- Augmentation de la sensibilité aux infections. Les polynucléaires neutrophiles sont les principales sources de défense contre les infections bactériennes et fongiques. Or, le Pluronic F-68® inhibe le chimiotactisme et les fonctions métaboliques des neutrophiles humains (Lane and Lamkin, 1984; Babbit et al, 1990). Les émulsions de fluorocarbures de première génération contenant du Pluronic F-68®, compromettent donc la capacité des polynucléaires neutrophiles à prévenir ou à contrôler les infections bactériennes (Lane and Lamkin, 1986).

- Agrégation plaquettaire et coagulation sanguine. Le Pluronic F-68® inhibe l'agrégation plaquettaire et la coagulation sanguine (Colman et al, 1980).

7.1.1.2.2. Les phospholipides de jaune d'œuf

Les phospholipides (PL) naturels se retrouvent principalement dans les huiles végétales de blé, coton et tournesol mais aussi dans les tissus d'animaux avec les cerveaux de bovins. Mais les deux sources les plus importantes restent les graines de soja et le jaune d'œuf (Hazane et al, 1983).

• *Présentation*

Les glycérophospholipides sont des molécules amphiphiles, dérivés du glycérol. Elles sont constituées d'une tête polaire représentée par un phosphate anionique, et de longues chaînes d'acides gras apolaires saturées ou non.

• *Composition phospholipidique*

La fraction lipidique du jaune d'œuf est constituée principalement de phosphatidylcholine (70 %), phosphatidyléthanolamine (15 %), lysophosphatidylcholine (2-4 %) et lypophosphatidyléthanolamine (2-4 %). Les sphingomyélines et phosphatidylinositol sont présents mais en plus faible quantité.

La composition moyenne en acide gras de ces phospholipides est la suivante (Krafft, 1998) :

- acide palmitique :	37,0 %
- acide oléique :	32,3 %
- acide linoléique :	16,7 %
- acide stéarique :	9,0 %
- acide arachidamique :	5,0 %

• *Obtention*

Les phospholipides s'obtiennent à partir de jaune d'œuf de poule, par extraction à l'aide d'un solvant. La purification est ensuite réalisée par recristallisation et/ou chromatographie sur colonne (Pelura et al, 1992).

• *Organisation à l'interface PFC/eau*

Lors de l'utilisation de phospholipides de jaune d'œuf, comme tensioactifs dans une émulsion PFC / eau, la tête polaire, qui présente une forte affinité pour l'eau, s'oriente vers la phase continue aqueuse. Les acides gras, apolaires, éprouvent une forte répulsion pour cette phase, et s'orientent naturellement vers la phase discontinue fluorocarbonée sans pour autant avoir d'affinité pour cette dernière (figure II-4). Chaque gouttelette de fluorocarbure est donc stabilisée par une couche monomoléculaire de phospholipides, qui diminue la tension interfaciale.

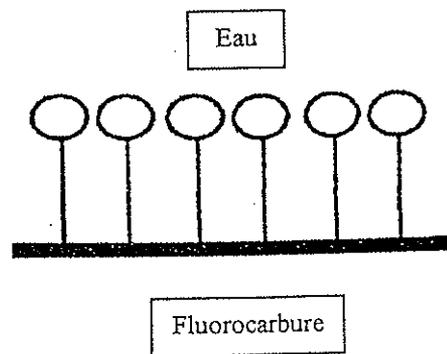


Figure II-4. Représentation schématique d'un film phospholipidique à l'interface fluorocarbure / eau.

L'analyse, par microscopie électronique, d'émulsions de fluorocarbures stabilisées avec des phospholipides de jaune d'œuf (FDC/PL = 70/8 % m/v), met en évidence la présence de gouttelettes de fluorocarbures, enrobées de phospholipides. Elle démontre aussi l'existence de vésicules phospholipidiques dénuées de fluorocarbures : les liposomes (Postel et al, 1991)

Les liposomes augmentent la probabilité de survenue du phénomène de coalescence que ce soit entre les gouttelettes de fluorocarbures, ou bien entre les gouttelettes de fluorocarbures et eux-mêmes. Ils sont donc néfastes pour la stabilité de l'émulsion.

L'apparition de ces petites vésicules unilamellaires résulte de la très faible concentration micellaire critique (CMC) des phospholipides naturels. Ces derniers ont tendance à s'agréger

spontanément pour former des micelles, dès que leur concentration devient supérieure à la CMC. Au dessus de cette CMC, les phospholipides se répartissent entre liposomes et gouttelettes de fluorocarbures.

L'expérience de Weers et al (1994) explique ce phénomène.

Elle montre que pour des concentrations en phospholipides allant de 2 à 9 %, soit des rapports PL / PFC variant respectivement de 2,2 à 10 %, le pourcentage de phospholipides lié aux gouttelettes de fluorocarbures diminue de 72 à 38 %. Ainsi, le pourcentage de phospholipides de jaune d'œuf lié aux gouttelettes de fluorocarbures diminue quand la concentration en phospholipides augmente (c'est-à-dire lorsque le rapport PL / PFC augmente). C'est donc l'excès de lécithines qui favorise la formation de liposomes et rend l'émulsion instable.

Krafft et al (1991) ont montré que la stabilité d'une émulsion de perfluorodécane, stabilisée avec des phospholipides de jaune d'œuf, était optimale lorsque le rapport PL / PFC était compris entre 4 et 6 %.

- *Avantages*

Constituants des membranes cellulaires, les phospholipides naturels sont connus depuis longtemps comme émulsifiants. L'un des meilleurs exemples reste la spécialité Intralipid®, utilisée comme source d'énergie en nutrition parentérale, et dont l'AMM remonte à 1964 (Vidal, 2002). Il s'agit d'une émulsion lipidique constituée d'huile de soja, dispersée dans une solution aqueuse de 2,5 % de glycérol, et stabilisée par des phospholipides de jaune d'œuf (Rotenberg et al, 1991).

Actuellement, les phospholipides sont utilisables par l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique pour leurs excellentes propriétés mouillantes et émulsifiantes (Krafft, 1998).

Leur emploi comme surfactif dans les émulsions de fluorocarbures de deuxième génération permet de réduire de façon importante la tension superficielle qui peut exister à l'interface PFC / eau. De ce fait, il a pu être rapporté une amélioration significative de la stabilité de ces émulsions par rapport aux émulsions de première génération utilisant du poloxamer (Sloviter et Mukherji, 1983).

• *Inconvénients*

Les phospholipides ne possèdent pas les inconvénients du Pluronic F-68®, mais cela ne signifie pas pour autant qu'ils en sont dépourvus. La présence de groupements esters labiles et d'acides gras insaturés dans leur structure les rend sensibles à l'hydrolyse et à l'oxydation.

L'hydrolyse de ces composés permet la formation d'acides gras libres et de lysophospholipides dont les effets indésirables ne sont pas négligeables (lyse cellulaire, arythmie, inhibition enzymatique). Le pH, la température et la force ionique de l'émulsion sont des paramètres qui influencent l'hydrolyse des phospholipides (Krafft, 1998).

De son côté, l'oxydation peut être minimisée par l'inclusion d'antioxydants comme l' α tocophérol et de chélateurs comme l'EDTA à une concentration inférieure à celle nécessaire pour obtenir l'effet anticoagulant (Lowe, 1998).

7.1.1.2.3. Les tensioactifs fluorés

• *Présentation*

Les tensioactifs fluorés sont constitués d'une tête polaire, d'un segment hydrocarboné et d'une ou plusieurs chaînes perfluoroalkylées (figure II-5).

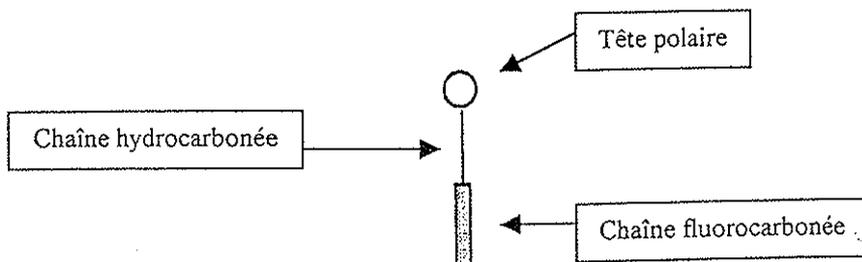


Figure II-5. Représentation schématique d'un tensioactif fluoré.

La tête polaire est de nature variable : polyols, sucres, sucres phosphatés, acides aminés, phosphocholine, phosphatidylcholine, trishydroxyaminométhane... (Riess, 1992 a). Hydrophile, elle s'oriente vers la phase aqueuse.

La chaîne fluorée, fluorophile, s'oriente vers le fluorocarbure.

La chaîne hydrocarbonée, isolée entre la tête polaire et la chaîne fluorée, ne possède aucune affinité particulière.

• *Une très grande activité de surface*

- Utilisés seuls, certains de ces tensioactifs fluorés sont plus efficaces que les phospholipides de jaune d'œuf (Milius et al 1992 ; Santaella et al, 1992) (figure II-6).

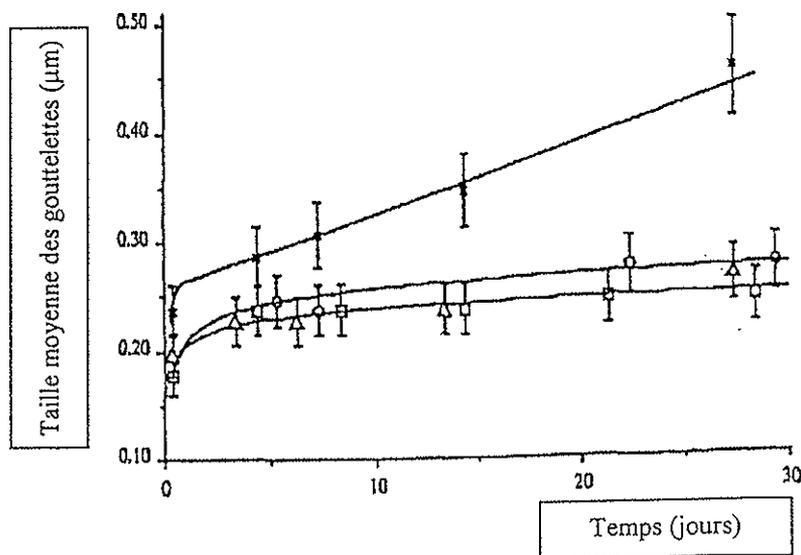


Figure II-6. Vieillessement à 40° C, d'émulsions de FDC (50% m / v) stabilisées avec 3% de surfactifs : phospholipides de jaune d'œuf (x) ; tensioactifs perfluoroalkylés dérivés du glucose phosphate (O, □, Δ). Les courbes □ et Δ sont superposées (Milius et al, 1992).

La figure II-6 montre que les émulsions préparées avec les tensioactifs fluorés présentent une taille de particules nettement inférieure à celle de l'émulsion utilisant des phospholipides de jaune d'œuf, et aussi une stabilité supérieure.

- Les surfactifs fluorés utilisés en association avec des phospholipides de jaune d'œuf (Milius et al, 1992 ; Santaella et al, 1992) ou du Pluronic F-68® (Zarif et al, 1989) présentent également une synergie d'action (figure II-7).

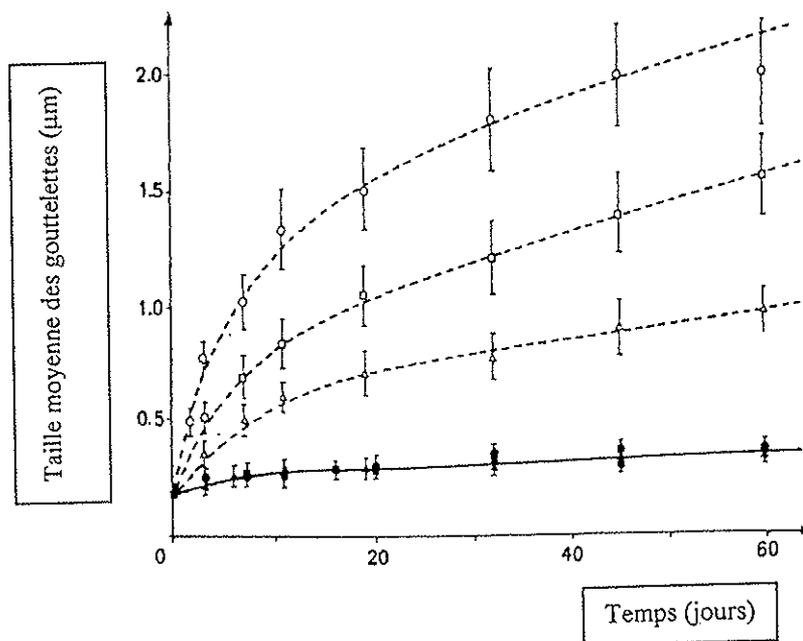


Figure II-7. Vieillissement à 4 (Δ), 25 (□), et 50 °C (O) d'émulsions de FDC (75 % m/v) stabilisées avec 5 % de surfactifs : 2,5 % de Pluronic F-68® et 2,5 % de tensioactif perfluoroalkylé polyhydroxylé (traits pleins) ; 5 % de Pluronic F-68® seul (traits pointillés) (Zarif et al, 1989).

L'encombrement stérique du poloxamer associé à l'excellente activité de surface des tensioactifs fluorés permet un gain de stabilité indiscutable.

Pour déterminer la quantité idéale de tensioactif fluoré à utiliser, Zarif et al (1989) ont également préparé des émulsions de fluorodécane dans lesquelles le rapport tensioactif fluoré / Pluronic F-68® était augmenté progressivement. La quantité totale de surfactifs reste la même pour toutes les émulsions. Les auteurs ont suivi l'évolution de la taille moyenne des gouttelettes de fluorodécane en fonction du rapport tensioactif fluoré / Pluronic F-68® (figure II-8).

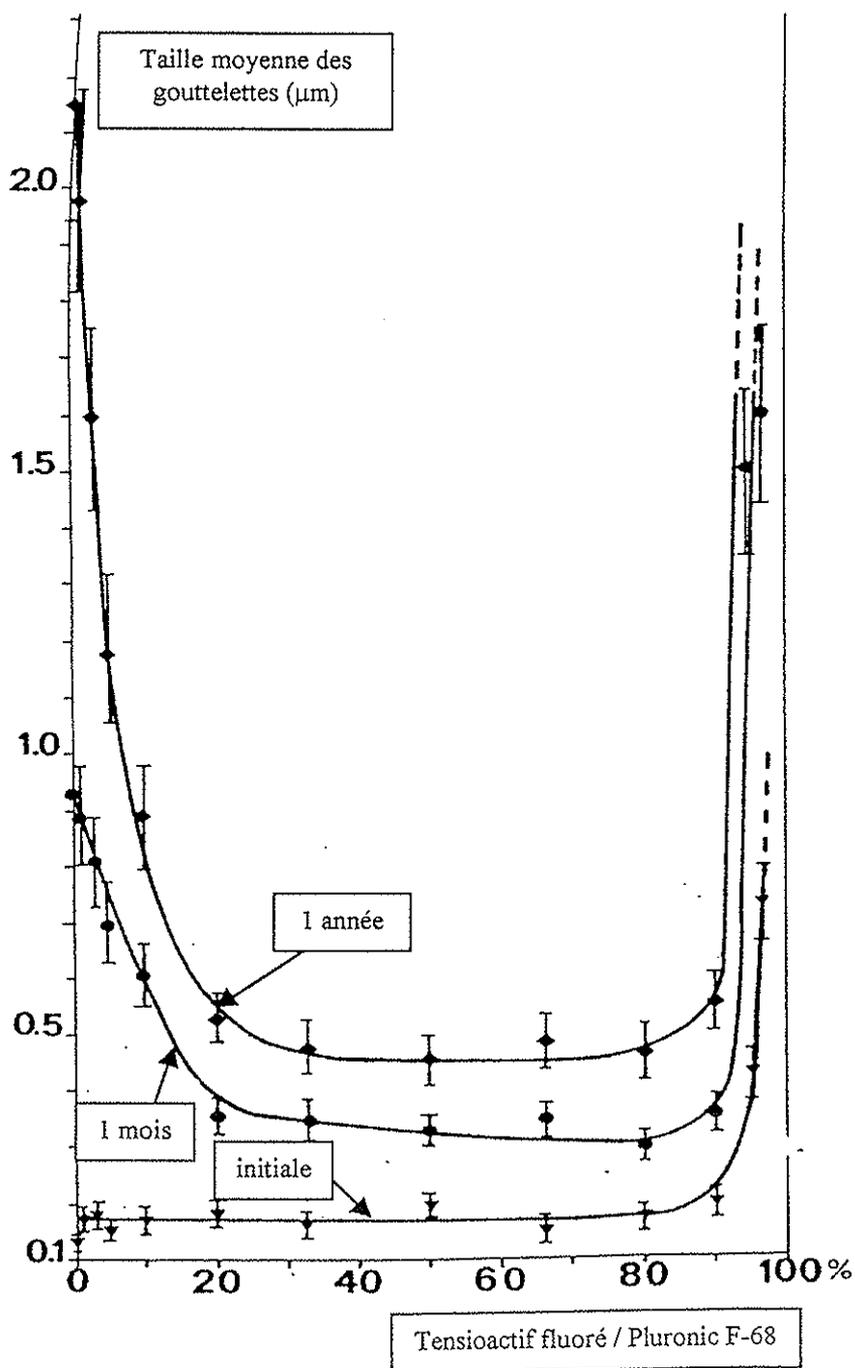


Figure II-8. Taille moyenne des gouttelettes (initiale après préparation, après 1 mois et 1 année) d'une émulsion de FDC (20 % m/v) en fonction du rapport tensioactif fluoré / Pluronic F-68® utilisé pour stabiliser l'émulsion. La concentration totale de surfactifs dans la préparation reste constante (3 % m/v). L'expérience est réalisée à 25 °C (Zarif et al, 1989).

La figure II-8 montre que la stabilité optimale des émulsions de fluorodécane (20 % m/v), est obtenue pour des rapports tensioactif fluoré/Pluronic F-68® compris entre 30 et 70 %. Le rapport idéal a été fixé à 50 % (Zarif et al, 1989) soit :

$$\text{tensioactif fluoré / Pluronic F-68}^{\circledast} = 1/2.$$

D'après ces résultats, lorsqu'un mélange (tensioactif fluoré - Pluronic F-68®) est utilisé pour stabiliser une émulsion de fluorodécane faiblement concentrée (20 % m/v), la quantité idéale de tensioactif fluoré à utiliser pour réaliser ce mélange est deux fois plus faible que celle de Pluronic F-68®. Le mélange de surfactifs idéal est donc constitué de 33,3 % de tensioactif fluoré et de 66,6 % de Pluronic F-68®.

Pour des émulsions beaucoup plus concentrées (à partir de 50 % m/v), le rapport tensioactif fluoré/Pluronic F-68® qui fournit la meilleure stabilité, a été fixé à 100 % (Zarif et al, 1989) soit :

$$\text{tensioactif fluoré / Pluronic F-68}^{\circledast} = 1.$$

Dans ce cas, les quantités de tensioactif fluoré et de Pluronic F-68®, utilisées pour réaliser le mélange de surfactifs, sont identiques. Le mélange est donc constitué de 50 % de tensioactif fluoré et de 50 % de Pluronic F-68®.

• *Avantages*

Les tensioactifs fluorés seraient actuellement les surfactifs les plus efficaces pour stabiliser les émulsions de fluorocarbures.

Par opposition aux tensioactifs hydrocarbonés, les tensioactifs fluorés possèdent une excellente activité de surface et une très faible activité hémolytique. Guillod et al (1994) ont montré qu'un tensioactif à simple chaîne fluorée ($C_8F_{17}(CH_2)_2$), dérivé du glucose phosphate, était dépourvu d'activité hémolytique contrairement à son homologue hydrocarboné ($C_{10}H_{21}$).

L'activité hémolytique est donc fortement réduite, voire supprimée quand une chaîne fluorée est introduite dans un surfactif. Cette même activité diminue lorsque la longueur de la chaîne fluorocarbonée augmente (Krafft, 2001 a ; Santaella et al, 1992).

• *Inconvénients*

Les connaissances encore insuffisantes (pharmacocinétique, toxicité...) et le coût élevé de ces tensioactifs fluorés sont les deux principaux inconvénients qui limitent, pour l'instant, leur utilisation dans les émulsions de fluorocarbures.

7.1.1.2.4. Les chevilles moléculaires

Les chevilles moléculaires sont des molécules linéaires mixtes, mi-hydrocarbure, mi-fluorocarbure qui viennent s'insérer, du côté hydrocarbure, entre les chaînes grasses du film de phospholipides et de l'autre, s'ancrer dans le fluorocarbure (Riess, 1995 b) (figures II-9 et II-10).

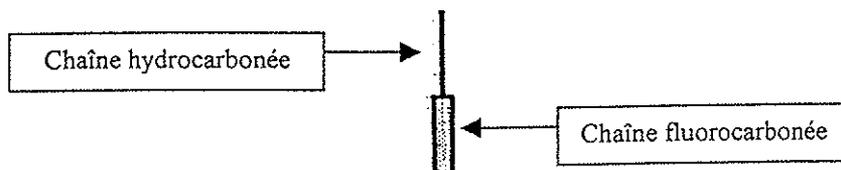


Figure II-9. Représentation schématique d'une "cheville moléculaire".

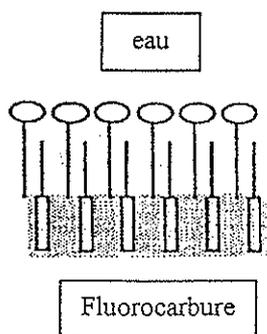


Figure II-10. Disposition de "chevilles moléculaires" à l'interface fluorocarbure / eau dans une émulsion stabilisée par des phospholipides de jaune d'œuf.

Les chevilles moléculaires sont présentes à la surface des gouttelettes de fluorocarbures. Elles viennent renforcer l'adhérence entre le film de phospholipides et les fluorocarbures retardant ainsi le mûrissement d'OSTWALD (cf 7.1.3.1 page 58). Elles peuvent également se localiser au sein des gouttelettes, sous forme de micelles. Après le mûrissement d'OSTWALD, les micelles permettent aux gouttelettes de tendre vers un diamètre moyen d'équilibre.

Le procédé fonctionne parfaitement bien. En effet, la stabilité des émulsions utilisant des phospholipides comme tensioactifs est considérablement améliorée après addition de chevilles moléculaires (figure II-11).

La figure II-11 montre qu'avec une cheville moléculaire et après une période initiale de 20 à 30 jours, la taille moyenne des particules atteint un plateau (0,25 μm) puis reste constante pendant les 9 mois suivants, même à 40 °C.

Les chevilles moléculaires font donc preuve d'une efficacité remarquable. Faible coût et grande inertie biologique sont deux avantages importants qui devraient nettement contribuer à leur développement.

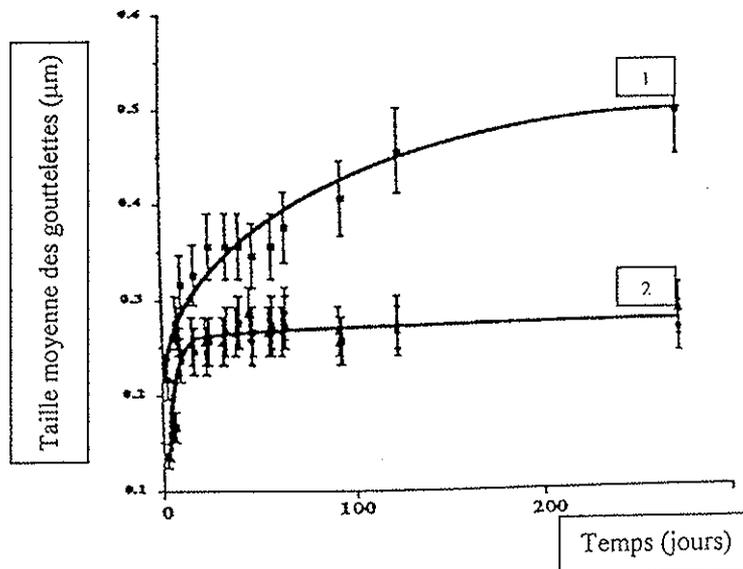


Figure II-11. Evolution, en fonction du temps, de la taille moyenne des gouttelettes d'une émulsion de PFOB stabilisée par des phospholipides de jaune d'œuf seuls (1) et par un mélange (phospholipides de jaune d'œuf - chevilles moléculaires) (2). L'expérience est réalisée à 5 (O), 25 (\square), et 40 °C (Δ) (Riess et Postel, 1992).

7.1.1.2.5. Conclusion

Bien que la toxicité du Pluronic F-68® ne soit pas majeure, la multitude de ses inconvénients, principalement le manque de stabilité des émulsions de première génération, lui fait préférer des agents émulsionnants naturels. Le choix du tensioactif, pour la formulation des émulsions de fluorocarbures de deuxième génération, s'est principalement porté sur les phospholipides de jaune d'œufs.

Mais, ni le Pluronic F-68®, ni les phospholipides ne présentent de réelle affinité pour les fluorocarbures. La tête polaire hydrophile de ces tensioactifs s'oriente logiquement vers la phase continue aqueuse. Le segment hydrocarboné lipophile ne peut s'orienter que vers la phase dispersante, c'est à dire vers le fluorocarbure, bien qu'il ne s'agisse pas d'une huile. L'adhérence du segment hydrocarboné au fluorocarbure est donc très pauvre, d'autant plus que le fluorocarbure est lipophobe. Elle est toutefois meilleure avec les fluorocarbures qui présentent une extrémité lipophile comme le bromure de perfluorooctyle (Riess et Postel, 1992).

L'efficacité respective des deux types de tensioactifs s'explique de la façon suivante : le poloxamer 188 stabilise l'émulsion par encombrement stérique alors que les phospholipides de jaune d'œuf exercent leur action par diminution de la tension interfaciale.

Les capacités stabilisantes du Pluronic F-68® et des phospholipides restent donc limitées. Les recherches s'orientent de plus en plus vers l'utilisation de tensioactifs fluorés qui présentent une affinité accrue pour les fluorocarbures.

En attendant d'employer les tensioactifs fluorés, il est possible d'obtenir certaines de leur propriétés en utilisant de simples combinaisons de phospholipides naturels et de composés mixtes hydrogénés/fluorés comme les chevilles moléculaires.

7.1.1.3. Les autres constituants

En tant que produits destinés à la voie parentérale, les émulsions de fluorocarbures renferment d'autres constituants (figure II-12) parmi lesquels :

- l'eau et les sels minéraux indispensables pour ajuster le pH et l'osmolarité des émulsions.
- un agent oncotique tel que l'albumine humaine diluée ou l'hydroxyéthylamidon assurant l'expansion volémique.
- du glycérol améliorant la stabilité de l'émulsion.

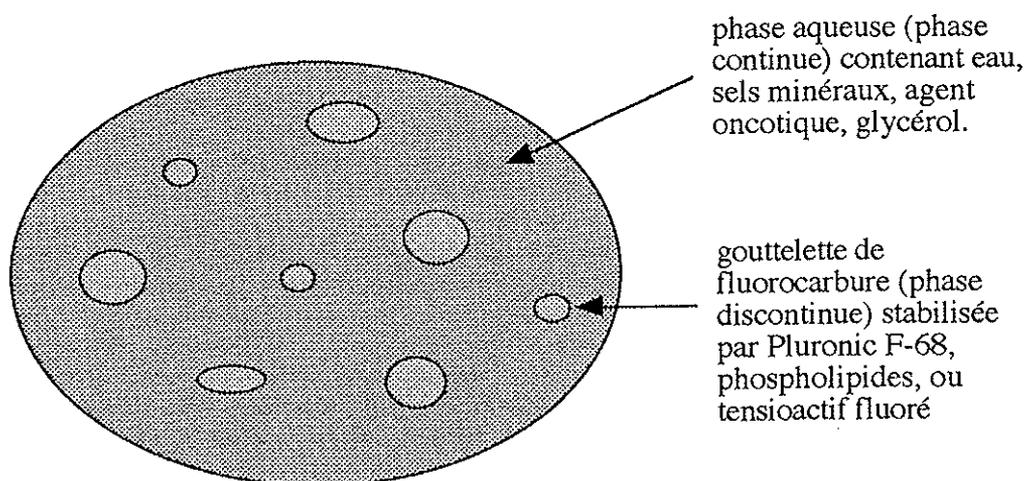


Figure II-12. Représentation schématique d'une émulsion de fluorocarbures.

7.1.2. Procédés de fabrication

La préparation des émulsions actuelles repose sur la dispersion de fines gouttelettes de fluorocarbures dans une phase continue saline, en présence de phospholipides.

7.1.2.1. La préémulsion

La réalisation d'une préémulsion constitue la première étape du procédé de fabrication. Elle s'obtient par dispersion des phospholipides de jaune d'œuf dans la phase aqueuse. Pour cela il est utilisé un mélangeur type ULTRA-TURRAX fonctionnant à 8 000 tours /minute. Le fluorocarbure est ensuite ajouté goutte à goutte dans le mélange, toujours sous agitation. Après 10 minutes à vitesse maximale, soit 24 000 tours / minute, la préémulsion obtenue contient une dispersion grossière de gouttelettes de fluorocarbures de 4 à 5 μm .

Remarque :

L'ULTRA-TURRAX est un homogénéiseur rotatif constitué d'un rotor tournant à grande vitesse et d'un stator. En raison de la vitesse de rotation élevée et du faible espacement qui sépare le rotor du stator, le mélange à disperser subit un cisaillement très intense qui provoque la division des gouttes de fluorocarbures (Denoël et al, 1981).

7.1.2.2. L'émulsion

A partir de la préémulsion, les méthodes qui peuvent être employées pour la réalisation de l'émulsion sont :

- la sonication qui fait appel aux ultrasons
- l'homogénéisation haute pression, qui utilise deux types d'appareils :
 - le MICROFLUIDISER, dans ce cas on parle de microfluidisation
 - le RANNIE

7.1.2.2.1. La sonication

Lors de la sonication, un élément piézoélectrique transforme une énergie électrique en énergie mécanique. Il y a alors formation d'ondes de chocs microscopiques qui sont transmises à la préémulsion au moyen d'une sonde en titane. La propagation de ces ondes dans le milieu engendre de la cavitation, qui permet l'homogénéisation.

La cavitation se caractérise par la formation et l'implosion simultanée de microbulles de gaz. La rapidité et la répétition du phénomène créent de fortes pressions qui provoquent la déformation des interfaces et diminuent ainsi la taille des gouttelettes de fluorocarbures. Malheureusement, ces pressions élevées ont pour effet d'éroder la sonde, ce qui favorise la dispersion de poussières de titane au sein des émulsions. Il est souvent nécessaire de recourir à une étape de centrifugation afin d'éliminer les impuretés présentes.

La distribution de la taille des particules serait également suffisamment large, pour rendre nécessaire la filtration de l'émulsion sur membrane MILLIPORE 0,45 μm , dans le but d'exclure les gouttelettes de fluorocarbures les plus volumineuses.

La sonication permet l'obtention de gouttelettes de 0,40 μm de diamètre.

Enfin, limitée aux petits volumes et faiblement reproductible, la sonication est une méthode de préparation qui reste exclusivement réservée au laboratoire de recherche et non à la production.

7.1.2.2.2. L'homogénéisation haute pression

• *Le Microfluidizer*

La microfluidisation ou hydrocisaillage utilise le principe du laminage hydraulique qui a lieu entre couches liquides voisines et non entre liquides et parois solides. A ce laminage hydraulique obtenu par injection tangentielle à haute pression s'ajoute un effet centrifuge qui sépare le gaz contenu dans la préémulsion. Cette séparation brutale provoque par cavitation une vibration de fréquence proche de celle des ultrasons.

En pratique, une pompe automatique, constituée d'un petit canal permet l'injection du volume de préémulsion dans le MICROFLUIDIZER. Rapidement, le canal se sépare en deux canaux d'une centaine de microns de diamètre. Les deux flux formés cheminent à travers ces canaux jusqu'à ce qu'ils se rencontrent face à face dans une chambre d'interaction. La rencontre à très haute vitesse et sous forte pression (1 000 bar) permet de réduire la taille des gouttelettes de fluorocarbures, grâce au phénomène de cisaillement et à la cavitation engendrée.

Après passage dans une chambre de diminution de la pression et un refroidisseur, l'émulsion est recyclée jusqu'à obtenir des gouttelettes de fluorocarbures suffisamment homogènes.

L'avantage principal de la microfluidisation est le traitement sans brutalité de la préémulsion, ce qui explique son pouvoir d'affinage et d'homogénéisation sans rupture de certaines émulsions fragiles.

- *Le Rannie*

Le RANNIE est constitué d'une valve fixe et d'un piston cylindrique mobile. Le procédé ne fait pas appel au phénomène de cavitation mais uniquement aux forces de cisaillement.

Après avoir été aspiré, le volume de préémulsion est renvoyé brutalement contre la valve par l'intermédiaire du piston qui réalise d'incessants va et vient. L'espace laissé libre entre la valve et la paroi de l'homogénéiseur permet de récupérer l'émulsion afin de procéder à un recyclage.

Recycler l'émulsion revient à augmenter le nombre de passages à travers la chambre d'interaction du RANNIE. Mais, les émulsions n'étant pas des systèmes thermodynamiquement stables, il se produit un phénomène d'"overworking" lorsque le nombre de passages devient excessif. En effet, au delà d'une vingtaine de passages, l'apport d'énergie au système est trop élevé et entraîne rapidement une diminution de la quantité de phospholipides présents à la surface des gouttelettes de fluorocarbures. Les lipides éliminés se réorganisent en liposomes, rendant l'émulsion instable. Les particules de fluorocarbures n'étant plus stabilisées, la probabilité de voir survenir le phénomène de coalescence augmente. Dans ces circonstances, la taille des gouttelettes de fluorocarbures augmente et rend l'émulsion instable.

D'une façon générale, dix à vingt passages à travers la chambre d'interaction permettent d'obtenir une émulsion suffisamment stable et homogène avec des gouttelettes de fluorocarbures de 0,1 à 0,2 μm de diamètre.

Contrairement à la sonication, l'homogénéisation haute pression aboutit à une distribution étroite de la taille des particules. Il s'agit d'une méthode facile à contrôler qui représente le principal procédé de fabrication des émulsions de fluorocarbures qu'il s'agisse d'échantillons de laboratoire ou de production à moyenne ou grande échelle.

7.1.2.3. Stérilisation

Après l'homogénéisation, l'émulsion est conditionnée puis stérilisée à la chaleur (121 °C pendant 15 minutes).

La stérilisation par la chaleur est une opération complexe qui nécessite des contrôles fréquents car les tensioactifs sont sensibles à l'augmentation de température. Le poloxamer peut être dégradé et les phospholipides, hydrolysés en lysolécithines toxiques.

Cette technique peut aussi avoir un effet néfaste sur les caractéristiques physicochimiques de l'émulsion. Le diamètre des gouttelettes de fluorocarbures peut être augmenté et la distribution de leur taille peut subir un élargissement.

La filtration sur membrane aurait pu être une méthode de stérilisation intéressante. Toutefois, ce procédé reste difficilement utilisable dans la mesure où de nombreuses impuretés possèdent déjà un diamètre inférieur à 0,22 μm , après homogénéisation. La proximité granulométrique des impuretés et des gouttelettes limite également l'emploi de cette technique.

7.1.2.4. Conservation

En laboratoire, on étudie la stabilité des préparations en conservant l'émulsion stérilisée à 5, 25 et 40 °C. Le stockage à 40 °C n'a pas de signification biologique, il induit simplement un vieillissement accéléré.

Autrefois, les émulsions de première génération, dont la stabilité était limitée, devaient être conservées à l'état congelé. Actuellement, la seconde génération d'émulsion, beaucoup plus stable, peut être conservée un an à 5 - 10 °C, voire plusieurs mois à température ambiante.

7.1.3. Stabilité

Au cours de leur fabrication et de leur conservation, les émulsions présentent différentes formes d'instabilité physique, qui peuvent se manifester simultanément et s'influencer mutuellement. La diffusion moléculaire ou mûrissement d'OSTWALD, la coalescence, la floculation et la sédimentation sont à l'origine de l'instabilité des émulsions.

L'addition d'émulsifiants (poloxamer 188, phospholipides de jaune d'œuf) peut minimiser ces phénomènes, mais au cours du temps, parfois plusieurs années, il apparaît toujours une augmentation de la taille moyenne des globules de l'émulsion.

L'objectif est de créer des systèmes ayant des durées de vie les plus longues possibles, des propriétés physiques acceptables et un aspect macroscopique satisfaisant.

7.1.3.1. Diffusion moléculaire ou mûrissement d'OSTWALD

Il s'agit du principal procédé d'instabilité survenant lors du stockage des émulsions de fluorocarbure.

La diffusion moléculaire a été évoquée pour la première fois par Higushi et Misra en 1962, en tant que processus possible de dégradation des émulsions. Cette théorie est basée sur l'effet KELVIN selon lequel les très petites particules (moins d'1 μm) présentent des propriétés physiques différentes des particules plus grosses et notamment une solubilité plus importante. En effet, pour une gouttelette de fluorocarbures dispersée dans la phase aqueuse, il est possible d'écrire (Denoël et al, 1981) :

$$C(r) = C(\infty) \exp [(2 \sigma M)/(r \rho R T)]$$

$C(r)$: solubilité d'une particule de rayon r

$C(\infty)$: solubilité d'une particule de rayon ∞

σ : tension interfaciale

M : masse moléculaire du fluorocarbure

ρ : densité du fluorocarbure

R : constante des gaz parfaits

T : température absolue

or $M / \rho = V_m$ (volume molaire)

d'où : $C(r) = C(\infty) \exp [(2 \sigma V_m) / (r R T)]$

En assimilant σ^2 et V_m à des constantes, même pour de très petites particules, l'équation

devient : $C(r) = C(\infty) \exp [K / r]$

Si r décroît, alors $\exp [K / r]$ croît

donc $C(r)$ croît

En raison de leur plus grande solubilité, les très petites gouttelettes deviennent thermodynamiquement instables comparativement aux gouttelettes les plus grosses. Les molécules de fluorocarbures ont alors tendance à quitter les petites gouttelettes pour diffuser à travers la phase continue et rejoindre les gouttelettes les plus volumineuses. Progressivement, les petites gouttelettes tendent à se dissoudre dans le milieu dispersant tandis que les plus grosses grandissent à leur dépens (Denoël et al, 1981 ; Hazane et al, 1983 ; Krafft 1998) (figure II-13). Ce phénomène porte le nom de diffusion moléculaire ou mûrissement d'OSTWALD.

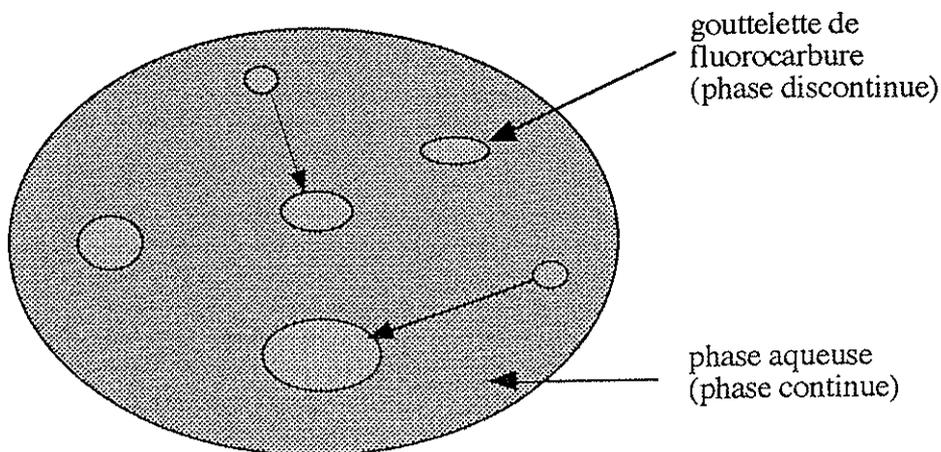


Figure II-13. Diffusion moléculaire dans une émulsion de fluorocarbures.

Processus irréversible, la diffusion moléculaire ne requiert pas de contact rapproché entre les particules, contrairement au phénomène de coalescence.

Le mûrissement d'OSTWALD, ainsi qu'il vient d'être vu, se caractérise donc par la déplétion rapide des petites particules et par l'augmentation de volume des plus grosses particules. La figure II-14 montre que le volume de différentes gouttelettes de fluorocarbures, stabilisées avec des phospholipides naturels ou du Pluronic F-68®, augmente linéairement avec le temps (Milus et al, 1991). Cette cinétique de croissance s'explique grâce à la théorie de Lifshitz - Slezov - Wagner.

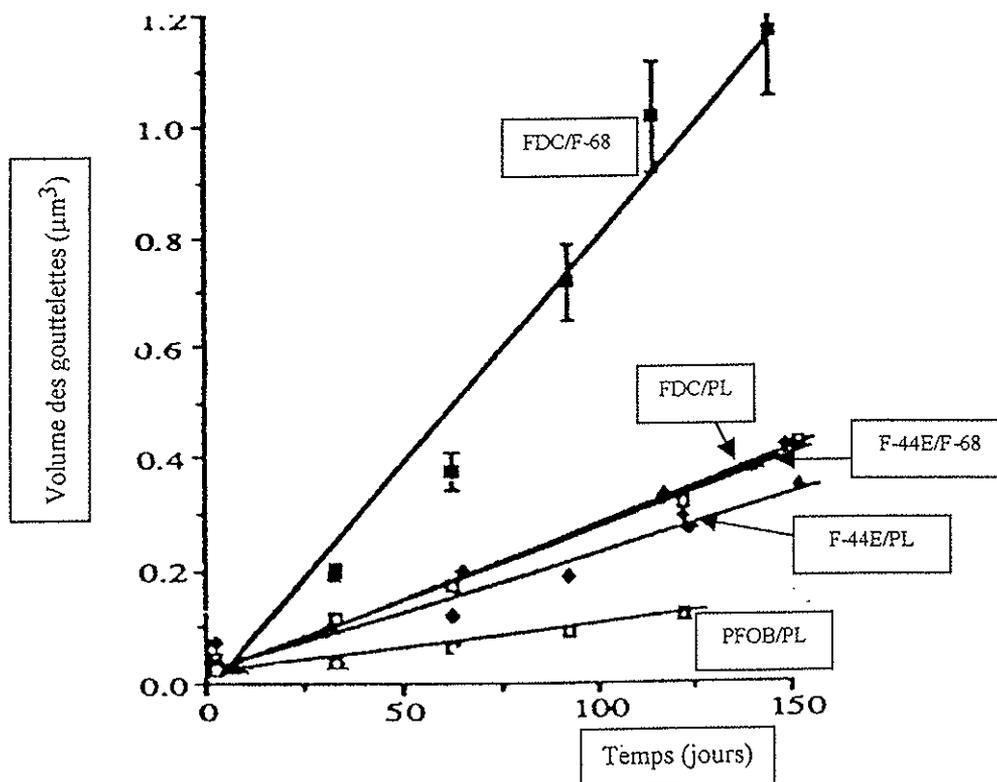


Figure II-14. Evolution, en fonction du temps, du volume des gouttelettes de différentes émulsions de fluorocarbures (FDC, $M_r = 462$; F-44E, $M_r = 464$; PFOB, $M_r = 499$) stabilisés par des phospholipides de jaune d'œuf (PL) ou du Pluronic F-68® (F-68) (Riess et Postel, 1992).

La théorie de Lifshitz - Slezov - Wagner (Riess et Postel, 1992)

D'après cette théorie, lors de la diffusion moléculaire, le cube du rayon moyen des gouttelettes d'une émulsion augmente linéairement avec le temps à une cinétique ω , tel que :

$$\omega = d(\bar{a}^3) / dt = 8 C D \sigma V_m / 9 R T$$

avec pour les fluorocarbures :

- ω : cinétique de croissance par mûrissement d'OSTWALD
- \bar{a} : rayon moyen des gouttelettes de fluorocarbures
- C : solubilité du fluorocarbure dans la phase continue
- D : diffusibilité du fluorocarbure dans la phase continue
(C et D augmentent fortement avec la diminution de la masse moléculaire)
- σ : tension interfaciale
- V_m : volume molaire du fluorocarbure
- R : constante des gaz parfaits
- T : température absolue

D'après la théorie de Lifshitz - Slezov - Wagner, le mûrissement d'OSTWALD pourrait être ralenti en réduisant ω , c'est-à-dire en réduisant la tension interfaciale fluorocarbure / eau. Pour cela les phospholipides ont prouvé qu'ils étaient très efficaces.

Réduire la solubilité et la diffusibilité du fluorocarbure dans l'eau, par l'emploi d'un fluorocarbure lipophile ou de poids moléculaire important, permettrait également de ralentir le mûrissement d'OSTWALD (Riess et Keipert, 1998).

La figure II-14 page 60 illustre partiellement ces faits en montrant que la stabilité des émulsions de fluorocarbures augmente avec le poids moléculaire du fluorocarbure et avec l'emploi de phospholipides comme tensioactifs.

7.1.3.2. Coalescence, Flocculation, Sédimentation

Contrairement à la diffusion moléculaire, la coalescence n'est pas rencontrée lors du stockage. Il s'agit d'un phénomène irréversible qui peut survenir lors de l'étape de stérilisation par la chaleur ou lors de la préparation, lorsque l'émulsion est recyclée par passage à travers la chambre d'interaction du RANNIE.

La sédimentation et la flocculation sont des phénomènes réversibles qui ne constituent pas des problèmes majeurs. Une simple agitation suffit à redistribuer les particules de manière homogène. Les émulsions de fluorocarbures étant destinées à la voie parentérale, il est nécessaire de procéder, avant l'injection, à un contrôle visuel afin de détecter l'un de ces phénomènes d'instabilité.

7.2. Autres formes galéniques

7.2.1. Micro-émulsions PFC/eau

Contrairement aux macro-émulsions, les micro-émulsions sont des systèmes thermodynamiquement stables. Elles sont obtenues pour certaines proportions de fluorocarbures, d'eau et de tensioactifs (figure II-15) (Castro et al, 1984). Ainsi, par le simple mélange des constituants, il se forme spontanément une micro-émulsion, à la différence des macro-émulsions qui nécessitent un apport d'énergie mécanique. Les micro-émulsions sont donc fortement reproductibles. En effet, leurs caractéristiques sont indépendantes des conditions de préparation, à l'inverse des émulsions classiques (Riess et Follana, 1984).

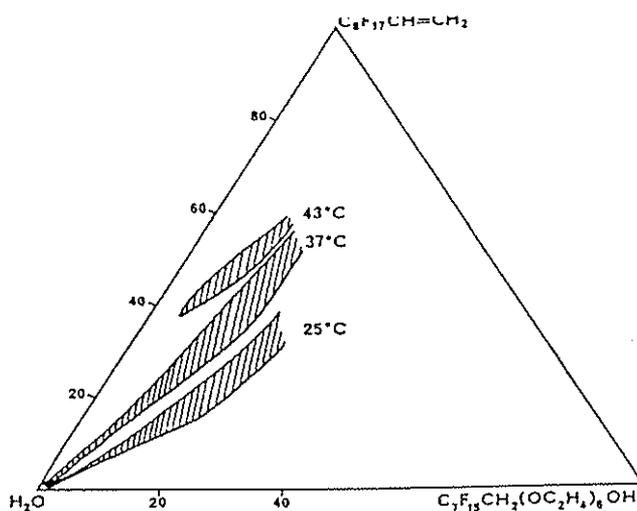


Figure II-15. Domaines de stabilité (hachurés) à diverses températures d'une micro-émulsion d'un fluorocarbure dans l'eau (Riess et Follana, 1984). On remarquera l'extension de la zone de micro-émulsion jusqu'à l'eau pure permettant ainsi une dilution aqueuse d'une micro-émulsion donnée. Cette condition est essentielle pour les applications biomédicales où la micro-émulsion se trouvera mélangée à des quantités variables de sang (Castro et al, 1984).

Dans une micro-émulsion, la taille des gouttelettes de fluorocarbures n'excède pas 50 nm (Krafft, 2001 a).

En ce qui concerne les effets secondaires, les premières micro-émulsions de fluorocarbures testées par voie intravasculaire se sont révélées toxiques (Riess et Follana, 1984). Actuellement, la quantité de tensioactif nécessaire pour obtenir une micro-émulsion semble responsable de la survenue d'effets indésirables (Krafft, 2001 a). A ce jour, rien n'a été clairement démontré.

Si les micro-émulsions semblent la solution idéale au problème de la stabilité à long terme des préparations, leur biocompatibilité insuffisante limite leur utilisation.

7.2.2. Emulsions inverses

Des émulsions inverses stables eau/fluorocarbures ont été obtenues en utilisant des tensioactifs fluorés dérivés du dimorpholinophosphate (Krafft, 2001 a). Ces émulsions servent à la vectorisation de médicaments hydrophiles. Krafft et al (1995) ont réussi à incorporer du pyrazinamide dans une émulsion inverse eau/PFOB. Après neuf mois à 25 °C, aucune séparation de phase n'a été observée.

D'autres émulsions inverses huile/fluorocarbures ont pu être préparées en utilisant cette fois des "chevilles moléculaires" dérivées du dimorpholinophosphate. Ces préparations sont plus particulièrement destinées au transport et à la délivrance de médicaments lipophiles (Krafft, 1998).

7.2.3. Emulsions multiples

Les émulsions multiples sont des émulsions dans lesquelles une phase dispersée renferme une autre phase dispersée. Ainsi, une émulsion eau/fluorocarbure/eau est un système dans lequel des globules d'eau sont dispersés dans des globules de fluorocarbures, ces derniers étant eux-même dispersés dans une phase aqueuse (Seiller et al, 1996). Les émulsions inverses eau/fluorocarbure ou fluorocarbure/eau peuvent donc servir, respectivement par simple dispersion dans une phase aqueuse ou fluorocarbonée, à l'obtention d'émulsion multiple eau/fluorocarbure/eau ou fluorocarbure/eau/fluorocarbure (Riess, 1995 a ; Krafft, 2001 a).

7.2.4. Gels de fluorocarbures

Il est possible de gélifier les émulsions fluorocarbures/eau en incorporant un agent gélifiant dans la phase continue aqueuse de l'émulsion. Cette méthode de gélification a été employée avec une émulsion de perfluorodecaline (55 % v/v) stabilisée par une quantité importante de poloxamer. L'incorporation de 1,2 - propylène glycol dans la phase aqueuse de cette émulsion permet l'obtention d'un gel dénommé Fluorogel®. Cette spécialité pourrait avoir un intérêt majeur en dermatologie (Oxynoid et al, 1994 ; Krafft, 2001 a).

D'autres gels ont été obtenus par dispersion de collagène dans la phase continue aqueuse d'une émulsion fluorocarbures/eau (Magdassi et al, 1992).

D'autres techniques visant à préparer des gels très riches en eau ou en fluorocarbures ont également été décrites (Krafft, 2001 a).

8. PHARMACOCINETIQUE

Dans un perfluorocarbure, l'importance des forces intramoléculaires rend toute métabolisation impossible.

Les fluorocarbures sont donc éliminés sous forme inchangée, en partie par voie pulmonaire et dans une moindre mesure par voie cutanée (Riess et Follana, 1984). Leur excrétion par voie rénale ou biliaire est habituellement nulle (Ravis et al, 1991).

8.1. Un modèle pharmacocinétique à quatre compartiments

De nombreux modèles pharmacocinétiques ont été développés (Tsuda et al, 1988) mais celui qui semble faire l'unanimité a été proposé par Obratsov et al (1992).

Il s'agit d'un modèle à quatre compartiments comprenant :

- le sang
- le système réticuloendothélial
- les lipoprotéines plasmatiques
- le tissu adipeux.

Après injection intravasculaire et après avoir rempli leur rôle de transporteur d'oxygène, les gouttelettes de fluorocarbures sont phagocytées par les macrophages du système réticuloendothélial et éliminées du flux sanguin (Riess et Keipert, 1998). Stockées dans les organes du système réticuloendothélial, principalement le foie, la rate et la moëlle osseuse, elles seront "débarrassées" de leur couche de tensioactifs (Tsuda et al, 1988). Les fluorocarbures regagnent alors la circulation sanguine par simple diffusion à travers les membranes des cellules de stockage. Selon leur caractère lipophile, ils seront plus ou moins pris en charge par des lipoprotéines plasmatiques. Ces transporteurs lipidiques les véhiculeront jusqu'aux poumons où ils seront excrétés, sous forme de vapeur, avec l'air expiré (Flaim et al, 1994). Une partie peut être transportée et déposée au niveau du tissu adipeux.

8.2. La persistance intravasculaire

L'efficacité du fluorocarbure est directement liée à son temps de présence dans le secteur vasculaire. Une persistance intravasculaire trop courte réduit considérablement l'efficacité du transporteur d'oxygène et inversement.

L'un des objectifs de la recherche a été d'augmenter la persistance intravasculaire du fluorocarbure, c'est à dire sa demie-vie circulatoire, en jouant sur les facteurs susceptibles de l'influencer. Parmi ces facteurs :

- la taille des particules de fluorocarbures. La persistance intravasculaire augmente lorsque la taille des gouttelettes de fluorocarbures diminue. Chez le lapin, il a été montré que pour une dose de fluorocarbures de 20 mL/kg, la demie-vie dans le système vasculaire passait de 30 à 85 heures quand la taille des particules diminuait de 0,25 μm à 0,10 μm (Riess et Follana, 1984).

- la dose de fluorocarbures administrée. La persistance intravasculaire augmente avec la dose de fluorocarbure. Chez l'homme, la demie-vie circulatoire du Fluosol®, passe de 7,5 h pour une dose de 10 mL/kg à 22 h pour une dose de 30 mL/kg (Riess, 1984).

- la nature du surfactif utilisé pour stabiliser l'émulsion. L'emploi de phospholipides de jaune d'œuf comme tensioactif augmente considérablement la persistance intravasculaire. Chez le rat, Putyatina et al (1994) ont montré que la demi-vie circulatoire d'une émulsion de perfluorodecaline passait de 13,5 h, lorsque le surfactif utilisé était du poloxamer, à 24,4 h lorsqu'il s'agissait de phospholipides de jaune d'œuf.

- le mode d'administration des phospholipides (lorsque l'émulsion est stabilisée par des phospholipides). In vivo, les phospholipases dégradent la couche de lécithine qui stabilise l'émulsion. La réinjection périodique du surfactif permet de retarder ce phénomène (Obraztsov, 1994) et prolonge, de ce fait, la demie-vie circulatoire. Putyatina et al (1994), toujours dans la même expérience, montraient que la demi-vie circulatoire de l'émulsion de perfluorodecaline, stabilisée par des phospholipides, passait de 24,4 h à 54,4 h lorsque les phospholipides étaient réinjectés périodiquement.

Cette persistance intravasculaire varie également en fonction de l'espèce étudiée. Chez l'homme, la demie-vie circulatoire des fluorocarbures varie en moyenne de 4 à 15 h (Riess et Keipert, 1998). Chez le rat, le chien et le lapin, la demie-vie circulatoire du Fluosol®, a été évaluée respectivement à 13, 24 et 29 h (Ravis et al, 1991). Ces grandes disparités observées aussi bien chez l'homme que l'animal rendent les études pharmacocinétiques particulièrement délicates. C'est pourquoi à l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de modèle animal qui permettrait, par extrapolation, de prévoir avec certitude la persistance intravasculaire chez l'homme.

8.3. Rétention dans les organes. Relation structure-excrétion

Les fluorocarbures ne doivent pas être retenus trop longtemps dans les organes du système réticuloendothélial, après avoir joué leur rôle de transporteur d'oxygène. Leur demi-vie ne devrait pas y excéder 2 à 3 semaines.

Malheureusement, les fluorocarbures qui sont excrétés rapidement des organes donnent des émulsions instables et inversement (Riess, 1984). La perfluorotributylamine, par exemple, fournit des émulsions stables alors que son temps de rétention dans les organes est de plusieurs années. La perfluorodécane, quant à elle, possède une demi-vie dans les organes de 6 à 7 jours, mais donne des émulsions instables (Naito et Yokoyama, 1978).

Il fallait donc trouver un compromis et mettre au point un fluorocarbure qui possède un temps de rétention dans les organes acceptable tout en donnant des émulsions suffisamment stables.

8.3.1. Le compromis stabilité/rétention dans les organes

8.3.1.1. Stabilité et hétéroatome

Dans les années 1980 - 1985, la présence d'un hétéroatome (azote), dans la structure linéaire de la perfluorotributylamine, laissait supposer que la stabilité des émulsions de fluorocarbures était améliorée (Krafft, 1998).

8.3.1.2. Rétention dans les organes et structure cyclique

La structure bicyclique de la perfluorodécaline laissait également présager que la cyclisation du fluorocarbure facilitait son excrétion des organes. De nombreux composés polycycliques, au même nombre d'atomes de carbone, ont été synthétisés afin de vérifier cette dernière hypothèse. Le taux d'excrétion de ces fluorocarbures augmentait rapidement avec le nombre de cycles présents dans leur structure, confirmant l'hypothèse précédente (Riess, 1984).

8.3.1.3. Hétéroatome et structure cyclique : le compromis idéal ?

La Green Cross Corporation décida alors de résoudre le compromis stabilité/rétention dans les organes en mélangeant la perfluorotripropylamine (hétéroatome) et la perfluorodécaline (structure cyclique). Le mélange fut commercialisé sous le nom de Fluosol®. La perfluorotripropylamine est un homologue de la perfluorotributylamine dont la masse moléculaire est inférieure. Elle permet d'améliorer la stabilité de l'émulsion, mais sa demi-vie dans les organes reste élevée, 65 jours (Krafft, 1998).

Le principe du mélange bicyclic et hétéroatome fut également à la base de la synthèse du FMIQ.

L'étude du tableau II-4 permet finalement d'expliquer les rôles joués par l'hétéroatome et la cyclisation dans une structure fluorocarbonée.

Tableau II-4. Caractéristiques structurales, masse moléculaire et demi-vie dans les organes de quelques fluorocarbures de formules brutes voisines (Krafft, 1998).

Formule brute	Structure	Hétéroatome	Masse moléculaire	Demi-vie dans les organes (jours)
C ₉ F ₁₇ N	Cyclique	Oui	445	5
C ₁₀ F ₁₈ (FDC)	Cyclique	Non	462	6-7
C ₁₀ F ₁₈ H ₂ (F-44E)	Linéaire	Non	464	6-7
C ₁₀ F ₁₉ N (FMIQ)	Cyclique	Oui	495	11
C ₉ F ₂₁ N (FTPA)	Linéaire	Oui	521	65

Ce tableau montre que :

- pour une masse moléculaire sensiblement égale, la FDC, de structure cyclique, présente le même temps de rétention dans les organes (6 - 7 j) que le F-44E, de structure linéaire. Ainsi pour une même masse moléculaire, la cyclisation n'accélère donc pas l'excrétion des organes.

- l'addition d'un atome d'azote dans la structure de la FDC ($C_{10}F_{18}$, $M_r = 462$, $t_{1/2} = 11$ j) permet la synthèse du FMIQ ($C_{10}F_{19}N$, $M_r = 495$, $t_{1/2} = 11$ j). Ici, l'introduction de l'hétéroatome augmente la masse moléculaire et la demi-vie dans les organes. Inversement, la substitution d'un atome de carbone de la FDC par un atome d'azote permet l'obtention d'un nouveau composé ($C_9F_{17}N$, $M_r = 445$, $t_{1/2} = 5$ j). Dans ce cas, l'introduction de l'hétéroatome diminue la masse moléculaire et la demi-vie dans les organes. D'après ces deux exemples, l'introduction d'un hétéroatome dans une structure fluorocarbonée fait simplement varier, dans le même sens, la masse moléculaire et le temps de rétention dans les organes. Mais l'hétéroatome n'affecte en aucun cas la stabilité des émulsions de fluorocarbures comme cela avait été supposé.

D'après ces observations, le principal facteur susceptible d'influencer le temps de rétention dans les organes est la masse moléculaire du fluorocarbure. La présence d'un cycle ou d'un hétéroatome n'a pas d'influence directe sur le taux d'excrétion des fluorocarbures. Cycle et hétéroatome modifient le temps de rétention dans les organes, seulement si leur introduction fait varier la masse moléculaire du fluorocarbure.

8.3.2. L'importance de la masse moléculaire

8.3.2.1. Masse moléculaire et rétention dans les organes

D'après le tableau II-4 page 69, la demi-vie dans les organes varie uniquement avec la masse moléculaire du fluorocarbure.

La figure II-16 page 71 montre que le temps de rétention du fluorocarbure dans les organes augmente exponentiellement avec la masse moléculaire. La FDC n'est retenue que quelques jours (6-7 j), car sa masse moléculaire est faible ($M_r = 462$). La FTBA est retenue dans les organes pendant plusieurs années en raison de sa masse moléculaire beaucoup plus importante ($M_r = 671$).

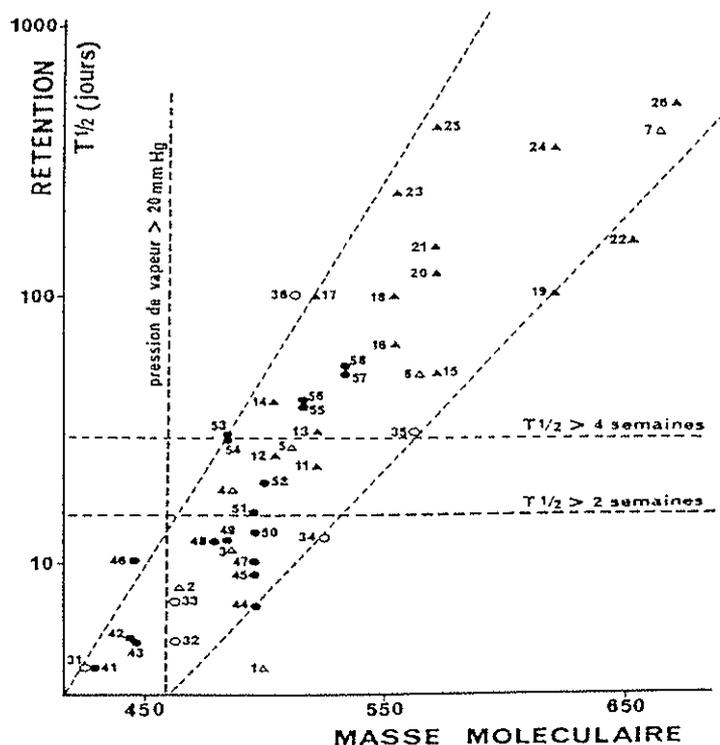


Figure II-16. Influence de la masse moléculaire sur la rétention des fluorocarbures dans les organes pour une variété de fluorocarbures linéaires (avec Δ ou sans Δ hétéroatomes) et cycliques (avec \bullet ou sans O hétéroatomes) (Riess et Follana, 1984).
 Δ : 1 - PFOB, 2 - F-44E \blacktriangle : 13 - FMIQ, 24 - FTBA
 \circ : 33 - FDC \bullet : 45 - FMIQ

Pour une utilisation intravasculaire, le temps de rétention idéal dans les organes du système réticuloendothélial doit être inférieur à deux semaines. Les fluorocarbures qui répondent à ce critère présentent une masse moléculaire inférieure à 520 (figure II-16).

8.3.2.2. Masse moléculaire et pression de vapeur

Chez l'animal, il a été montré que des fluorocarbures, dont la pression de vapeur était supérieure à 20 mm Hg, provoquaient des emphysèmes pulmonaires. La masse moléculaire des fluorocarbures présentant cette propriété était inférieure à 460, ce qui resserre la plage optimale (Krafft, 1998) (figure II-16).

8.3.2.3. Masse moléculaire et stabilité

La stabilité des émulsions augmente avec la masse moléculaire du fluorocarbure. En effet, une masse moléculaire élevée ralentit la dégradation des émulsions par mûrissement d'OSTWALD. La FTBA ($M_r = 671$) donne des émulsions stables, car elle possède une masse moléculaire importante, (et non parce qu'elle présente un hétéroatome dans sa structure). Inversement, la FDC ($M_r = 462$) fournit des émulsions instables.

Les quelques fluorocarbures qui peuvent être utilisés pour la formulation d'émulsions destinées à la voie intravasculaire sont donc ceux dont les masses moléculaires sont comprises entre 460 et 520, à condition que leurs émulsions soient suffisamment stables.

8.3.3. L'intérêt d'un fluorocarbure lipophile

Tableau II-5. Demi-vie dans les organes de deux fluorocarbures non lipophile (FMIQ) et lipophile (PFOB) et de masses moléculaires voisines.

Fluorocarbure	Masse moléculaire	Demi-vie dans les organes (jours)
$C_{10}F_{19}N$ (FMIQ)	495	11
$C_8F_{17}Br$ (PFOB)	499	4

Il vient d'être mis en évidence précédemment que la masse moléculaire du fluorocarbure est le principal facteur susceptible d'influencer le temps de rétention dans les organes.

Le FMIQ et le PFOB (tableau II-5) dont les masses moléculaires sont proches devraient donc avoir des demi-vies presque identiques. Pourtant la demi-vie du PFOB est beaucoup plus courte que celle du FMIQ. Cette différence s'explique par la présence d'un atome de brome (Br) dans la structure du PFOB.

Les fluorocarbures avec un atome de brome (PFOB) ou de chlore (PFDCO) dans leur structure possèdent un pouvoir lipophile supérieur aux autres fluorocarbures (FMIQ...). Ce caractère lipophile leur permet de traverser facilement les membranes lipidiques des cellules de stockage.

Les fluorocarbures lipophiles sont alors pris en charge par les lipoprotéines plasmatiques, plus rapidement que les fluorocarbures non lipophiles. Le temps de rétention dans les organes des fluorocarbures lipophiles, est donc inférieur à celui des fluorocarbures moins lipophiles. Dans l'exemple choisi, le PFOB est plus lipophile que le FMIQ. Sa demi-vie dans les organes n'est que de 4 jours alors qu'elle est de 11 jours pour le FMIQ.

En plus, les fluorocarbures comportant un halogène dans leur structure se dissolvent aisément au sein des lipoprotéines plasmatiques. De même, leur passage à travers les membranes des cellules alvéolaires s'effectue plus facilement qu'avec des fluorocarbures moins lipophiles (Obraztsov et al 1992).

Après le poids moléculaire, le deuxième facteur qui influence le temps de rétention dans les organes est le caractère lipophile du fluorocarbure. L'introduction d'un atome de brome ou de chlore dans une structure fluorocarbonée augmente le pouvoir lipophile du fluorocarbure et accélère son excrétion.

En résumé, le fluorocarbure idéal pour l'utilisation intravasculaire est caractérisé par un temps de rétention dans les organes le plus court possible. Il doit donc avoir un caractère lipophile pour être pris en charge par les lipoprotéines plasmatiques. Sa pression de vapeur doit être faible (< 20 mm Hg). Il doit également permettre l'obtention d'émulsions suffisamment stables. Les fluorocarbures dont les masses moléculaires varient de 460 à 520 semblent être de bons compromis. Actuellement, le fluorocarbure qui répond le mieux à tous ces critères est le PFOB ($M_r = 499$) (figure II-16 page 71). Il se distingue des autres fluorocarbures par son pouvoir lipophile lié à l'atome de brome de sa structure.

9. EFFETS SECONDAIRES

9.1. Réactions anaphylactoïdes

L'injection des fluorocarbures de première génération, en particulier de Fluosol®, entraînait des réactions anaphylactoïdes chez de nombreux patients (Riess, 1995 b). Les impuretés du poloxamer utilisé pour stabiliser ces émulsions provoquaient l'activation du complément à l'origine de ce type d'effets indésirables (Sedova et al, 1998 ; Vercellotti et al, 1982).

En revanche, aucune réaction de ce genre n'a été observée avec les fluorocarbures de deuxième génération où l'émulsionnant employé est du phospholipide de jaune d'œuf (Flaim, 1994).

9.2. "Flu like" syndrome

9.2.1. Signes cliniques

Le terme "flu like" syndrome désigne le syndrome pseudogrippal faisant suite à l'injection de fluorocarbures de seconde génération. Il n'avait pas été décrit avec les fluorocarbures de première génération. Pourtant, il avait été constaté de la fièvre après l'utilisation de Fluosol® (Spence et al, 1994). Avec le Perftoran®, survenaient des douleurs dorsales, de la toux mais aussi des bouffées de chaleurs accompagnées d'une très légère hausse de la température corporelle (0,6 °C) (Obraztsov, 1994).

Le "flu like" syndrome est un phénomène dose dépendant qui comprend deux phases (Bruneton et al, 1989 ; Flaim et al, 1994 ; Krafft, 1998) :

- une phase immédiate. Dans les minutes qui suivent l'injection intravasculaire, voire au moment même de l'injection, il apparaît un flush cutané, des maux de tête et des douleurs occasionnelles dans le bas du dos.
- une phase retardée. Dans un délai de deux à douze heures, apparaissent fièvre, tremblement et nausées accompagnées ou non de vomissements.

Tous ces effets sont de faible intensité mais de fréquence élevée. Ils disparaissent spontanément après douze à vingt quatre heures (Riess, 1995 b).

Toutefois, ces effets indésirables semblent significativement réduits avec la nouvelle formulation d'Oxygent® (AFO 144). La fièvre devient de plus en plus rare et la température n'excède pas 38 °C (Krafft, 1998).

9.2.2. Mécanisme

Après injection intravasculaire, les gouttelettes de fluorocarbures sont phagocytées par les macrophages du système réticuloendothélial.

Une certaine dose de fluorocarbures permet la stimulation des macrophages qui libèrent de façon massive des métabolites de l'acide arachidonique. Tromboxane B₂, prostaglandines (D₂, E₂) et autres cytokines (TNF α , IL1- α et IL1- β) sont à l'origine de la réponse fébrile (Rémy et al, 1999 ; Flaim, 1994).

9.2.3. Prophylaxie

Le flu like syndrome peut être prévenu par la prise d'antiinflammatoires. Une prophylaxie à base de corticostéroïdes, comme la dexaméthasone, se montre très efficace. Il est possible d'utiliser également des inhibiteurs de la cyclooxygénase tels que l'aspirine (Flaim et al, 1994).

9.3. Hépatosplénomégalie

Après phagocytose par les macrophages, les gouttelettes de fluorocarbures sont distribuées vers le foie, la rate et la moelle osseuse.

De fortes doses de fluorocarbures peuvent conduire à une hépatomégalie et/ou une splénomégalie (Krafft, 1998). Vingt et un jours après l'administration de PFOB chez des souris (15 mL/kg poids corporel), les poids du foie et de la rate ont été significativement augmentés (Lartigau et al, 1989).

Des doses importantes peuvent également provoquer la saturation du système réticuloendothélial et ainsi bloquer l'élimination des gouttelettes de fluorocarbures par cette voie. Les fluorocarbures non éliminés sont alors redistribués vers d'autres tissus où ils sont pris en charge par les macrophages résidents (Flaim, 1994).

Dans tous les cas, ces effets biologiques sont strictement réversibles et l'altération des tissus n'est que transitoire. L'expérience de Lartigau a montré que le foie et la rate retrouvaient un poids normal après 2 à 3 mois (Lartigau et al, 1989).

9.4. Augmentation du volume pulmonaire résiduel

Après l'injection intravasculaire de Fluosol®, il a été observé, chez certaines espèces comme le lapin, le porc et le singe, une augmentation du volume pulmonaire résiduel. Ce phénomène dose dépendant n'a jamais été retrouvé chez la souris, le chien, ou bien encore chez l'homme (Krafft, 1998 ; Riess 1995 b).

9.4.1. Signes cliniques

Les poumons d'animaux affectés par l'augmentation du volume pulmonaire résiduel présentent une coloration rose pâle tout à fait normale. De même, ils ne montrent aucune lésion visible et aucun signe d'œdèmes (Flaim, 1994).

9.4.2. Mécanisme

D'après la pharmacocinétique, les fluorocarbures sont éliminés par voie pulmonaire, sous forme de vapeur. Cette vapeur permet de stabiliser les bulles d'air qui se forment en temps normal au niveau des alvéoles (Schutt et al, 1994). La rétention de l'air au niveau des poumons se trouve ainsi favorisée, ce qui augmente le volume pulmonaire (Riess, 1995 b).

Les fluorocarbures avec une pression de vapeur élevée (> 8 mm Hg) ont une capacité importante à stabiliser les bulles de gaz, à l'exception de la perfluorotripropylamine. L'augmentation du volume pulmonaire résiduel est alors très nette (Schutt et al, 1994).

L'idéal serait d'utiliser des fluorocarbures avec une faible pression de vapeur (< 20 mm Hg), même si le phénomène n'a jamais été observé chez l'homme, où les pressions transpulmonaires sont élevées et conduisent naturellement à la rupture des bulles de gaz.

9.5. Perturbations biologiques

9.5.1. Fonction de coagulation

Smith et Lane (1993) ont montré que le Fluosol® ainsi qu'une émulsion fortement concentrée contenant 90 % de PFOB, inhibaient l'agrégation plaquettaire.

Plus récemment, une étude randomisée, en double aveugle, contre placebo, menée sur 48 volontaires en bonne santé, a évalué de façon précise l'influence de doses d'Oxygent® AF0144 (1,2 et 1,8 g/kg), sur les variables de la coagulation et de l'hémostase (Leese et al, 2000).

Les résultats n'ont pas montré de changements significatifs du temps de saignement. Il restait normalement compris entre 2 et 8 minutes.

De la même façon, aucune modification notable du taux plaquettaire n'a été observé dans le groupe recevant 1,2 g/kg de PFOB. Une légère diminution transitoire du nombre de plaquettes a tout de même été constatée dans le groupe recevant 1,8 g/kg, sans conséquences cliniques. Sept jours plus tard, le taux était revenu à sa valeur initiale.

Enfin, quelle que soit la dose utilisée, le fluorocarbure n'a aucune incidence sur les facteurs de la coagulation.

Tous ces résultats démontrent que des doses de 1,2 et 1,8 g/kg de la nouvelle émulsion de PFOB, concentrée à 60 %, n'affectent en aucun cas la fonction de coagulation, chez des volontaires en bonne santé.

9.5.2. Fonction immunitaire

Outre la fonction de coagulation, l'étude précédente a également évalué l'influence de l'Oxygent® AFO144 sur la fonction immunitaire (Noveck et al, 2000).

Les émulsions de seconde génération comme l'Oxygent® ne provoquent pas l'activation du complément contrairement aux émulsions de première génération.

La nouvelle formulation n'a également aucun effet sur le potentiel prolifératif des lymphocytes et sur les taux respectifs d'immunoglobulines circulantes et de cytokines inflammatoires.

Thomassen irait même jusqu'à suggérer que le bromure de perfluorooctyle aurait une activité antiinflammatoire (Thomassen et al, 1997). En effet, les sécrétions de TNF, Il-1 et Il-6 sont significativement diminuées chez des macrophages soumis à une émulsion de PFOB et stimulés par des lipopolysaccharides.

Chez la souris, Babbitt et al, (1990) ont également démontré que l'adhérence des neutrophiles à des cellules endothéliales ischémiées était fortement diminuée après l'injection de Fluosol®, limitant ainsi l'inflammation.

L'impact des fluorocarbures sur la réponse inflammatoire est donc loin d'être négligeable.

10. APPLICATIONS CLINIQUES POTENTIELLES

10.1. Perfluorocarbures purs

10.1.1. Ventilation liquide partielle en cas de syndrome de détresse respiratoire

Le syndrome de détresse respiratoire peut résulter d'un traumatisme, de l'ingestion de produits corrosifs, ou encore, chez le prématuré, de l'absence de surfactant pulmonaire. Cliniquement il se traduit par un collapsus alvéolaire, ayant pour conséquence une perte des échanges gazeux respiratoires. Le décès peut alors rapidement survenir par arrêt respiratoire.

Le traitement de ce syndrome s'avère à ce jour encore insuffisamment efficace (Riess, 1995 a). Chez le prématuré, il repose sur l'administration de surfactant pulmonaire, la ventilation haute fréquence et l'inhalation d'oxyde nitrique (Merritt et Heldt, 1996).

De nouveaux traitements pourraient faire appel à la ventilation liquide partielle. Cette technique consisterait à instiller un fluorocarbure liquide (bromure de perfluorooctyle : Liquivent®) dans la trachée pendant la ventilation mécanique d'oxygène gazeux. En raison de sa faible tension de surface, le liquide s'étalerait rapidement et uniformément à la surface des alvéoles en collapsus. Il parviendrait à dilater celles-ci, tout en assurant un échange efficace de l'oxygène et du gaz carbonique (Merritt et Heldt, 1996).

La ventilation liquide partielle, à base de bromure de perfluorooctyle pur, a déjà fait ses preuves chez certains prématurés souffrant de syndrome de détresse respiratoire aiguë (Leach et al, 1996). Des essais cliniques de phase III avec la spécialité Liquivent® sont actuellement en cours, afin d'évaluer avec précision l'intérêt du PFOB dans des modèles de détresse respiratoire.

10.1.2. Ischémie intestinale

L'instillation de perfluorocarbures oxygénés par voie intraluminale permettrait de restaurer l'oxygénation de la muqueuse intestinale dans les situations d'ischémie. Les fluorocarbures purs pourraient donc être utilisés en cas d'occlusion des artères mésentériques supérieure ou inférieure, d'artérite diffuse ou bien encore de thrombose des veines mésentériques. Des résultats encourageants ont déjà été obtenus chez l'animal (Ricci et al, 1985).

10.1.3. Agent de contraste

- Lors d'une imagerie par résonance magnétique, la distinction entre tissus sains et pathologiques au niveau de l'estomac, du pancréas et de l'intestin, est loin d'être évidente. Dans ces circonstances, l'utilisation per os de fluorocarbures permettrait d'améliorer la qualité des images radiologiques. En effet, l'administration orale de fluorocarbures engendre l'absence de signal en résonance du proton, ce qui crée le contraste souhaité entre le tube digestif et les tissus adjacents (Riess, 1992 a ; Riess, 1995 a).

Les fluorocarbures purs pourraient donc être administrés oralement pour donner d'excellentes images radiologiques du tube digestif (Rémy et al, 1999). La détection des tumeurs cancéreuses de l'appareil digestif serait facilitée.

- Lors d'échographies, ils pourraient être aussi utilisés comme agent de contraste (Riess, 1984). La spécialité de référence dans cette indication serait l'Imagent[®], constituée de microbulles de gaz, stabilisées par du bromure de perfluorooctyle. Après administration intravasculaire, les microbulles gazeuses serviraient à réfléchir les ultrasons. Ce procédé permettrait de visualiser les flux sanguins afin de détecter d'éventuels défauts de perfusion (Riess, 1995 a). La détection des tumeurs cancéreuses pourrait également être facilitée.

Aux Etats-Unis, bien que les essais de phase III avec l'Imagent[®], aient été terminés en 2001, la Food and Drug Administration a pourtant redemandé un essai final. Néanmoins les résultats satisfaisants, obtenus lors des essais cliniques, permettent d'espérer une prochaine commercialisation.

10.1.4. Chirurgie oculaire

En ophtalmologie, la forte densité des fluorocarbures est mise à profit pour maintenir en place, le temps d'une intervention, une rétine décollée ou déchirée (Riess, 1995 a ; Nabih et al, 1989).

10.2. Emulsions PFC/eau

10.2.1. Applications transfusionnelles

10.2.1.1. Choc hémorragique

10.2.1.1.1. Principe d'utilisation des fluorocarbures

Lors d'un choc hémorragique, l'hypovolémie absolue s'accompagne d'une hypoxie tissulaire importante. Les objectifs du traitement sont, tout d'abord, le rétablissement de l'expansion volémique et ensuite, la délivrance d'oxygène aux tissus (Winslow, 1992).

Dans cette situation, la transfusion érythrocytaire peut être utilisée comme moyen thérapeutique, bien qu'elle comporte de nombreux risques.

Les cristalloïdes (NaCl, Ringer) et colloïdes de synthèse (dextran, hydroxyéthylamidon, gélatine) peuvent également être employés, mais ils n'assurent que le remplissage vasculaire sans améliorer l'oxygénation tissulaire.

Les fluorocarbures sembleraient idéaux dans le traitement du choc hémorragique. Ils limiteraient le recours à la transfusion sanguine, assureraient l'expansion volémique et fourniraient en même temps l'oxygène nécessaire aux tissus (Lamy et al, 1996).

10.2.1.1.2. Etudes cliniques

L'efficacité d'un fluorocarbure en tant que "substitut sanguin" fut démontrée pour la première fois par Geyer et al en 1973. Leur expérience permit à des rats dépourvus de plus de 95 % de leur sang de survivre après injection de perfluorotributylamine (Castro et al, 1984).

De nombreuses expériences ont ensuite été réalisées à la fois dans les domaines civils et militaires :

- dans le domaine civil, les résultats des premières études cliniques, menées avec le Fluosol® au début des années 1980, furent peu concluants (Spence et al, 1994). En effet, cette émulsion avait été utilisée en clinique pour compenser l'hémorragie aiguë chez des patients témoins de Jehovah, qui pour des motifs religieux, refusaient les transfusions. Les

sujets avaient reçu une dose maximale de 5 g/kg de perfluorocarbures. L'efficacité de ce traitement n'avait pas pu être prouvée (ce qui peut facilement s'expliquer par le dosage inadéquat utilisé dans ces études).

Par la suite, en Chine Populaire, Chen et Yang ont fait état, en 1987-1988, de leur expérience acquise avec l'Emulsion N° II®. Celle-ci avait été utilisée comme "substitut du sang", dans 127 cas de chirurgie civile. Les auteurs conclurent à l'efficacité de l'émulsion et estimèrent qu'elle pouvait être avantageusement substituée au sang en cours d'opérations ou dans le traitement périopératoire du choc hémorragique (Deline, 1990).

- dans le domaine militaire, Chen et Yang (1988), utilisèrent également l'Emulsion N° II® dans les conditions réelles de la chirurgie de guerre. En 1985-1986, l'émulsion fut employée à proximité du champ de bataille lors du conflit sino-vietnamien. 13 soldats blessés avaient été perfusés avec cette émulsion pendant leur opération. 12 étaient en état de choc hémorragique. Pour tous, une pression artérielle normale fut rétablie pendant et après perfusion de l'émulsion. L'état de choc fut donc traité correctement. A travers ces résultats, les deux auteurs jugèrent l'émulsion efficace et utile en chirurgie de guerre.

Ainsi en cas de choc hémorragique lors de conflits militaires, l'emploi des fluorocarbures pourrait s'avérer intéressant (Minato et al, 1992).

Bien qu'il semble évident que le choc hémorragique soit une indication majeure pour l'utilisation des perfluorocarbures, des essais supplémentaires utilisant des émulsions de fluorocarbures de deuxième génération (Oxyfluor®, Oxygent®) sont en cours actuellement. L'objectif de ces études est de mieux cerner les indications et la posologie optimale.

10.2.1.2. Hémodilution périopératoire

La grande majorité des produits sanguins est utilisée lors de la période périopératoire. Mais la nécessité d'éviter la transfusion de sang homologue est devenue une priorité du fait des graves complications qui y sont associées. L'hémodilution normovolémique aiguë (ANH) est un procédé qui permet de limiter le recours à la transfusion sanguine lors d'opérations chirurgicales (Lamy et al, 1996). La technique consiste à prélever au patient deux ou trois poches de son sang avant l'opération. Le sang prélevé est immédiatement remplacé par un

soluté de remplissage vasculaire (cristalloïde ou colloïde) afin de maintenir un volume circulatoire constant. Le sang mis de côté sera réinjecté au patient au moment de l'opération si le besoin s'en fait sentir et/ou après l'opération de façon à favoriser la récupération post opératoire. La transfusion sanguine pourrait donc être évitée.

Malheureusement, dans certains cas, les pertes sanguines sont tellement importantes que le volume sanguin prélevé initialement n'est plus suffisant pour assurer la récupération post opératoire. Il se peut aussi que ce volume ne soit pas suffisant pour compenser lui même les pertes. La transfusion sanguine avec tous les risques qu'elle comporte deviendrait alors inévitable.

Comme il est impossible de quantifier à l'avance le volume sanguin qui va être perdu pendant l'opération, l'idée d'utiliser les fluorocarbures au cours de l'hémodilution normovolémique parut intéressante (figure II-17). Pendant l'opération, l'émulsion de fluorocarbures serait administrée au patient à la place de son propre sang, au moment où une transfusion sanguine s'avérerait nécessaire. Grâce à ce procédé, on espère retarder le moment de la transfusion ce qui économiserait l'équivalent de plusieurs précieuses poches de sang autologue. Le sang du patient prélevé avant l'opération pourrait ainsi être totalement conservé. Après l'opération, il serait entièrement réinjecté afin d'assurer pleinement la récupération du malade.

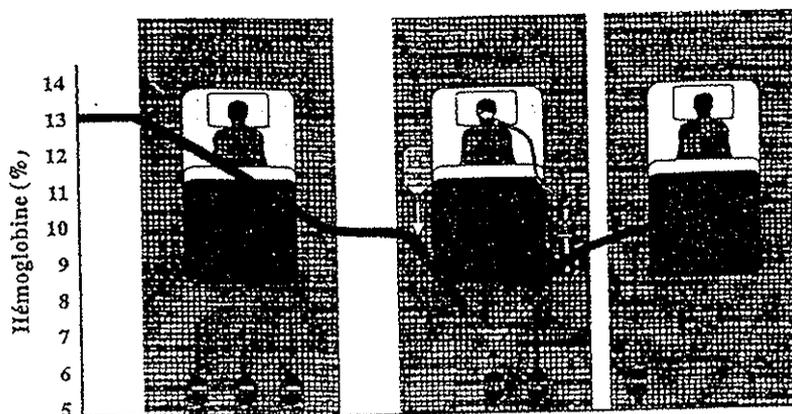


Figure II-17. Utilisation d'un transporteur d'oxygène artificiel en périopératoire. En a) une hémodilution normovolémique (à volume constant) permet de recueillir 2-3 poches de sang du patient, poches qui lui seront restituées en c), lorsqu'il en sera besoin ; durant l'opération, en b), une émulsion de fluorocarbure contribue à assurer l'oxygénation des tissus et limite le recours à la transfusion sanguine (Riess, 1995 a).

En 1996, Wahr et al publiaient les résultats encourageants d'une étude pilote menée avec du perflubron chez des patients hémodilués subissant une intervention chirurgicale. Après l'hémodilution, les sujets étaient tous placés sous atmosphère enrichie en oxygène (100 %). Une simple dose (0,9 g PFC/kg) d'une émulsion de perflubron (90 % m/v AF0144) était administrée pendant l'opération au moment où le taux d'hémoglobine atteignait une valeur critique de 8 g/dL. Le fluorocarbure permettait de maintenir une oxygénation tissulaire adéquate tandis que le taux d'hémoglobine pouvait encore chuter jusqu'à des valeurs proches de 6 g/dL, seuil auquel une autre injection de fluorocarbure aurait été nécessaire.

D'après ces données, une simple dose (0,9 g PFC/kg) d'une émulsion de perflubron (90 % m/v) suffit à compenser une perte en hémoglobine d'environ 2 g/dL, ce qui représenterait une économie d'une à deux unités de sang transfusé. Les fluorocarbures préviennent l'hypoxie tissulaire et pourraient limiter le recours à la transfusion sanguine. Ils seraient donc d'un grand intérêt en cas d'hémodilution normovolémique aiguë (Keipert, 1998).

10.2.1.3. Anémie chronique

Dans le traitement des anémies chroniques (drépanocytose, thalassémie), la répétition des transfusions sanguines peut entraîner une surcharge en fer, une sensibilisation aux antigènes membranaires, et d'autres problèmes majeurs. Afin de remédier à ces inconvénients, le traitement pourrait utiliser des fluorocarbures plutôt que des transfusions sanguines. Pourtant, l'administration répétée de ces transporteurs d'oxygène risquerait de provoquer la saturation du système réticuloendothélial chez de nombreux patients (Lamy et al, 1996). Pour cette raison, l'emploi des fluorocarbures dans le traitement des anémies chroniques ne paraît pas véritablement justifié (Winslow, 1992).

10.2.2. Phénomènes d'ischémies

10.2.2.1. Ischémies localisées

Les propriétés rhéologiques des émulsions de fluorocarbures et leurs capacités de transport de l'oxygène suggèrent que ces molécules pourraient se révéler efficaces dans les lésions hypoxiques.

10.2.2.1.1. Angioplastie coronarienne transluminale percutanée (ACTP)

En 1989, l'administration américaine autorise l'utilisation du Fluosol® pendant l'ACTP. Lors de cette intervention, un petit ballonnet, placé au bout d'un cathéter, est introduit dans une artère coronaire partiellement obstruée par une plaque d'athérome. Le ballonnet est ensuite gonflé afin de réduire cette obstruction (figure II-18). Mais l'opération, dont l'efficacité dépend de la durée de gonflement du ballonnet, prive le myocarde d'oxygène. La solution à ce problème consiste à acheminer une émulsion de fluorocarbure oxygénée en aval de l'obstruction, à l'aide d'un cathéter qui traverse le ballonnet (Kent et al, 1990 ; Riess, 1995 a). Les fluorocarbures pourraient donc être utilisés pendant l'ACTP afin de maintenir une perfusion et une oxygénation myocardique correcte.

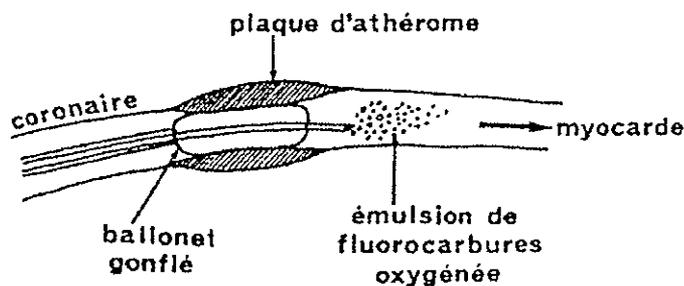


Figure II-18. L'angioplastie coronarienne transluminale percutanée. Le gonflement du ballonnet introduit dans l'artère coronaire va réduire l'obstruction ; l'émulsion de fluorocarbure oxygénée évitera de priver le myocarde d'oxygène pendant ce temps (Riess, 1995 a).

10.2.2.1.2. Infarctus du myocarde (IDM)

Ohyanagi et al (1992) ont démontré l'efficacité du Fluosol® dans le traitement de l'ischémie myocardique. Une réduction significative de la taille de l'infarctus a également été démontrée, chez l'animal, en utilisant une émulsion de bromure de perfluorooctyle (Riess, 1992 a).

Ces résultats encourageants s'expliquent par la faible viscosité des émulsions de fluorocarbures et la petite taille de leur gouttelettes. Ces caractéristiques permettraient aux fluorocarbures de franchir aisément la zone sténosée responsable de l'hypoxie. Ils pourraient de ce fait, délivrer l'oxygène au myocarde ischémié (Riess, 1992 ; Rémy et al, 1999).

Les fluorocarbures sembleraient donc idéaux dans les situations d'IDM. Ils pourraient devenir des compléments efficaces des traitements fibrinolytiques intracoronariens, institués à la phase précoce de l'IDM (Menasché et al, 1984). Les véhicules d'urgence pourraient en être équipés.

10.2.2.1.3. Accident vasculaire cérébral (AVC)

L'AVC, qu'il soit d'origine embolique ou thrombotique, est une situation typique impliquant une ischémie locale (Lamy et al, 1996). Comme pour l'IDM, le traitement d'urgence de l'AVC pourrait utiliser les fluorocarbures. Les études chez l'animal et l'homme ont déjà fourni des résultats satisfaisants (Riess, 1992 a). Toutefois, avant la réalisation de larges essais randomisés, il n'est pas possible de tirer des conclusions définitives concernant l'efficacité des fluorocarbures dans le traitement de l'AVC.

10.2.2.2. Ischémies généralisées

L'embolie gazeuse, l'intoxication au monoxyde de carbone (CO), le mal des montagnes et la maladie des caissons sont autant de situations d'ischémie généralisées dans lesquelles les fluorocarbures seraient susceptibles d'être employés (Winslow, 1992 ; Minato et al, 1992 ; Spiess et Cochran, 1996). Toutes ces situations et bien d'autres encore, ont déjà donné lieu à de nombreuses expérimentations animales (Deligné, 1990).

10.2.3. Cardioplégie

En chirurgie cardiaque à cœur ouvert, il est nécessaire de ralentir voire de stopper le fonctionnement de la pompe cardiaque. Durant cette période, la protection du myocarde ischémié est indispensable. Outre l'hypothermie, cette protection est assurée en perfusant le cœur avec une solution cardioplégique riche en électrolytes. Evidemment, l'idéal serait d'utiliser une solution qui véhiculerait une quantité importante d'oxygène à basse température. Elle protégerait le myocarde pendant une durée suffisamment longue laissant ainsi au chirurgien davantage de temps pour opérer (Winslow, 1992). Elle faciliterait

également la récupération post opératoire de la fonction cardiaque en limitant la survenue de lésions myocardiques, cellulaires et microcirculatoires au moment de la reperfusion (Martin et al, 1992 ; Menasche, 1984).

Malheureusement à basse température, le sang, utilisé comme liquide cardioplégique, ne peut délivrer qu'une quantité limitée d'oxygène. En revanche, les émulsions de fluorocarbures sont susceptibles de fournir de l'oxygène quelle que soit la température (Riess, 1984). C'est pourquoi, elles s'avèreraient supérieures aux solutions cardioplégiques traditionnelles.

Kanter et al (1981) évaluèrent l'intérêt de la perfluorotributylamine en tant que solution cardioplégique. Pour cela, ils ont mesuré la pO_2 intramyocardique chez trois groupes d'animaux soumis à des cardioplégies différentes. Un groupe avait reçu une émulsion de perfluorotributylamine (Fluosol 43®), un autre une solution cristalloïde, et le dernier du sang. Les résultats montrèrent que le Fluosol 43® entraînait une forte élévation de la pO_2 intramyocardique (+ 19,6 mm Hg) alors que l'utilisation d'une solution cristalloïde ou du sang n'entraînait qu'une augmentation très faible de cette même pO_2 (respectivement + 0,4 mm Hg et + 1,5 mm Hg).

Cette étude, montra également que la consommation d'oxygène par le myocarde était dix fois plus forte dans les cœurs recevant le fluorocarbure par rapport aux cœurs traités par solution cristalloïde (203,8 mL O_2 / 100 g de poids sec avec fluorocarbure contre 20,4 mL avec cristalloïde). Avec le sang, cette même consommation n'était que de 39,2 mL O_2 , soit cinq fois moins qu'avec les fluorocarbures, mais deux fois plus qu'avec la solution cristalloïde.

D'après ces résultats, l'émulsion de fluorocarbure est celle qui fournit au myocarde la quantité d'oxygène la plus importante. L'emploi des fluorocarbures comme solution cardioplégique pourrait de ce fait s'avérer intéressant.

10.2.4. Cancérologie

Les tumeurs cancéreuses peu vascularisées sont constituées d'environ 10 à 20 % de cellules hypoxiques. Ces cellules, privées d'oxygène, possèdent la propriété de résister aux effets cytotoxiques des radiations et des médicaments anticancéreux (Teicher, 1992). Dans ces circonstances, l'administration intravasculaire d'émulsions de fluorocarbures oxygénées

augmenterait l'apport d'oxygène aux cellules hypoxiques résistantes. Elles deviendraient alors plus sensibles à la radiothérapie et à la chimiothérapie.

De nombreuses études cliniques (Meyer et al, 1989 ; Berenbaum et al, 1990 ; Rockwell et al, 1992 ; Teicher et al, 1992) ont déjà été réalisées afin d'évaluer l'intérêt des fluorocarbures en cancérologie. Holden et al (1992) ont montré que l'administration intravasculaire d'Oxygent® (4, 8, 12 g/kg) juste avant l'injection d'agents anticancéreux (melphalan, cyclophosphamide...) retardait significativement la croissance tumorale. Des résultats encore meilleurs furent obtenus lorsque l'agent cytotoxique était mélangé à l'Oxygent® juste avant l'injection.

D'après ces observations encourageantes, l'efficacité du traitement anticancéreux se trouve nettement améliorée en présence de fluorocarbures. Malgré tout, des études supplémentaires semblent justifiées avant d'envisager définitivement l'emploi des fluorocarbures en cancérologie.

10.2.5. Conservation d'organes

La transplantation d'organes est une opération délicate dont le succès est en partie conditionné par une bonne conservation du greffon. Après prélèvement chez le donneur, la protection de l'organe ischémié (rein, cœur, foie, pancréas, intestin...) est principalement assurée par hypothermie. Bien que les besoins énergétiques du greffon soient très réduits dans ces circonstances, il est souhaitable de lui apporter une certaine quantité d'oxygène. Les transporteurs d'oxygène, donc les fluorocarbures, pourraient ainsi être utilisés pour la préservation d'organes destinés à la transplantation (Minato et al, 1992).

A ce jour, les études utilisant des fluorocarbures pour la conservation d'organes humains sont encore peu courantes, mais de nombreux travaux ont déjà été réalisés avec des organes d'animaux. D'excellents résultats ont d'ailleurs été obtenus (Voiglio et al, 1996).

10.3. Autres formes galéniques

10.3.1. Micro-émulsions PFC/eau

Les micro-émulsions sont encore très peu étudiées en thérapeutique mais leur emploi pour la préservation d'organes a déjà été suggéré (Krafft, 2001 a).

10.3.2. Emulsions inverses

Les émulsions inverses eau/fluorocarbures sont principalement destinées à la délivrance de principes actifs par la voie pulmonaire (Riess, 1995 a). Dans ces émulsions, la phase continue aqueuse permet la dissolution ou la dispersion des médicaments hydrophiles ou lipophiles. Des agents bronchodilatateurs, stéroïdes, anticancéreux, mucolytiques, antibactériens ont ainsi pu être incorporés dans des émulsions inverses sans entraîner de perte majeure de stabilité (Krafft et al, 1995 ; Krafft, 2001 a).

10.3.3. Emulsions multiples

D'une façon générale, les émulsions multiples présentent un intérêt majeur dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques où elles sont utilisées pour l'encapsulage de diverses substances (antimitotiques, antigéniques...) et l'élaboration des crèmes (Poré, 1992). Encore à l'étude, les émulsions multiples à base de fluorocarbures pourraient servir en dermatologie pour la libération de substances actives.

10.3.4. Gels de fluorocarbures

Les gels de fluorocarbures pourraient être utilisés en dermatologie. Ils s'appliqueraient sur la peau où ils formeraient un film perméable à l'oxygène (Riess, 1995 a). Grâce à cette propriété, ils protégeraient la peau et faciliteraient la cicatrisation, ce qui rendrait leur emploi judicieux en cas de blessures ou de brûlures (Krafft, 2001 a).

Oxynoid et al (1994) ont étudié, chez des rats, l'efficacité du Fluorogel® dans le traitement des plaies chirurgicales. Pour cela, ils ont comparé, dans deux atmosphères différentes (20 % et 76 % d'oxygène), le délai de cicatrisation des plaies recouvertes de Fluorogel® avec celui de plaies non recouvertes de médicaments.

Dans une atmosphère contenant 20 % d'oxygène :

- le délai de cicatrisation des plaies non recouvertes de Fluorogel® était de 21,5 jours
- le délai de cicatrisation des plaies traitées par Fluorogel® était de 18 jours

L'utilisation du Fluorogel® raccourcit donc le délai de cicatrisation de 3,5 jours.

Dans une atmosphère contenant 76 % d'oxygène :

- le délai de cicatrisation des plaies non recouvertes de Fluorogel® était de 20,4 jours
- le délai de cicatrisation des plaies traitées par Fluorogel® était de 16 jours

Dans ce cas, le Fluorogel® accélère la cicatrisation des plaies de 4,4 jours.

En comparant les résultats obtenus dans les deux atmosphères, il est possible de conclure que le Fluorogel® accélère la cicatrisation des plaies d'autant plus que la teneur en oxygène atmosphérique est importante. Les deux auteurs ont conclu à l'efficacité du fluorocarbure dans le traitement des plaies chirurgicales.

De la même façon, l'étude a permis de mettre en évidence l'efficacité du Fluorogel® dans le traitement des brûlures.

Outre le Fluorogel®, d'autres gels ont pu être obtenus en mélangeant des fluorocarbures avec du collagène, principal constituant du derme (Magdassi et al, 1992). Les indications de ces gels se limiteraient au domaine dermo-cosmétique (soins, protection, cicatrisation).

11. UTILISATION DETOURNEE

Augmenter la capacité de transport en oxygène du sang est essentiel dans les disciplines sportives d'endurance (cyclisme, ski de fond, course à pied...). L'accroissement du potentiel aérobie peut être obtenu naturellement grâce à l'entraînement en altitude, ou moins naturellement par séjour en chambre hypoxique. Il peut également être obtenu de façon tout à fait illicite, par transfusion sanguine (autotransfusion), administration d'érythropoïétine (Epo) ou bien encore par injection de "substituts sanguins" transporteurs d'oxygène (solutions d'hémoglobines, émulsions de perfluorocarbures).

11.1. L'emploi des fluorocarbures dans les milieux sportifs

L'emploi des fluorocarbures dans les milieux sportifs s'est développé dans les années 1997 - 1998 au moment où le dépistage de l'Epo commençait à se généraliser. Les fluorocarbures, qui augmentaient la capacité de transport en oxygène du sang sans augmenter l'hématocrite, permettaient aux athlètes de se soumettre aux contrôles sanguins sans être inquiétés.

C'est ainsi que l'Emulsion N° II® fabriquée à Shangaï, aurait été utilisée par des athlètes chinois de fond et de demi fond (AFP, 30/07/1999).

Des rumeurs très persistantes ont également fait état de l'arrivée des fluorocarbures dans les pelotons. Le milieu cycliste a acquis la certitude qu'au moins deux coureurs les auraient testés en 1998. Johan Museeuw et Mauro Gianetti ont en effet été victimes d'accidents attribués aux fluorocarbures. Le produit aurait pu être obtenu au Mexique, considéré comme la plaque tournante de ces trafics illicites. Or, l'obtention d'émulsions de fluorocarbures est très complexe et une fabrication artisanale se fait forcément avec de très grands risques quant à la qualité du produit (De Lignières et Saint-Martin, 1999).

Enfin en 1999, un accident cardiaque est survenu au tour cycliste de Suisse avec un fluorocarbure de fabrication russe (Cusset, 2000). La provenance du produit incriminé n'a rien de surprenant ! Rappelons qu'à Moscou le Perftoran® est vendu en pharmacie au prix de cent dollars la dose (200 mL). N'oublions pas non plus que cette spécialité a fait son

apparition sur le marché russe en 1997... un an avant les jeux olympiques d'hiver de Nagano (AFP, 30/07/1999).

11.2. Détection - dosage

Depuis le début des contrôles antidopages dans les années 1970, la recherche des composés illicites s'est focalisée sur les analyses d'urines. Or en raison de leur insolubilité dans les milieux aqueux et de leur pharmacocinétique particulière, les perfluorocarbures ne se retrouvent pas dans les urines (Krafft, 2001 b). Ils ne sont pas non plus détectables dans les cheveux. Par contre, à partir d'un échantillon sanguin, il est possible de les identifier bien qu'il n'y ait aucun impact des fluorocarbures sur les paramètres globulaires et donc sur l'hématocrite. Il faut noter aussi la possibilité de détection à partir de l'air pulmonaire expiré (Laure, 2000).

11.2.1. Dans le sang

Plusieurs méthodes ont déjà été mises au point pour quantifier les perfluorocarbures dans les échantillons biologiques, mais aucune d'entre elles n'a cependant été validée (Audran et al, 1999).

Récemment, une méthode de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été proposée pour le dépistage du bromure de perfluorooctyle, de la perfluorodécane et de la perfluoro-N-méthylcyclohexylpipéridine dans le sang de rat (Audran et al, 1999 ; Audran et al, 2000). Cette technique permet une identification précise du fluorocarbure. Les limites de quantification sont respectivement de 9, 13 et 9 $\mu\text{g/mL}$ pour le PFOB, la FDC et la FMCP. La méthode décrite a cette fois été validée, contrairement aux précédentes procédures.

11.2.2. Dans l'air expiré

Les fluorocarbures sont éliminés par voie pulmonaire avec l'air exhalé. Pour cette raison, le laboratoire national de dépistage du dopage de Châtenay-Malabry et le professeur Michel Audran du laboratoire de biophysique de la faculté de pharmacie de Montpellier ont mis au point un test respiratoire sérieux, ressemblant à l'alcootest et qui permettrait de détecter les fluorocarbures dans l'air expiré (Bourgat, 1999). Le procédé simple d'emploi (il suffit de souffler dans la pochette) est tout à fait utilisable dans le cadre d'un contrôle antidopage. Il a d'ailleurs déjà été utilisé lors du tour de France cycliste 1999 (AFP, 30/07/1999). A n'en pas

douter, cette technique de détection non invasive pourrait rapidement s'appliquer si l'usage des fluorocarbures devenait courant dans les milieux sportifs.

La méthode de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (méthode décrite au 11.2.1.page 93) a également été proposée pour le dépistage des fluorocarbures dans l'air expiré (Audran et al, 1999 ; Audran et al, 2000).

CONCLUSION

Les solutions d'hémoglobine et les émulsions de perfluorocarbures sont actuellement en cours d'essais cliniques afin d'évaluer avec précision l'intérêt de ces transporteurs d'oxygène injectables dans le milieu médical.

Outre la faible persistance intravasculaire, les principales difficultés rencontrées après l'injection de **solutions d'hémoglobine** sont la survenue d'une hypertension artérielle et d'une toxicité rénale. La suppression ou l'atténuation de ces réactions pourrait être obtenue par modification de la molécule d'hémoglobine.

En ce qui concerne les **fluorocarbures**, rappelons que ce sont des composés synthétiques dotés de **propriétés physicochimiques exceptionnelles** qui sont capables de dissoudre et de transporter de grandes quantités d'oxygène, d'autant plus que la pression partielle du gaz est importante. A la différence de l'hémoglobine, les fluorocarbures délivrent plus facilement cet oxygène aux tissus, car il n'existe pas de liaison spécifique entre le fluorocarbure et le gaz.

Du fait de leur insolubilité dans l'eau les fluorocarbures destinés à être injectés dans le compartiment vasculaire doivent être administrés sous forme d'**émulsions**. C'est pourquoi, depuis l'expérience spectaculaire de Clark et Gollan en 1966, les recherches s'attardent sur la formulation d'émulsions suffisamment stables. Ainsi différentes générations d'émulsions se sont succédées.

- La première génération d'émulsion (Fluosol®) qui utilisait comme tensioactif du Pluronic F-68® présentait un manque de stabilité évident.
- Progressivement apparut la seconde génération d'émulsion (Oxygent®), capable de véhiculer quatre à cinq fois plus d'oxygène. Ce type d'émulsions était améliorée et stabilisée par la présence des **phospholipides de jaune d'œuf**.
- Enfin, poursuivant encore l'amélioration de la stabilité de ces préparations, les émulsions de troisième génération devraient utiliser des tensioactifs fluorés et des chevilles moléculaires.

Compte tenu de leur propriétés particulières, les fluorocarbures sont aujourd'hui principalement utilisés dans le **domaine médical**. Les fluorocarbures y sont surtout employés sous forme d'émulsions (Oxygent®) afin de **limiter le recours à la transfusion sanguine** dans les situations de choc hémorragique et d'hémodilution périopératoire. L'utilisation de ces émulsions pourrait également s'avérer intéressante dans de nombreuses situations d'ischémies sans oublier les domaines de la cancérologie et de la transplantation d'organes.

Les fluorocarbures liquides font également preuve d'une efficacité remarquable dans le traitement du syndrome de détresse respiratoire (Liquivent®) et comme agent de contraste (Imagent®).

Cependant, quelques **effets secondaires** ont pu être observés dont certains peuvent être facilement prévenus ou diminués par la prise d'anti-inflammatoires. Mais d'une manière générale, la toxicité de ces émulsions de fluorocarbures est relativement faible à la condition qu'ils soient choisis dans la gamme de masse moléculaire appropriée et suffisamment purs (Krafft, 2001 b).

Or malgré cette restriction de qualité relative à la pureté, dans le **milieu sportif**, des athlètes peu scrupuleux, soucieux d'améliorer leurs performances, les utilisent déjà de façon **illicite** comme moyen d'oxygénation des tissus musculaires. La détection facile des fluorocarbures dans le sang associée au fait que ces produits ne soient pas encore disponibles sur le marché devrait normalement limiter cette utilisation détournée (Krafft, 2001 b).

En conclusion, il n'existe à l'heure actuelle aucun transporteur d'oxygène satisfaisant qui puisse servir de substitut à l'utilisation des érythrocytes en chirurgie (Riess, 1995 b). Si les progrès accomplis ces dernières années ont été considérables, l'efficacité des fluorocarbures est encore insuffisante en raison d'une **persistance intravasculaire limitée**.

Malgré des progrès très significatifs la persistance intravasculaire des émulsions de fluorocarbures ne se compte encore qu'en heures : on est bien loin des deux à trois semaines d'efficacité des globules rouges transfusés (Riess, 1995 a) ! Et bien que l'Oxygent® doive être commercialisé prochainement, **prolonger et maîtriser la persistance intravasculaire de ces émulsions reste donc un défi majeur**.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alayash A.I. (1998) Hemoglobin-based blood substitutes and mechanisms of toxicity. In *Present and Future Perspectives of Blood Substitutes*, E. Tsuchida (Ed.), Lausanne, Elsevier Science, p. 201-210.
2. Audran M., Krafft M.P., De Ceaurriz J., Mathurin J-C., Sicart M-T., Marion B., Fabre F., Bressolle F. (1999) Assay method for the perfluorooctylbromide (perflubron) in rat blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography*, **734**, 267-276.
3. Audran M., Krafft M.P., De Ceaurriz J., Maturin J-C., Sicart M-T., Marion B., Bougard G., Bressolle F. (2000) Determination of perfluorodecalin and perfluoro-N-methylcyclohexylpiperidine in rat blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography*, **745**, 333-343.
4. Babbitt D.G., Forman M.B., Jones R., Bajaj A.K., Hoover R.L. (1990) Prevention of neutrophil-mediated injury to endothelial cells by perfluorochemical. *Am. J. Pathol.*, **136**, 451-459.
5. Bentley P.K., Davis S.S., Johnson O.L., Lowe K.C., Washington C. (1989) Purification of Pluronic F-68 for perfluorochemical emulsification. *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 661-663.
6. Berenbaum M.C., Akande S.L., Armstrong F.H., Bentley P.K., Bonnett R., White R.D., Lowe K.C. (1990) Perfluorochemicals and photodynamic therapy in mice. In *Oxygen Transport to Tissue*, J. Piiper et al (Eds), New York, Plenum Press, p 277-281.
7. Bourgat M. (1999) Tout savoir sur le dopage. Lausanne, Edition Favre, 175p.
8. Bruneton J.N., Falewee M.N., François E., Cambon P., Philip C., Riess J.G., Balu-Maestro C., Rogopoulos A. (1989) Liver, spleen and vessels : Preliminary clinical results of CT with perfluorooctylbromide. *Radiology*, **170**, 179-183.

9. Castro B., Delpuech J.-J., Gartiser T., Mathis G., Robert A., Selve C., Serratrice G., Stebe M.-J., Tondre C. (1984) Synthèses de composés fluorés transporteurs de gaz respiratoires et préparations de leurs microémulsions aqueuses. *Médecine et Armées*, **12**, 103-106.
10. Charles E. (2000) L'hémoglobine artificielle : pour demain. *Actualités Pharmaceutiques*, **385**, 17-18.
11. Chen H.S., Yang Z.H. (1988) Perfluorocarbon as blood substitute in clinical applications and in war casualties. *Biomat., Art. Cells, Art. Org.*, **16**, 403-409.
12. Clark L.C., Gollan F., (1966) Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science*, **152**, 1755-1756.
13. Colman R.W., Chang L.K., Mukherji B., Sloviter H.A. (1980) Effects of a perfluoro erythrocyte substitute on platelets in vitro and in vivo. *J. Lab. Clin. Med.*, **95**, 553-562.
14. Cusset F. (2000) Procès Festina, un prof à la barre. *Le Moniteur des Pharmacies*, **2374**, 19-20.
15. Deligné P. (1990) Quoi de neuf en 1990 en matière de substituts du sang ? *Ugences Médicales*, **9**, 275-288.
16. De Lignières B., Saint-Martin E. (1999) Vive le dopage ? Enquête sur un alibi. Flammarion (Ed.), Saint-Amand-Montrond, 260p.
17. Denoël A., Jaminet F., Moës A. (1981) Pharmacie galénique Tome II : Formes liquides et systèmes dispersés. Les Presses Universitaires de Liège (Eds), Liège, 463p.
18. Flaim S.F. (1994) Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. *Art. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.*, **22**, 1043-1054.

19. Flaim S.F., Hazard D.R., Hogan J., Peters R.M. (1994) Characterization and mechanism of side-effects of Oxygent HT (highly concentrated fluorocarbon emulsion) in swine. *Art. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.*, **22**, 1511-1515.
20. Gille J.P., Larcan A., Stoltz J.F. (1984) La transfusion sanguine en milieu militaire et substituts du sang. *Médecine et Armées*, **12**, 97-101.
21. Gross U., Rüdiger S. (1992) Phospholipid vesiculated fluorocarbons promising trend in blood substitutes. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 831-833.
22. Guillod F., Greiner J., Milius A., Riess J.G. (1994) Amphiphilic sugar phosphates with single or double perfluoroalkylated hydrophobic chains for use in oxygen and drug delivery systems. *Art. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.*, **22**, 1273-1279.
23. Habler O.P., Messmer K.F. (2000) Tissue perfusion and oxygenation with blood substitutes. *Advanced drug delivery reviews*, **40**, 171-184.
24. Hazane C., Orecchioni A.M., Puisieux F., Seiller M. (1983) Les émulsions lipidiques injectables. In *Agents de Surface et Emulsions, Galénica 5*, Lavoisier (Ed.), Paris, p. 519-561.
25. Holden S.A., Teicher B.A., Ha C., Ara G., Herman T.S. (1992) Enhancement by perfusion emulsion (Oxygent®) and carbogen breathing of the tumeur growth delay of the FSAIIC fibrosarcoma after treatment with antitumor alkylating agents. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 895-898.
26. Kanter K.R., Jaffin J.H., Ehrlichman R.J., Flaherty J.T., Gott V.L., Gardner T.J. (1981) Superiority of perfluorocarbon cardioplegia over blood or crytalloid cardioplegia. *Circulation*, **64**, 75-79.
27. Keipert P.E. (1998) Perfluorochemical emulsions : future alternatives to transfusion. In *Blood substitutes : Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, édité par T.M.S. Chang. New York, Karger Lands Systems, p. 127-156.

28. Kent K.M., Cleman M.W., Cowley M.J., Forman M.B., Jaffe C.C., Kaplan M., King S.B., Krucoff M.W., Lassar T., McAuley B., Smith R., Wisdom C., Wohlgeleit D. (1990) Reduction of myocardial ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty with oxygenated Fluosol®. *Am. J. Card.*, **66**, 279-284.
29. Krafft M.P., Rolland J.-P., Riess J.G. (1991) Detrimental effect of excess lecithin on the stability of fluorocarbon/lecithin emulsions. *J. Phys. Chem.*, **95**, 5673-5676.
30. Krafft M.P., Sadtler V., Riess J.G. (1995) Water-in-fluorocarbon emulsions for drug delivery. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, **22**, 464-465.
31. Krafft M.P., Riess J.G., Weers J.G. (1998) The design and engineering of oxygen-delivering fluorocarbon emulsions. In *Submicronic Emulsions in Drug Targeting and Delivery*, S. Benita (Ed.), Amsterdam, Harwood Academic Publishers, p. 235-233.
32. Krafft M.P. (2001 a) Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Adv. Drug Rev.*, **47**, 209-228.
33. Krafft M.P. (2001 b) Les émulsions de fluorocarbures (PFC) : des transporteurs d'oxygène injectables efficaces et facilement détectables. *Revue Française des Laboratoires*, **331**, 51-54.
34. Labrude P. (1992) Recherches actuelles sur les transporteurs d'oxygène destinés à la transfusion : solutions d'hémoglobine et émulsions de fluorocarbures. *Ann. Pharm. Fr.*, **50**, 250-266.
35. Lamy M., Rémy B., Deby-Dupont G. (1996) Hémoglobines modifiées et perfluorocarbures comme transporteurs d'oxygène : caractéristiques et perspectives. In *La Chirurgie sans Transfusion*, Arnette Blackwell (Ed.), Paris, p. 119-132.
36. Lane T.A., Lampkin G.E. (1984) Paralysis of phagocyte migration to an artificial blood substitute. *Blood*, **64**, 400-405.

37. Lartigau E., Thomas C., Le Blanc M., Riess J.G., Long D., Long C., Malaise E.P., Guichard M. (1989) New high oxygen carrying perfluorochemical emulsions : toxicity, radiosensitivity of GM-CFC and development of metastases in mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **16**, 1153-1156.
38. Laure P. (2000) Dopage et société. Ellipses (Eds), Paris, 447p.
39. Leach C., Greenspan J.S., Rubenstein S.D., Shaffer T.H., Wolfson M.R., Jackson J.C., De Lemos R., Fuhrman B.P. (1996) Partial liquid ventilation with perflubron in premature infants with severe respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **335**, 761-767.
40. Leese P.T., Noveck R.J., Shorr J.S., Woods C.M., Flaim K.E., Keipert P.E. (2000) Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. I. Effects on coagulation function in healthy volunteers. *Anesth. Analg.*, **91**, 804-811.
41. Looker D., Abbott-Brown D., Cozart P., Durfee S. Hoffman S., Mathews A.J., Miller-Roehrich J., Shoemaker S., Trimble S., Fermi G., Komiyama N.H., Nagay K., Stetler G.L. (1992) A human recombinant haemoglobine designed for use as a blood substitute. *Nature*, **356**, 258-260.
42. Lowe K.C., Armstrong F.H. (1990) Oxygen-transport fluids based on perfluorochemicals : effects on liver biochemistry. In *Oxygen Transport to Tissue*, J. Piiper et al (Eds), New York, Plenum Press, p. 267-276.
43. Lowe K.C. (1998) Fluorocarbon emulsions as blood substitutes. In *Present and Future Perspectives of Blood Substitutes*, E. Tsuchida (Ed.), Lausanne, Elsevier Science, p. 327-337.
44. Magdassi S., Royz M., Shoshan S. (1992) Interactions between collagen and perfluorocarbon emulsions. *Inter. J. Pharma.*, **88**, 171-176.

45. Martin S.M., Laks H., Drinkwater D.C., Stein D.G., Barthel S.W., Capouya E.R., Pearl J.M., Bhuta S., Ho B., Chang P. (1992) Perfluorochemical reperfusion limits myocardial reperfusion injury after prolonged hypothermic global ischemia. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 985-989.
46. Meinert H., Fackler R., Knoblich A., Mader J., Reuter P., Röhlke W. (1992) On the perfluorocarbon emulsions of second generation. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 95-113.
47. Menasche P., Fauchet M., Lavergne A., Commin P., Masquet C., Lorente P., De Bocard G., Geyer R.P., Piwnica A. (1984) Limitation des lésions de reperfusion secondaires à une ischémie cardiaque par des émulsions de fluorocarbones. *Médecine et Armées*, **12**, 113-117.
48. Merritt T.A., Heldt G.P. (1996) Partial liquid ventilation - The future is now. *N. Engl. J. Med.*, **12**, 814-815.
49. Milius A., Greiner J., Riess J.G. (1992) Improvement in emulsification ease, particle size reduction and stabilization of concentrated fluorocarbon emulsion by small amounts of (d-glucosyl) [2-(perfluoroalkyl) ethyl] phosphates as surfactants. *Colloids Surf.*, **63**, 281-289.
50. Minato N., Sasaki T., Sakuma I., Shiono M., Takatani S., Nose Y. (1992) Potential clinical applications of the oxygen carrying solutions. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 221-228.
51. Mitsuno T., Ohyanagi H. (1985) Present status of clinical studies of Fluosol-DA[®] (20 %) in Japan. *Int. Anesthesiol. Clin.*, **23**, 169-184.
52. Nabih M., Peyman G.A., Clark L.C., Hoffman R.E., Miceli M., Abou-Steit M., Tawakol M., Liu K. (1989) Experimental evaluation of perfluorophenanthrene as a high specific gravity vitreous substitute : a preliminary report. *Ophthalmic Surg.*, **20**, 286-293.

53. Naito R., Yokoyama K. (1978) An improved perfluorodecalin emulsion. In *Blood Substitutes and Plasma Expanders*. New York, Alan Liss, p. 81-84.
54. Noveck R.J., Shannon E.J., Leese P.T., Shorr J.S., Flaim K.E., Keipert P.E., Woods C.M. (2000) Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. II. Effects on immune function in healthy volunteers. *Anesth. Analg.*, **91**, 812-822.
55. Obraztsov V.V., Kabalnov A.S., Sklifas A.N., Makarov K.N. (1992) A new model describing the elimination of fluorocarbons from the body : dissolution of fluorocarbons in the lipids components of the blood. *Biophysics*, **37**, 298-302.
56. Obraztsov V.V. (1994) Fluorocarbon blood substitutes in Russia. *Art. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.*, **22**, 1019-1027.
57. Ohyanagi H., Saitoh Y., Uchida T., Watanabe M., Yamanouchi K., Yokoyama K., Mitsuno T. (1992) Extended use of Fluosol emulsion in acute myocardial ischemia treatment. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 941-949.
58. Oxynoid O.E., Sydlarov D.P., Aprosin Y.D., Obraztsov V.V. (1994) Application of fluorocarbon emulsions as components of cosmetics and medical ointments. *Art. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.*, **22**, 1331-1336.
59. Pelura T.J., Johnson C.S., Tarara T.E., Weers J.G. (1992) Stabilization of perflubron emulsions with egg-yolk phospholipid. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 845-848.
60. Poré J. (1992) Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples. Les Editions Techniques des Industries des Corps Gras (Ed.), Neuilly, 270p.
61. Postel M., Chang P., Rolland J.P., Krafft M.P., Riess J.G. (1991) Fluorocarbon/lecithin emulsions : identification of EYP-coated fluorocarbon droplets and fluorocarbon-empty vesicles by freeze-fracture electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1086**, 95-98.

62. Putyatina T.K., Aprosin U.D., Afonin N.I. (1994) The elimination peculiarities of perfluorocarbon emulsions stabilized with egg yolk phospholipid. *Art. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.*, **22**, 1281-1285.
63. Ravis W.R., Hoke J.F., Parsons D.L. (1991) Perfluorochemical erythrocyte substitutes : disposition and effects on drug distribution and elimination. *Drug Metabolism Reviews*, **23**, 375-411.
64. Rémy B., Deby-Dupont G., D'Ans V., Ernest P., Lamy M. (1999) Substituts des globules rouges : émulsions de fluorocarbures et solutions d'hémoglobine. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.*, **18**, 211-224.
65. Ricci J.L., Sloviter H.A., Ziegler M.M. (1985) Intestinal ischemia : reduction of mortality utilizing intraluminal perfluorochemical. *Am. J. Surg.*, **149**, 84-90.
66. Riess J.G. (1984) Reassessment of criteria for the selection of perfluorochemicals for second generation blood substitutes : analysis of structure/property relationships. *Artif. Organs*, **8**, 44-56.
67. Riess J.G., Follana R. (1984) Les fluorocarbures comme substituts de l'hémoglobine pour le transport des gaz respiratoires. *Revue Française de Transfusion et Immunohématologie*, **27**, 191-230.
68. Riess J.G., Le Blanc M. (1984) Les transporteurs intravasculaires des gaz respiratoires à base de fluorocarbures de deuxième génération. *Médecine et Armées*, **12**, 107-111.
69. Riess J.G., Le Blanc M. (1988) Preparation of perfluorochemical emulsions for biomedical use : principles, materials and methods. In *Blood substitutes : Preparation, Physiology and Medical Applications*, K.C. Lowe (Ed.), Chichester, UK, Ellis Horwood, p. 94-129.
70. Riess J.G. (1992 a) Overview of progress in the fluorocarbon approach to in vivo oxygen delivery. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 183-202.

71. Riess J.G. (1992 b) Les émulsions de fluorocarbures comme transporteurs d'oxygène injectables. Progrès récents et perspectives. *Rev. Fr. Transfus. Hémobiol.*, **35**, 391-406.
72. Riess J.G., Postel M. (1992) Stability and stabilisation of fluorocarbon emulsions destined for injection. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 819-829.
73. Riess J.G. (1995 a) Du fluor dans nos artères (!). *New J. Chem.*, **19**, 891-909.
74. Riess J.G. (1995 b) Perspectives d'utilisation de transporteurs d'oxygène, comme substituts des érythrocytes en chirurgie. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.*, **14**, 107-117.
75. Riess J.G., Keipert P.E. (1998) Update on perfluorocarbon-based oxygen delivery systems. In *Present and Future Perspectives of Blood Substitutes*, E. Tsuchida (Ed.), Lausanne, Elsevier Science, p. 91-98.
76. Riess J.G. (2001) Oxygen carriers ("blood substitutes") - Raison d'être, chemistry and some physiology. *Chem. Rev.*, **101**, 2797 - 2919.
77. Rockwell S., Kelley M., Irvin C.G., Hughes C.S., Yabuki H., Porter E., Fischer J.J. (1992) Preclinical evaluation of Oxygent® as an adjunct to radiotherapy. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 883-893.
78. Rotenberg M., Rubin M., Bor A., Meyuhass D., Talmon Y., Lichtenberg D. (1991) Physico-chemical characterization of Intralipid® emulsions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1086**, 265-272.
79. Rüdiger S., Grob U., Kemnitz E. (2000) Perfluorocarbons-useful tools for medicine. *Eur. J. Med. Res.*, **5**, 209-216.
80. Santaella C., Vierling P., Riess J.G. (1992) Perfluoroalkylated phospholipids as surfactants and co-surfactants for injectable fluorocarbon emulsions. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 835-837.

81. Schutt E., Barber P., Fields T., Flaim S., Horodniak J., Keipert P., Kinner R., Kornbrust L., Leakakos T., Pelura T., Weers J., Houmes R., Lachmann B. (1994) Proposed mechanism of pulmonary gas trapping (PGT) following intravenous perfluorocarbon emulsion administration. *Art. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.*, **22**, 1205-1214.
82. Sedova L.A., Kochetygow N.I., Berkos M.V., Pjatovskaja N.N. (1998) Side reaction caused by the perfluorocarbon emulsions in intravenous infusion to experimental animals. *Art. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.*, **26**, 149-157.
83. Seiller M., Vaution C., Grossiord J-L. (1996) Emulsions multiples : applications topiques. In *Formes Pharmaceutiques pour Application Locale, Galenica*, Lavoisier (Ed.), Paris, p. 458-480.
84. Sloviter H.A., Kamimoto T. (1967) Erythrocytes substitute for perfusion of brain. *Nature*, **216**, 458-460.
85. Sloviter H.A., Mukherji B. (1983) Prolonged retention in the circulation of emulsified lipid-coated perfluorochemicals. *Progr. Clin. Biol. Res.*, **122**, 181-187.
86. Spence R.K., Norcross E.D., Costabile J., McCoy S., Cernaianu A.C., Alexander J.B., Pello M.J., Atabek U., Camishion R.C. (1994) Perfluorocarbons as blood substitutes : the early years. Experience with Fluosol DA®-20 % in the 1980s. *Art. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.*, **22**, 955-963.
87. Spiess B.D., Cochran R.P. (1996) Perfluorocarbon emulsions and cardiopulmonary bypass : a technique for the future. *J. Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, **10**, 83-90.
88. Sirieix D., Nicolas-Robin A., Baron J-F. (1997) Transporteurs de l'oxygène : solutions d'hémoglobine et fluorocarbones. *Médecine Thérapeutique*, **3**, 851-857.
89. Smith D.J., Lane T.A. (1993) Effect of high concentration perflubron emulsion on platelet function. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **21**, 173-181.

90. Teicher B.A. (1992) Use of perfluorochemical emulsions in cancer therapy. *iomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 875-882.
91. Teicher B.A., Herman T.S., Menon K. (1992) Enhancement of fractionated radiation therapy by an experimental concentrated perflubron emulsion (Oxygent®) in the lewis lung carcinoma. *iomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 899-902.
92. Thomassen M.J., Buhrow L.T., Wiedemann H.P. (1997) Perflubron decreases inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Crit. Care Med.*, **25**, 2045-2047.
93. Tremper K.K., Friedman A.E., Levine E.M., Lapin R., Camarillo D. (1982) The preoperative treatment of severely anemic patients with a perfluorochemical oxygen-transport fluid, Flusol-DA®. *N. Engl. J. Med.*, **307**, 277-283.
94. Tsuchida E. (1998) Perspectives of blood substitutes. In *Present and Future Perspectives of Blood Substitutes*, E. Tsuchida (Ed.), Lausanne, Elsevier Science, p. 1-14.
95. Tsuda Y., Yamanouchi K., Yokohama K., Suyama T., Watanabe M., Ohyanagi H., Saitoh Y. (1988) Discussion and considerations for the excretion mechanism of perfluorochemical emulsion. *Biomat., Art. Cells, Art. Org.*, **16**, 473-483.
96. Vercellotti G.M., Hammerschmidt D.E., Craddock P.R., Jacob H.S. (1982) Activation of plasma complement by perfluorocarbon artificial blood : probable mechanism of adverse pulmonary reactions in treated patients and rationale for corticosteroid prophylaxis. *Blood*, **59**, 1299-1304.
97. Vidal 2002, 78 ème édition.
98. Voiglio E.J., Zarif L., Gorry F.C., Krafft M.P., Margonari J., Martin X., Riess J.G., Dubernard J.M. (1996) Aerobic preservation of organs during a new perflubron/lecithin emulsion stabilized by molecular dowels. *J. Surg. Res.*, **63**, 439-446.

99. Wakselman C. (1999) Les composés organiques fluorés : synthèses et applications biologiques. *Ann. Pharm. Fr.*, **57**, 108-115.

100. Wautier J-L. (1999) Transfusion de sang et de produits dérivés du sang. *La Revue du Praticien*, **49**, 409-413.

101. Weers J.G., Ni Y., Tarara T.E., Pelura T.J., Arlauskas R.A. (1994) The effect of molecular diffusion on initial particle size distributions in phospholipid-stabilized fluorocarbon emulsions. *Colloids Surf. A*, **84**, 81-87.

102. Winslow R.M. (1992) Potential clinical applications for blood substitutes. *Biomat., Art. Cells, Immob. Biotech.*, **20**, 205-217.

103. Winslow R.M. (1998) The role of blood substitutes in emerging healthcare systems. In *Present and Future Perspectives of Blood Substitutes*, édité par E. Tsuchida. Lausanne, Elsevier Science, p. 15-31.

104. Zarif L., Manfredi A., Varescon C., Le Blanc M., Riess J.G. (1989) Synergistic stabilization of perfluorocarbon-Pluronic F-68 emulsion by perfluoroalkylated polyhydroxylated surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 1515-1523.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION-----	1
Chapitre 1 LES SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE -----	3
1. HISTORIQUE-----	4
2. SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE LIBRE NON MODIFIEE-----	5
3. SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE MODIFIEE-----	7
3.1. Caractéristiques des solutions d'hémoglobine modifiée.....	7
3.2. Nature de l'hémoglobine.....	7
3.2.1. Hémoglobine humaine	
3.2.2. Hémoglobine bovine	
3.2.3. Hémoglobine recombinante	
3.3. Techniques de modifications.....	8
3.3.1. Méthodes chimiques	
3.3.1.1. La pyridoxylation	
3.3.1.2. Le pontage intramoléculaire	
3.3.1.3. La polymérisation	
3.3.1.4. La conjugaison	
3.3.1.5. L'encapsulation	
3.3.2. Génie génétique	
3.4. Indications - développement.....	11
3.5. Effets secondaires.....	11
3.5.1. Hypertension artérielle	
3.5.2. Néphrotoxicité	
3.5.3. Divers	
Chapitre 2 LES PERFLUOROCARBURES -----	14
1. HISTORIQUE-----	15
2. STRUCTURE-NOMENCLATURE-----	18
3. SYNTHÈSE-----	20
3.1. Méthode substitutive.....	20
3.1.1. La fluoration électrochimique.....	21
3.1.1.1. Principe	
3.1.1.2. Avantages	
3.1.1.3. Inconvénients	
3.1.2. La fluoration par les fluorures métalliques à valences élevées.....	22
3.1.2.1. Principe	
3.1.2.2. Avantages	
3.1.2.3. Inconvénients	

3.1.3. La fluoration par le fluor moléculaire.....	23
3.1.3.1. Principe	
3.1.3.2. Inconvénients	
3.2. Méthode par combinaison ou oligomérisation.....	23
3.2.1. Principe	
3.2.2. Avantages	
3.2.3. Inconvénients	
4. PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES-----	25
4.1. Forces intramoléculaires élevées	
4.2. Forces intramoléculaires faibles	
4.3. Composés hydrophobes et lipophobes	
4.4. L'électronégativité du fluor : un avantage certain	
5. DIFFERENTES GENERATIONS D'EMULSIONS-----	27
5.1. Les émulsions de fluorocarbures de première génération.....	27
5.1.1. Présentation	
5.1.2. Caractéristiques	
5.2. Les émulsions de fluorocarbures de deuxième génération.....	28
5.2.1. Présentation	
5.2.2. Caractéristiques	
5.3. Vers une troisième génération d'émulsion.....	30
6. TRANSPORT ET DELIVRANCE D'OXYGENE PAR LES FLUOROCARBURES-----	33
6.1. Principes.....	33
6.1.1. De l'oxygène dissous...	
6.1.2. ...et facilement disponible	
6.2. Une meilleure exploitation de la microcirculation.....	35
7. FORMES GALENIQUES-----	36
7.1. Emulsions PFC / EAU ou macroémulsion.....	36
7.1.1. Les constituants.....	36
7.1.1.1. Les fluorocarbures	
7.1.1.2. Les surfactifs	
7.1.1.2.1. Les poloxamers : le Pluronic F-68®	38
7.1.1.2.2. Les phospholipides de jaune d'œuf.....	42
7.1.1.2.3. Les tensioactifs fluorés.....	45
7.1.1.2.4. Les chevilles moléculaires.....	50
7.1.1.2.5. Conclusion.....	52
7.1.1.3. Les autres constituants	

7.1.2. Procédés de fabrication.....	54
7.1.2.1. La préémulsion	
7.1.2.2. L'émulsion	
7.1.2.2.1. La sonication	
7.1.2.2.2. L'homogénéisation haute pression	
7.1.2.3. Stérilisation	
7.1.2.4. Conservation	
7.1.3. Stabilité.....	58
7.1.3.1. Diffusion moléculaire ou mûrissement d'OSTWALD	
7.1.3.2. Coalescence, Flocculation, Sédimentation	
7.2. Autres formes galéniques.....	63
7.2.1. Micro-émulsions PFC/eau	
7.2.2. Emulsions inverses	
7.2.3. Emulsions multiples	
7.2.4. Gels de fluorocarbures	
8. PHARMACOCINETIQUE-----	66
8.1. Un modèle pharmacocinétique à quatre compartiments.....	66
8.2. La persistance intravasculaire.....	67
8.3. Rétention dans les organes. Relation structure-excrétion.....	68
8.3.1. Le compromis stabilité/rétention dans les organes.....	68
8.3.1.1. Stabilité et hétéroatome	
8.3.1.2. Rétention dans les organes et structure cyclique	
8.3.1.3. Hétéroatome et structure cyclique : le compromis idéal ?	
8.3.2. L'importance de la masse moléculaire.....	70
8.3.2.1. Masse moléculaire et rétention dans les organes	
8.3.2.2. Masse moléculaire et pression de vapeur	
8.3.2.3. Masse moléculaire et stabilité	
8.3.3. L'intérêt d'un fluorocarbure lipophile	
9. EFFETS SECONDAIRES-----	74
9.1. Réactions anaphylactoïdes.....	74
9.2. "Flu like" syndrome.....	74
9.2.1. Signes cliniques	
9.2.2. Mécanisme	
9.2.3. Prophylaxie	
9.3. Hépatosplénomégalie.....	75
9.4. Augmentation du volume pulmonaire résiduel.....	76
9.4.1. Signes cliniques	
9.4.2. Mécanisme	
9.5. Perturbations biologiques.....	77
9.5.1. Fonction de coagulation	
9.5.2. Fonction immunitaire	

10. APPLICATIONS CLINIQUES POTENTIELLES-----	79
10.1. Perfluorocarbures purs.....	79
10.1.1. Ventilation liquide partielle en cas de syndrome de détresse respiratoire	
10.1.2. Ischémie intestinale	
10.1.3. Agent de contraste	
10.1.4. Chirurgie oculaire	
10.2. Emulsions PFC/eau.....	82
10.2.1. Applications transfusionnelles.....	82
10.2.1.1. Choc hémorragique	
10.2.1.1.1. Principe d'utilisation des fluorocarbures	
10.2.1.1.2. Etudes cliniques	
10.2.1.2. Hémodilution périopératoire	
10.2.1.3. Anémie chronique	
10.2.2. Phénomènes d'ischémies.....	85
10.2.2.1. Ischémies localisées	
10.2.2.1.1. Angioplastie coronarienne transluminale percutanée (ACTP)	
10.2.2.1.2. Infarctus du myocarde (IDM)	
10.2.2.1.3. Accident vasculaire cérébral (AVC)	
10.2.2.2. Ischémies généralisées	
10.2.3. Cardioplégie.....	87
10.2.4. Cancérologie.....	88
10.2.5. Conservation d'organes.....	89
10.3. Autres formes galéniques.....	90
10.3.1. Micro-émulsions PFC/eau	
10.3.2. Emulsions inverses	
10.3.4. Gels de fluorocarbures	
11. UTILISATION DETOURNEE-----	92
11.1. L'emploi des fluorocarbures dans les milieux sportifs.....	92
11.2. Détection - dosage.....	93
11.2.1. Dans le sang	
11.2.2. Dans l'air expiré	
CONCLUSION-----	95
BIBLIOGRAPHIE-----	97

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 314

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

QUIN (Julien). - Les perfluorocarbures. -
108 f. ; ill. ; tabl. ; 30 cm (Thèse : Pharm. ; Limoges ; 2002).

RESUME :

Les solutions d'hémoglobine et les émulsions de perfluorocarbures sont actuellement utilisées comme transporteurs d'oxygène injectables.

Les fluorocarbures sont des composés synthétiques dotés d'une inertie chimique, thermique et biologique exceptionnelle. Ils sont capables de dissoudre et de véhiculer de grandes quantités d'oxygène. Insolubles dans l'eau, ils doivent être administrés dans le secteur vasculaire sous la forme d'émulsions. Aujourd'hui, les émulsions de deuxième génération stabilisées par des phospholipides de jaune d'œufs succèdent aux émulsions de première génération qui utilisaient du Pluronic F-68® comme tensioactif.

Ces émulsions, d'une bonne tolérance clinique, seraient principalement employées dans les situations de choc hémorragique et d'hémodilution périopératoire afin de limiter le recours à la transfusion sanguine. Les applications médicales des fluorocarbures pourraient également s'étendre à de nombreux autres domaines (cancérologie, conservation d'organes...).

Enfin, la détection aisée de ces composés, au moyen de techniques fiables, permet d'espérer limiter leur usage illicite dans les milieux sportifs.

MOTS CLES :

- Perfluorocarbures - Emulsions
- Transporteurs d'oxygène injectables
- Perfluorocarbures - Aspect thérapeutique

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Gérard HABRIOUX
Juges : Madame le Professeur Dominique CHULIA
Madame le Docteur Annie CHEIPE
Mademoiselle Marie Pierre KRAFFT CR CNRS UPR 22 Strasbourg
