

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

2016

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE PHARMACIE HOSPITALIÈRE, PRATIQUE ET RECHERCHE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 25 mars 2016
à l'UFR Santé, Université d'Angers
par Monsieur BOUGUÉON Guillaume, Philippe, Alain
né le 08 avril 1988 à Pont-l'Abbé (29)

**Mise au point d'une formulation topique de sirolimus pour le
traitement des angiofibromes de la sclérose tubéreuse de
Bourneville au centre hospitalier universitaire d'Angers**

Composition du jury

Président : - Dr Antoine DUPUIS, maître de conférences, faculté de Médecine et Pharmacie,
Université de Poitiers; service pharmacie du CHU de Poitiers

Membres :- Pr Frédéric LAGARCE, PU-PH, UFR Santé, Université d'Angers, service
pharmacie du CHU d'Angers
- Pr Ludovic MARTIN, PU-PH, UFR Santé, Université d'Angers, service de
dermatologie et vénéréologie du CHU d'Angers
- Dr Brigitte PECH, maître de conférences, UFR Santé, Université d'Angers
- Dr Sandy VRIGNAUD, pharmacien assistant spécialiste, service pharmacie du
CHU d'Angers

Directeur de thèse : - Dr Sandy VRIGNAUD, pharmacien assistant spécialiste, service
pharmacie du CHU d'Angers



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique (HDR)
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- GRIGNON Claire, PH
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- PERKINS Marguerite

Poste d'ATER

- COSTA Damien

Poste de Moniteur

- VERITE Julie



Le Doyen,

Année universitaire 2015 - 2016

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- EUGENE Michel, physiologie (**surnombre jusqu'en 08/2016**)
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion
- GUILLET Gérard, dermatologie
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HADJADJ Samy, endocrinologie et maladies métaboliques
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HERPIN Daniel, cardiologie
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et réadaptation (**en détachement**)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- MACCHI Laurent, hématologie
- MARECHAUD Richard, médecine interne
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PAQUEREAU Joël, physiologie (**jusqu'au 31/10/2015**)
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- POURRAT Olivier, médecine interne (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (**surnombre jusqu'en 08/2017**)
- SILVAIN Christine, hépato-gastro- entérologie
- SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, cancérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DIAZ Véronique, physiologie
- FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
- FRASCA Denis, anesthésiologie – réanimation
- HURET Jean-Loup, génétique
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie (ex-CATEAU)
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- GOMES DA CUNHA José

Professeurs associés de médecine générale

- BINDER Philippe
- BIRAULT François
- VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

- ARCHAMBAULT Pierrick
- BOUSSAGEON Rémy
- FRECHE Bernard
- GIRARDEAU Stéphane
- GRANDCOLIN Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- JORDAN Stephen, maître de langue étrangère
- SASU Elena, contractuelle enseignante

Professeurs émérites

- DORE Bertrand, urologie (08/2016)
- GIL Roger, neurologie (08/2017)
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (08/2016)
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, cancérologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GOMBERT Jacques, biochimie
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- POINTREAU Philippe, biochimie
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- TOUCHARD Guy, néphrologie
- VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

A force de croire
en ses rêves,
l'homme en fait
une réalité



Brass.
d'après Hergé
et Hugo Pratt

Remerciements

À Monsieur le Docteur Antoine Dupuis,

Qui me fait l'honneur de présider ce jury. Merci pour vos précieux conseils prodigués lors de mes stages au CHU de Poitiers et qui m'ont permis de mener à bien mes projets d'orientation.

À Madame le Docteur Sandy Vrignaud,

Pour m'avoir confié ce travail ; pour ton encadrement et ta disponibilité durant cette année fort enrichissante. Reçois ma respectueuse reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Frédéric Lagarce,

Pour votre encadrement, vos précieux conseils et la confiance que vous m'accordez depuis mon arrivée sur Angers, voilà bientôt trois ans. Je vous adresse mes remerciements les plus sincères.

À Monsieur le Professeur Ludovic Martin,

Pour la confiance que vous nous avez accordée ; pour ce projet passionnant qui rapproche chaque jour encore plus notre cœur de métier au service des patients et qui renforce les liens entre nos deux professions. Recevez mes plus chaleureux remerciements.

À Madame le Docteur Brigitte Pech,

Pour avoir accepté de juger mon travail.

À Madame le Dr Marie Kempf et Madame le Docteur Hélène Paillores du laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers, pour leur aide à la réalisation de l'étude de stabilité microbiologique.

À Monsieur le Docteur Guillaume Bastiat, maître de conférences à l'UFR Santé d'Angers, pour ton aide et tes explications précieuses à la réalisation des travaux de mesure de viscosité.

Aux internes du service de dermatologie, Xavier Grimaud et Juliette Delaunay, pour leur aide et leur disponibilité.

À Christine Truffaut, technicienne au laboratoire de contrôle de la pharmacie, pour notre collaboration. Merci de m'avoir permis de consacrer du temps à ces travaux.

À l'ensemble du personnel de la pharmacie du CHU d'Angers, et notamment à celui du secteur production qui m'a permis d'y travailler dans la bonne humeur.

À mes yeux, le bonheur est un juste équilibre entre une vie professionnelle passionnante, une vie sociale et familiale rayonnante et une vie sentimentale comblée. Aussi, ce travail n'aurait pu être accompli sans vous :

À toi, Anne-Sophie, ma femme. Merci d'être à mes côtés, d'être à l'écoute, de me soutenir et de m'accompagner depuis bientôt maintenant 9 ans. Merci de faire en sorte que chaque jour soit encore meilleur que le précédent. A nous et à notre avenir.

À mes parents pour leur soutien, leur amour et leurs valeurs.

À toi René, pour m'avoir guidé et conseillé durant toutes ces années.

À mon frère et à mes sœurs, Jérémie, Clara et Fleuriane.

À mes grands-mères Léonie et Maneu. À la mémoire de mes grands-pères Jean et Corentin.

À mes beaux-parents, Corinne, Jean-Marie et Marie-Louise.

À mes amis qui font que chaque moment passé à vos côtés soient aussi épanouissants.

À l'ensemble de mes co-internes et de mes collègues que j'ai rencontré durant ces 5 années d'internat. Certains resteront pour moi des amis sincères.

À toi mon petit Grippy.

À tous mes professeurs qui m'ont enseigné les qualités nécessaires à l'aboutissement d'un tel travail.

Aux personnes qui malgré toutes ces éloges ne se seraient pas reconnues et à qui je dois beaucoup.

Puisse cette thèse être le reflet du grand intérêt que j'ai porté à la réalisation de ce projet.

À vous tous, merci.

Table des matières

Remerciements	7
Liste des figures et des images	12
Liste des tableaux	13
Liste des annexes	14
Liste des abréviations	15
Introduction	17
Première partie : la sclérose tubéreuse de Bourneville	18
I. Historique	18
II. Description de la pathologie	20
1. Clinique	21
a. Atteinte du système nerveux.....	21
b. Atteinte de la peau	22
c. Atteinte du cœur.....	23
d. Atteinte des reins	23
e. Atteinte des poumons	23
f. Atteinte oculaire	24
g. Autres atteintes	24
2. Physiopathologie : troubles génétiques et voie du mTOR.....	27
a. Génétique	27
b. La voie du mTOR.....	28
3. Diagnostic	30
4. Epidémiologie	31
5. Surveillance et traitement.....	32
III. Les angiofibromes faciaux	33
1. Description et physiopathologie.....	33
a. Description physique et données.....	33
b. Physiopathologie/Histologie	35
c. Pathogénie	36
2. Traitements	36
a. Traitements physiques	36
b. Traitements médicaux.....	37
Deuxième partie : comment développer une préparation topique de sirolimus pour traiter les angiofibromes de la sclérose tubéreuse de Bourneville ?	38
I. Cahier des charges initial	38
II. Le sirolimus et les inhibiteurs de mTOR	39
1. Historique	39
2. Mécanisme d'action.....	39
3. Les inhibiteurs de mTOR sur le marché et en développement	39
a. Les inhibiteurs de mTOR.....	40

b.	<i>Autres inhibiteurs de la voie du mTOR</i>	40
4.	Caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétique	42
a.	<i>Physico-chimie</i>	42
b.	<i>Pharmacocinétique et métabolisme</i>	43
5.	Les effets indésirables	43
6.	Données de sécurité	44
III.	Physiologie et principe de la pénétration cutanée	44
1.	La peau	44
a.	<i>Structure de la peau</i>	45
b.	<i>Caractéristiques de la peau</i>	45
2.	Principes fondamentaux de la pénétration cutanée ou perméation	47
a.	<i>Facteurs influençant l'absorption cutanée</i>	47
La peau	47	
Nature physico-chimique de la substance active	48	
Véhicule	48	
b.	<i>Mécanisme de l'absorption cutanée</i>	50
Voies de passage transcutané	50	
Cinétique du passage transcutané.....	51	
Méthodes d'évaluation de la pénétration cutanée	52	
c.	<i>Stratégies pour augmenter l'absorption</i>	53
IV.	Les inhibiteurs de mTOR en application cutanée : vers le traitement des angiofibromes	53
1.	Revue de la littérature	53
a.	<i>Les inhibiteurs de mTOR en topique pour traiter les angiofibromes faciaux</i>	56
b.	<i>Les inhibiteurs de mTOR en topique, autres indications</i>	59
c.	<i>Conclusion</i>	60
2.	Essais cliniques.....	61
3.	Brevets.....	62
4.	Audit en France sur la préparation	64
V.	Définitions et exigences réglementaires des préparations.....	67
1.	Définitions des préparations selon le code de la santé publique (CSP)	67
2.	Les Bonnes Pratiques de Préparations (BPP)	67
3.	Les préparations topiques selon la Pharmacopée Européenne.....	69
4.	Les exigences de la Pharmacopée Européenne concernant les préparations topiques	70
	Troisième partie : cahier des charges, matériel et méthode	71
I.	Cahier des charges de la préparation à réaliser	71
II.	Essais de formulation	73
1.	Matériel	73
2.	Locaux et protection	73
3.	Solubilisation du sirolimus dans diverses huiles ou surfactants	73
4.	Stockage de la crème	73
III.	Méthode d'extraction et de dosage du sirolimus	73
1.	Extraction du sirolimus à partir de la crème	73
2.	Dosage du sirolimus par chromatographie liquide haute performance (HPLC)	73
3.	Validation de la méthode	74

4.	Étude de dégradation forcée.....	74
IV.	Études de stabilité de la préparation	74
1.	Stabilité physico-chimique	74
2.	Stabilité microbiologique	75
3.	Mesures de viscosité.....	75
4.	Appréciations organoleptiques	75
V.	Recrutement des patients et évaluation de l'efficacité des premiers traitements ..	76
Quatrième partie : résultats et discussion.....		77
I.	La formulation	77
II.	Méthodes d'extraction et de dosage.....	79
III.	Études de stabilité	83
1.	Stabilité physico chimique.....	83
2.	Stabilité microbiologique	84
3.	Mesures de viscosités	85
4.	Appréciations organoleptiques	87
5.	Définition d'une date limite d'utilisation de la crème	87
IV.	Préparation et délivrance de la crème au CHU d'Angers	87
V.	Efficacités des premiers traitements	89
Conclusion.....		92
Glossaire dermatologique		93
Bibliographie.....		94
Annexes		103
Résumé		144
Abstract		144

Liste des figures et des images

Figure 1 : Désiré-Magloire Bourneville (Garencières (Eure) 20 octobre 1840-Paris 29 mai 1909).....	18
Figure 2 : sclérose tubéreuse cérébrales montrant des circonvolutions sclérotiques et hypertrophiques.....	19
Figure 3 : planche XX, figure 1, représentation des végétations vasculaires.	19
Figure 4 : symptômes et manifestations d'organes de la STB à différents stades de la vie....	21
Figure 5 : affections principales de la STB.....	25
Figure 6 : affections de la peau	26
Figure 7 : illustration de la transmission autosomique dominante.	28
Figure 8 : schéma de la voie du mTOR et exemples de pathologies qui en découlent.	29
Figure 9 : composition schématique des complexes mTOR : sous-unités activatrices (Raptor, mLST8, Rictor et Protor) et sous unités inhibitrices (PRAS40, Deptor et mSin1).	30
Figure 10 : exemples de manifestation des angiofibromes et âges respectifs des patients. ..	34
Figure 11 : coupe histologique d'un angiofibrome. Lésion du nez prélevée chez une femme de 47 ans.	35
Figure 12 : illustration du cahier des charges initial	38
Figure 13 : structure chimique des inhibiteurs de mTOR	42
Figure 14 : structure schématique de la peau	46
Figure 15 : structure schématique de l'épiderme à gauche et du <i>stratum corneum</i> à droite.	47
Figure 16 : différentes voies de passage transcutané.....	50
Figure 17 : cinétique de diffusion d'une substance à travers la peau	51
Figure 18 : schéma de la cellule de Franz modifiée par J.P.Marty.....	52
Figure 19 : formes galéniques reportées dans la littérature	56
Figure 20: concentrations des formes galéniques reportées dans la littérature et nombre d'études les rapportant.....	57
Figure 21 : illustration d'un schéma thérapeutique possible	60
Figure 22 : illustration du cahier des charges de la préparation	71
Figure 23 : exemple d'un pic chromatographique obtenu après extraction du sirolimus à partir d'une crème à 0.1%.....	80
Figure 24: exemple de chromatogramme obtenu avec du sirolimus	80
Figure 25 : sensibilité du sirolimus à l'oxydation	81
Figure 26 : sensibilité du sirolimus à la chaleur	82
Figure 27: étude de stabilité physico-chimique: concentration moyenne en sirolimus au cours du temps.....	83
Figure 28: exemple de mesure de viscosité. Hydrocrème à J0.....	85
Figure 29: comparaison dans le temps de la viscosité de l'hydrocrème	86
Figure 30: Comparaison dans le temps de la viscosité moyenne des échantillons	86
Figure 31 : tube de 30g de sirolimus à 0,1%	88
Figure 32 : patient n°1 avant (gauche) puis après 3 mois de traitement (droite)	90
Figure 33 : patient n°2 avant (gauche) puis après 3 mois de traitement (droite)	91

Figure 34 : patient n°5 avant (gauche) puis après 3 mois de traitement (droite) 91

Liste des tableaux

Tableau 1 : critères diagnostiques de la sclérose tubéreuse complexe	31
Tableau 2 : les inhibiteurs de mTOR sur le marché.....	41
Tableau 3 : propriétés physico-chimiques des inhibiteurs de mTOR.....	43
Tableau 4 : pharmacocinétique des inhibiteurs de mTOR.....	43
Tableau 5 : revue de la littérature. Sirolimus en application topique pour le traitement des angiofibromes de la STB.	54
Tableau 6 : exemples de brevets.....	63
Tableau 7 : solubilité du sirolimus dans différents solvants, huiles ou surfactants	78
Tableau 8 : composition de la crème au Sirolimus à 0.1%.....	79
Tableau 9 : concentration en sirolimus dans la crème exprimée par l'intervalle de confiance à 95% (n=3) par rapport à la concentration à J0.....	83
Tableau 10 : contamination microbienne de la crème durant le stockage (UFC = Unité Formant Colonie).....	84
Tableau 11 : contamination microbienne de la crème dans les conditions d'utilisation patient (UFC= unité Formant Colonie).....	84
Tableau 12 : résultats des scores FASI des patients traités	90

Liste des annexes

Annexe 1 :	poster P343 présenté aux Journées Dermatologiques de Paris 2015.....	104
Annexe 2 :	fiche d'évaluation des patients, score FASI	105
Annexe 3 :	résultats de la validation de la méthode de dosage HPLC	107
Annexe 4 :	protocole de préparation PH n°177.....	114
Annexe 5 :	protocole de contrôle PH n°177.....	119
Annexe 6 :	résultats de l'étude de stabilité physico-chimique.....	122
Annexe 7 :	notice PH n°177.....	123
Annexe 8 :	article proposé au journal IJP	125

Liste des abréviations

AF	Angiofibromes faciaux
Afssaps	Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé
AML	Angiomyolipomes
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament
AGEPS	Agence Générale des Equipements et Produits de Santé
APHP	Assistance Publique Hôpitaux de Paris
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
BPP et BPPH	Bonnes pratiques de préparations (hospitalières)
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
COMEDIMS	Comité du médicament et des dispositifs médicaux stériles
CSP	Code de la santé publique
DLU	Date limite d'utilisation
FASI	Facial Angiofibromas Severity Index
FDA	Food and Drug Administration.
HPLC	High performance liquid chromatography
INPI	Institut national de la propriété intellectuelle
LAM	Lymphangioliomyomatoses
LCR	Liquide céphalo rachidien
mTOR et TOR	mammalian target of rapamycin ; cible mammifère de la rapamycine
N.B. – :	Nota bene ; notez bien
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
PHRC	Programme hospitalier de recherche clinique
NSE	Nodules sous épendimaires
PPH	Préparateurs en pharmacie hospitalière
PUI	Pharmacie à usage intérieur
SEGA	Subependymal giant cell astrocytoma
ST, STB et TSC	Sclérose tubéreuse (de Bourneville) et tuberous sclerosis

Introduction

La sclérose tubéreuse de Bourneville est une maladie génétique multisystémique. Ses manifestations sont la conséquence de mutations affectant des gènes suppresseurs de tumeurs. Rare, elle touche environ une personne sur 20 000 et se caractérise par la formation de tumeurs bénignes, les hamartomes. Les plus emblématiques d'entre eux sont les angiofibromes faciaux qui s'apparentent à de petits boutons se développant sur les joues et les ailes du nez durant la petite enfance. Ces derniers croissent et se fibrosent avec l'âge. Inesthétiques et défigurants, leurs répercussions sont autant, sinon plus, psychologiques que physiques. Les angiofibromes faciaux deviennent pour certains patients leur préoccupation principale, devant les nombreux autres retentissements de la maladie.

Les traitements mis en œuvre pour pallier ces troubles ont jusqu'alors fait appel à la chirurgie et au traitement par laser. Dououreux et souvent difficiles à pratiquer, notamment chez les plus jeunes, ils sont d'une relative efficacité. L'attente des patients est ainsi grande vis-à-vis d'une thérapeutique efficace et performante à long terme.

Depuis une dizaine d'années, de nouveaux traitements médicaux utilisant des inhibiteurs de mTOR en application topique, et particulièrement le sirolimus, ont été publiés dans la littérature. Ces derniers ont montré leur efficacité et leur sécurité sur plusieurs petites séries de patients et ont suscité de vifs espoirs chez les malades atteints de sclérose tubéreuse. Cependant, aucune forme topique n'est pour le moment commercialisée ; le développement de médicaments destinés à traiter des affections rares n'étant pas la préoccupation principale de la plupart des industries pharmaceutiques. C'est pourquoi, l'aide des pharmaciens hospitaliers est requise par les médecins pour préparer de tels médicaments.

Au CHU d'Angers, le service de dermatologie a sollicité la pharmacie pour mettre ces nouveaux topiques à la disposition des patients. Nous avons décidé de réaliser une préparation et avons focalisé les recherches sur trois aspects. Premièrement, nous voulions développer une préparation à base de sirolimus dans sa forme solubilisée, afin d'obtenir une biodisponibilité optimale du principe actif et de permettre une optimisation des doses nécessaires. Deuxièmement, nous voulions proposer aux patients une préparation agréable à appliquer qui favoriserait leur observance et leur compliance au traitement. Enfin, nous voulions caractériser la formulation et évaluer sa stabilité au cours du temps afin d'assurer son efficacité lors de l'utilisation par les patients.

La thèse qui suit est un état de l'art quasi-exhaustif sur le sujet. Elle rapporte l'ensemble des connaissances nécessaires à la réalisation d'une telle préparation, l'enquête réalisée auprès de nos confrères en France sur leurs pratiques, l'ensemble des travaux de formulations et d'études de stabilité réalisées ; la mise en place de la préparation hospitalière au CHU d'Angers ainsi que les premiers retours patients.

Première partie : la sclérose tubéreuse de Bourneville

N.B. – Dans cette partie, les termes suivis d'un « (δ) » font référence à une définition du glossaire dermatologique page 93.

I. Historique

La sclérose tubéreuse (ST) est une maladie multisystémique complexe et rare dont l'étude approfondie et la compréhension des mécanismes physiopathologiques s'étalent sur plus de deux siècles. Si l'on reconnaît, à juste titre, que les travaux de l'aliéniste Désiré-Magloire Bourneville ont permis la définition de cette pathologie - à laquelle on accolera par ailleurs son patronyme -, de nombreux médecins et chercheurs ont contribué à sa description et à sa compréhension.

Cette caractérisation longue s'explique notamment par le degré d'expression des symptômes, variant d'un patient à l'autre, de leur distinction par rapport à d'autres pathologies et de leur association qui définissent la sclérose tubéreuse (δ). Ces découvertes ont suivi l'évolution de l'intérêt porté aux malades, des progrès de la médecine dans des domaines tels que l'anatomopathologie, la génétique et la biologie moléculaire, mais aussi des avancées technologiques en matière d'imagerie ou du partage et du recoupement des connaissances scientifiques sur le sujet. L'histoire de la ST s'alimente régulièrement des découvertes faites par les historiens de la médecine, dont les principales sont ici reportées.

En 1880, dans le service des aliénés de l'hospice de Bicêtre, **Désiré Magloire Bourneville** (Figure 1, (1)), neurologue, entreprend le recueil d'observations anatomo-cliniques sur la démence épileptique et l'idiotie. Parmi 5 cas de tableaux cliniques identiques, deux enfants (une fille de 15 ans et un garçon de 4 ans) présentaient à l'autopsie des lésions macroscopiques de l'encéphale, différentes de celles des trois autres. Bourneville, conscient de la singularité des lésions qu'il avait constatées, en fit une description anatomopathologique précise et les dénomma « **scléroses tubéreuses des circonvolutions cérébrales** » (2) (3) (Figure 2 (4)).



Figure 1 : Désiré-Magloire Bourneville (Garencières (Eure) 20 octobre 1840- Paris 29 mai 1909).

Bourneville décrira les années suivantes d'autres cas d'enfants présentant des manifestations cliniques similaires. Il retrouvera à l'autopsie de ces patients des îlots de sclérose tubéreuse, mais également de « **petits néoplasmes du rein** » décrits comme « *de nombreuses petites tumeurs blanches, ressemblant à des îlots de sclérose* ». D'autres auteurs, **Hartdegen** en 1881, **Brückner** en 1882, rapprocheront leurs propres observations cliniques de malades, aux recherches de Bourneville.

Une description fort intéressante du médecin allemand **Friedrich Daniel von Recklinghausen** en 1962 n'a été redécouverte que bien plus tard. Vingt ans avant Bourneville, il décrit le cas d'un enfant mort-né, présentant de **nombreuses tumeurs, notamment au niveau cardiaque et cérébral** ; tumeurs que l'on attribuera par la suite à la ST.

Sur la dizaine de patients observés, Bourneville ne parviendra pas à trouver des particularités cliniques majeures permettant d'identifier cliniquement la ST par rapport à ses observations sur l'idiotie symptomatique ; soulignant ainsi les **difficultés diagnostiques et par ailleurs la rareté de l'affection**. La possibilité d'identifier cliniquement la ST viendra des manifestations extra-neurologiques de la maladie et notamment dermatologiques. Dans les notes de Bourneville, on remarquera qu'une patiente de 5 ans présentait, en plus d'une acné rosacée et pustuleuse (δ) de la face, une « **éruption vésiculopapuleuse confluente du nez, des joues, du front** » (δ) avec de « **nombreux petits molluscums de la nuque et du cou** ». Ces lésions étaient sans aucun doute des angiofibromes faciaux (AF) et des *molluscum pendulum*.

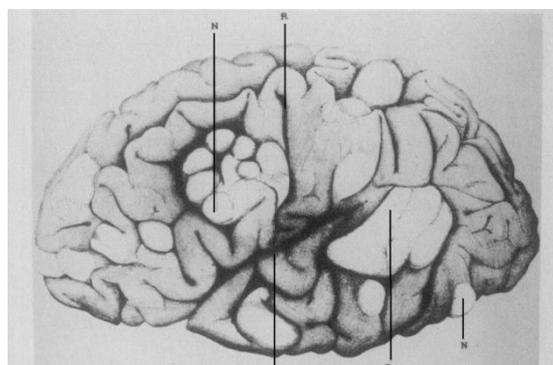


Figure 2 : sclérose tubéreuse cérébrales montrant des circonvolutions sclérotiques et hypertrophiques.

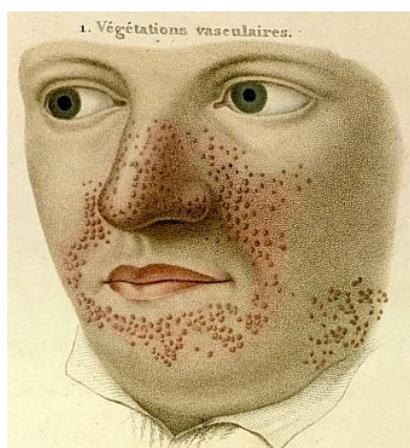


Figure 3 : planche XX, figure 1, représentation des végétations vasculaires.

La plus ancienne représentation des AF a été retrouvée dans le « *Traité des maladies de la peau* », édité par **Pierre François Olive Rayer** en 1835. Sur la planche XX nommée « **Altérations vasculaires hémorragiques** », l'illustration de la figure 1 présente des « *Petites végétations vasculaires, d'apparence papuleuses, répandues d'une manière régulière sur le nez et autour de la bouche* » (5) (Figure 3 (5)). En 1885, en France, **Balzer** et **Ménétrier** décrivent un syndrome cutané sous le nom « **d'adénomes sébacés de la face et du cuir chevelu** » (6). Leur patiente, une fille de 21 ans en parfait état général, avait vu apparaître dès l'âge de 11 ans, des lésions cutanées du visage qui s'étaient aggravées progressivement en volume et en étendue à la puberté. En 1890, l'écoissais **Pringle** présente le cas similaire d'une femme de 25 ans mais pour laquelle l'intelligence était « **au-dessous du médiocre** ».

Les deux syndromes, neurologique et cutané, ont ainsi pris corps indépendamment l'un de l'autre. Le premier à les rassembler fut **Campbell** en 1905. Il rapprocha les convulsions et la déficience intellectuelle de la ST aux adénomes sébacés, « *fréquents sinon constants, et qui rapprochés des signes neurologiques doit conduire au diagnostic*

du vivant du malade ». La même année, **Perusini** fit allusion aux lésions cutanées et écrivait qu'entre les altérations des circonvolutions, celles des reins et celles de la peau, il ne s'agissait pas d'une rencontre de hasard, mais bien des **conséquences d'une origine commune**. Le diagnostic clinique de la maladie n'en restait pas moins, à ses yeux, à peu près impossible.

Trois ans plus tard en 1908, **Heinrich Vogt** parvint grâce au syndrome cutané, à poser un diagnostic qui fut confirmé par autopsie. Il établit la triade symptomatique : épilepsie, retard mental, adénome sébacé. **Schuster** en 1913 établit l'existence de **formes frustes ou inapparentes** compatibles avec une vie prolongée. Dans ces formes frustes, les troubles psychiques et les manifestations épileptiques sont moins importants et le niveau intellectuel peut être normal. Schuster insiste sur le fait que le syndrome cutané « ne s'observe pas seulement chez les patients mais fréquemment aussi chez leurs consanguins » et il considère la ST comme une **maladie hérédofamiliale**.

Les symptômes de la ST ont par la suite été régulièrement dénombrés et ajoutés au diagnostic clinique. La compréhension de cette maladie complexe est relativement récente et remonte seulement à une vingtaine d'années notamment grâce à l'apport de la génétique.

Terminologie : le terme de « sclérose tubéreuse » qui est celui de Bourneville dès sa première publication - auquel il ajoutera par la suite « hypertrophique »-, a été d'emblée adopté et transcrit en anglais par *tuberous sclerosis* ou sa traduction latine *Sclerosis tuberosa hypertrophica*. Le terme est solidement ancré dans le langage international et assure la pérennité du nom de Bourneville.

Sources : (4) (6) (7) (8)

II. Description de la pathologie

La sclérose tubéreuse de Bourneville (STB) fait partie des phacomatoses, un groupe de maladies impliquant une anomalie de développement du tissu ectodermique .Elle présente une grande variabilité phénotypique et se caractérise notamment par la formation de tumeurs bénignes (sous entendues non cancéreuses), les hamartomes (6).Le développement de ces derniers est en partie la cause des symptômes retrouvés chez les patients atteints de STB.

Les manifestations cliniques apparaissent tout au long de la vie des patients (Figure 4 (9)). Certaines sont évolutives (angiomyolipomes rénaux et angiofibromes), d'autres perdent leur potentiel de croissance (astrocytomes SEGA) ou régressent (rhabdomyomes cardiaques). Certaines manifestations sont différentes ou préférentielles suivant le sexe (la lymphangioliomyomatose affecte quasi exclusivement les femmes) et la gravité des symptômes peut varier en fonction des gènes touchés. Les deux organes les plus généralement affectés sont le cerveau et la peau (90-95% des patients) (8).

Auparavant difficile à diagnostiquer, les progrès réalisés en imagerie médicale et en génétique ont contribué à y remédier. Les connaissances sur cette pathologie s'élargissent et il est possible de diagnostiquer des patients « légèrement touchés », normales sur le plan cognitif et présentant peu de symptômes.

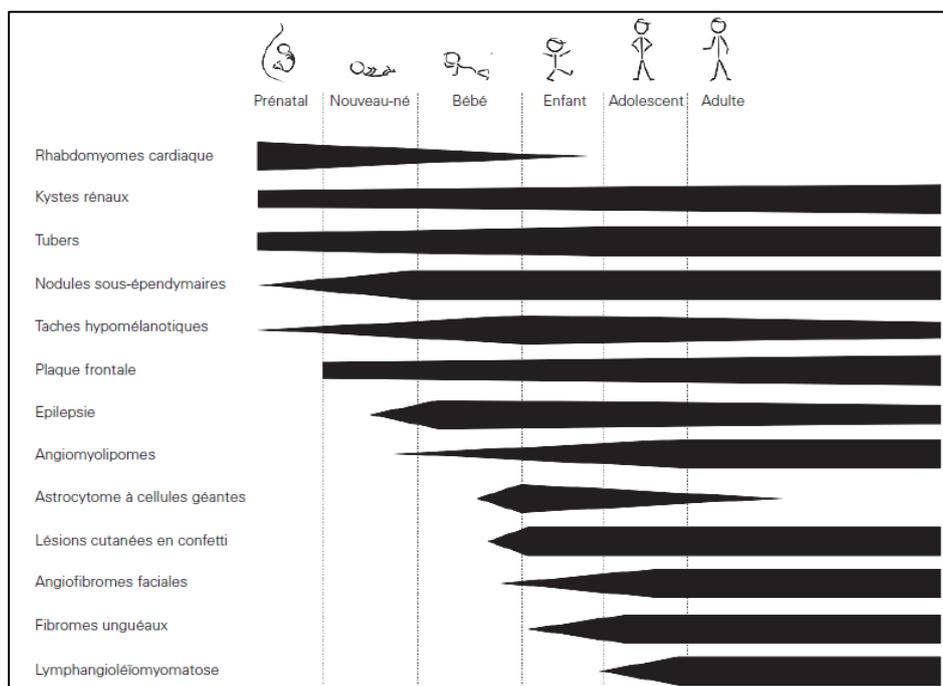


Figure 4 : symptômes et manifestations d'organes de la STB à différents stades de la vie.

1. Clinique

a. Atteinte du système nerveux

Les patients STB sont atteints de dysplasie corticale : durant le développement cérébral, des groupes de neurones échouent à migrer dans les zones adéquates du cerveau, causant des anomalies de répartition de la substance blanche et la formation de tubers corticaux (amas de cellules neuronales et astrocytaires) qui varient en taille et en distribution (Figure 5.A).

On observe également chez les patients STB, des accumulations de cellules sur les bords des ventricules, formant des tumeurs cérébrales bénignes appelées nodules (δ) sous épendymaires (NSE). Une partie de ces NSE (5-10 %) peut grossir sous la forme d'astrocytomes à cellules géantes (SEGA « *subependymal giant cell astrocytoma* »), obstruer le passage du LCR et provoquer une hypertension intracrânienne. Les SEGA apparaissent chez les enfants et les adolescents et peuvent continuer à se développer à l'âge adulte contrairement aux tubers (Figure 5.B).

La principale manifestation clinique liée à l'atteinte du système nerveux est l'épilepsie. Près de 90% des patients en sont atteints. En parallèle, les atteintes neuropathologiques entraînent des difficultés d'apprentissage (50% des patients), un déficit intellectuel important (50% des patients), des troubles du comportement, des troubles du spectre

autistique (interactions sociales, communication verbale, comportements stéréotypés), de l'anxiété, de la dépression, une hyperactivité ou bien des troubles du sommeil. L'adolescence est un moment de grande fragilité où il faut particulièrement surveiller les personnes atteintes de STB ; les troubles de l'humeur et du comportement pouvant apparaître ou s'accroître à cette période.

Les atteintes du système nerveux sont compliquées à prendre en charge et sont une des causes principales de la morbi-mortalité de la STB (8) (10).

b. Atteinte de la peau

90 à 95% des patients présentent une affection dermatologique. Nombreuses, elles apparaissent très souvent dans les premiers mois de la vie (11).

Les **macules hypomélaniques (δ)** ont une prévalence supérieure à 90% chez les enfants de moins de 5 ans. Signe clinique dermatologique le plus précoce, ce sont des taches cutanées non saillantes et blanches, de taille et de forme très variables (11). Elles sont non spécifiques de la STB et sont à distinguer des macules du vitiligo. Leur identification nécessite un éclairage particulier en lumière de Wood (UV) ; elles reflètent alors la lumière (10) (Figure 6 A, B).

Les **angiofibromes faciaux (AF)** sont de petits boutons répartis tout autour du nez et sur les joues de façon bilatérale et symétrique. Les AF font l'objet de la *partie « III. Les angiofibromes »*, page 33.

Les **fibro-kératomes unguéaux** ou **tumeurs de Koenen** apparaissent surtout dans l'adolescence ou au début de l'âge adulte. Ils sont présents chez 88% des adultes de 30 ans et plus. Ces papules (δ) à couleur de peau sont localisés autour ou au-dessous de l'ongle. Ils apparaissent souvent dans la population générale suite à des traumatismes; mais ces derniers y sont généralement solitaires (11) (Figure 6 C, D).

Les **plaques peau de chagrin** se développent souvent chez les enfants dans les 10 premiers mois de vie. Ce sont des régions de peau un peu épaissies, bosselées et décolorées, d'aspect peau d'orange, situées généralement dans le bas du dos (11) (Figure 6 E).

Les **lésions cutanées confetti** sont des macules hypopigmentées de 1 à 3 mm, nombreuses et de forme en goutte, qui sont éparpillées le plus souvent sur les bras et les jambes (12) (Figure 6F).

Les **fibromes oraux buccaux (δ)** sont présents chez 20 à 50% des adultes. Ce sont de petits nodules qui se développent sur les gencives, les lèvres, la muqueuse buccale ou la langue. Leur multiplicité les singularise chez les patients STB par rapport aux fibromes solitaires de la population générale (12) (Figure 6 G).

Les **molluscum pendulum** ou « petites excroissances de chair » se retrouvent chez 30 % des patients. Ces tuméfactions cutanées bénignes ne sont pas spécifiques de la STB mais

y sont plus nombreuses et se localisent préférentiellement à l'arrière du cou et des épaules (10) (Figure 6 H (13)).

Les **plaques fibreuses céphaliques** se retrouvent chez environ 25% des patients. Elles peuvent se développer sur les joues, le front ou le scalp. Histologiquement très proches des angiofibromes, elles sont liées aux AF dans les critères diagnostiques. Elles s'avèreraient être les manifestations dermatologiques les plus spécifiques de la STB (11) (12) (Figure 6 I).

Les manifestations dermatologiques de la STB peuvent pour certaines saigner ou s'infecter mais ne présentent pas en soit de complications médicales. Cependant, si elles deviennent importantes, elles peuvent être très défigurantes (angiofibromes) et sont une cause de stress psychologique pour les patients et leurs familles (8).

c. Atteinte du cœur

Les rhabdomyomes sont des tumeurs bénignes du cœur qui apparaissent durant la gestation chez la moitié des patients. Hautement spécifiques de la STB, ils peuvent être détectés par échographie prénatale et sont ainsi les premiers signes cliniques de l'atteinte chez l'enfant. Généralement situés dans les ventricules, ils sont le plus souvent asymptomatiques et régressent spontanément chez le nourrisson. Mais dans certains cas ils peuvent interférer avec les fonctions valvulaires, entraîner des dysrythmies ou des insuffisances cardiaques (8) (10) (Figure 5.C).

d. Atteinte des reins

Des kystes et des angiomyolipomes (AML), constitués de cellules musculaires lisses et de vaisseaux sanguins, se forment au niveau rénal. 80 à 85% des patients en sont atteints. Ils apparaissent surtout après l'âge de 10 ans et chez les adultes, notamment les femmes. Les AML sont souvent asymptomatiques, mais leur croissance exagérée et la formation de néovaisseaux présentent des risques d'hémorragie sous forme de pseudo-anévrismes. Ces hémorragies sont la seconde cause de morbi-mortalité de la STB.

L'atteinte peut évoluer vers l'insuffisance rénale et entraîner des hypertensions artérielles. On pense également que les patients STB sont plus sujets à développer des carcinomes rénaux par rapport à la population générale. Ainsi, la surveillance par imagerie (scanner, IRM, échographie) et l'évaluation régulière des fonctions rénales doit faire partie de la surveillance des patients tout au long de leur vie (8) (10) (Figure 5.D (9)).

e. Atteinte des poumons

Les patients, notamment les femmes (1/3 d'entre elles), peuvent être atteintes de lymphangioléiomyomatoses (LAM). Des kystes remplis d'air se développent du sommet à la base des poumons et détruisent le parenchyme. Ils apparaissent après la puberté et

à l'âge adulte. Bien que pour la plupart asymptomatiques, ils peuvent altérer de façon progressive les fonctions respiratoires.

Les manifestations cliniques fréquentes sont des sensations de douleurs dans la poitrine, des pneumothorax spontanés, des dyspnées insidieuses, des hémoptysies. L'évolution à long terme des kystes peut évoluer vers l'insuffisance respiratoire chronique. La transplantation pulmonaire reste le seul traitement pour les patients sévèrement atteints (8) (10) (Figure 5.E)

f. Atteinte oculaire

L'atteinte oculaire la plus courante est le phacome ou « hamartome rétinien multiple », qui aurait la même origine histologique que les tubers corticaux. 50% des patients en sont atteints. Généralement bénins, ils n'affectent que rarement la vision. D'autres manifestations telles que des patchs achromiques rétiniens, caractérisés par une hypopigmentation de la rétine, peuvent survenir. (8) (10) (12) (Figure 5.F).

g. Autres atteintes

De nombreux autres organes peuvent également être touchés par la STB :

- Les patients sont souvent atteints de troubles gastro- intestinaux : AML ou lipomes hépatiques, polypes rectaux ou bien AML du pancréas. Néanmoins, ces troubles ne sont cliniquement pas significatifs par rapport à population générale.
- A l'imagerie, il est possible d'identifier des affections du système squelettique comme des lésions sclérotiques des vertèbres ou des kystes osseux.
- Les atteintes dentaires méritent également d'être soulignées. Des tuméfactions au niveau gingival et dentaire sont possibles et peuvent saigner. Des pits dentaires, se présentant sous forme de trous répartis de façon aléatoire dans l'émail dentaire sont fréquemment présents dans la STB (Figure 5.G).

Source : (8) (10) (12)

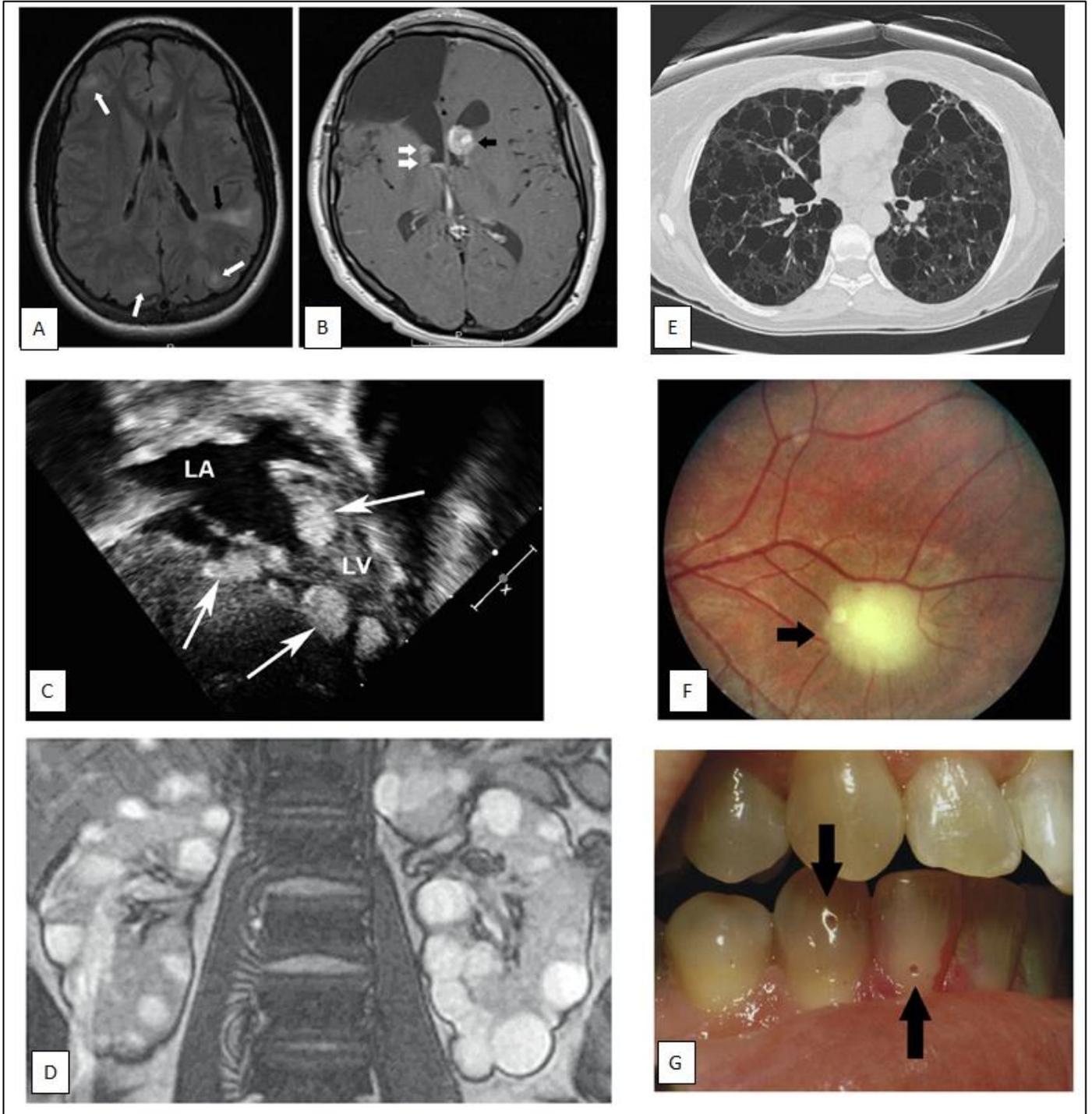


Figure 5 : affections principales de la STB

- A : IRM cérébral montrant une dysplasie corticale (tubers et anomalies de la substance blanche indiquées par des flèches blanches et noires respectivement) (12)
- B : IRM montrant des NSE (flèche blanche) et des SEGA (flèche noire) (12)
- C : rhabdomyomes cardiaques à l'échographie (flèches) (12)
- D : reins polykystiques à l'IRM (9)
- E : lymphangioliomyomatoses (12)
- F : hamartome rétinien (flèche) (12)
- G : tips dentaires (flèches) (12)

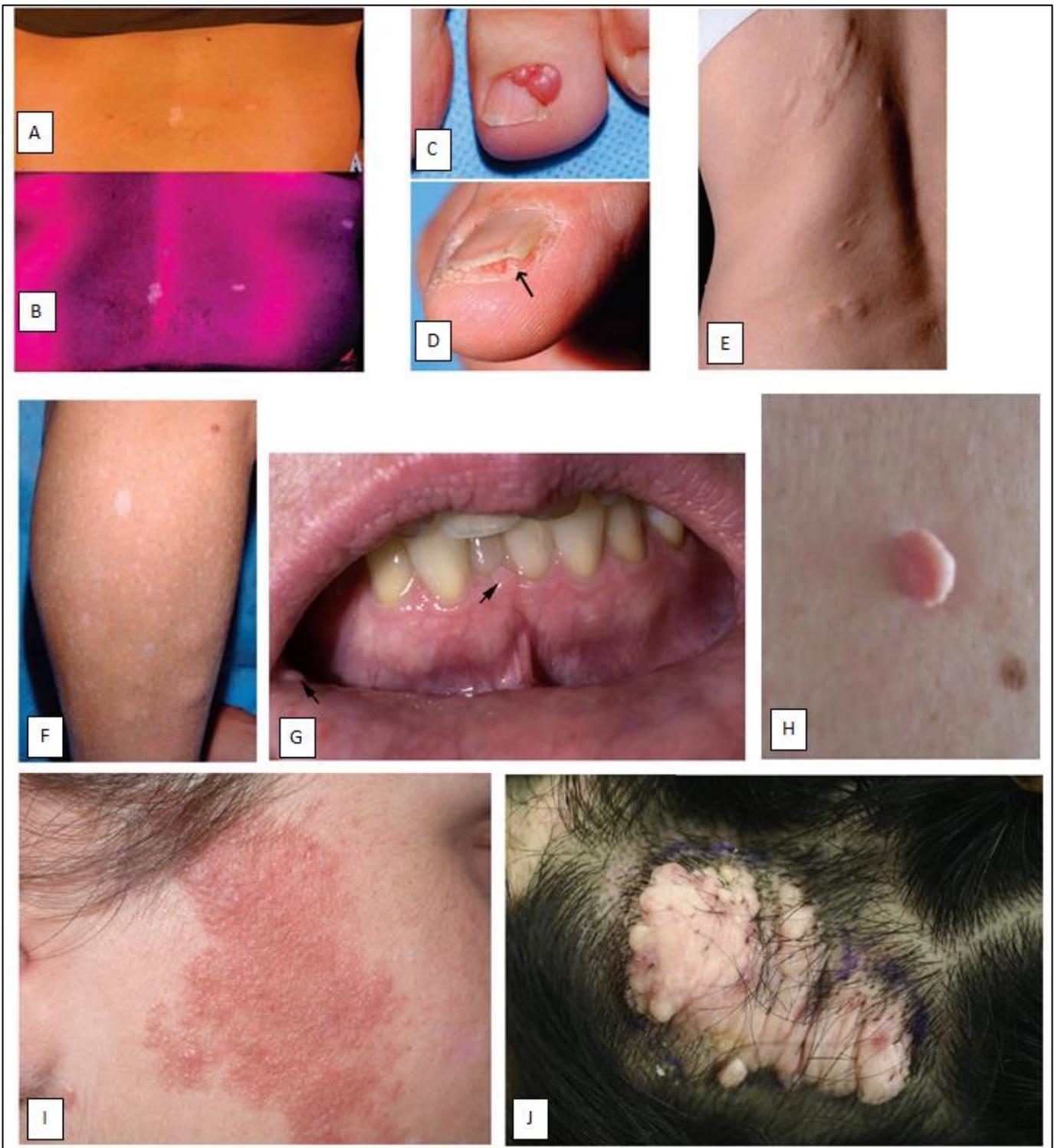


Figure 6 : affections de la peau

- A : macules hypomélaniques du dos (8)
- B : accentuation des mêmes lésions sous lumière de Wood (8)
- C : tumeurs de *Koenen* sur l'ongle (8)
- D : Tumeurs de *Koenen* subunguéal (8)
- E : plaque peau de chagrin (8)
- F : lésions cutanées confettis (8)
- G : fibromes oraux buccaux (8)
- H : *molluscum pendulum* (13)
- I : plaque fibreuse céphalique sur la joue (11)
- J : plaque fibreuse céphalique du scalp (12)

2. Physiopathologie : troubles génétiques et voie du mTOR

a. Génétique

Le caractère héréditaire de la maladie a été décrit dès le début du 20^{ème} siècle par l'observation de plusieurs cas de STB survenant au sein d'une même famille. C'est à partir des années 80 que la recherche génétique sur ce sujet débute réellement. Deux gènes identifiés, nommés TSC1 et TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex) sont mis en cause par des études de liaison puis caractérisés précisément en 1993 (TSC2) et en 1997 (TSC1).

Le gène TSC1 est localisé sur le chromosome 9q34 et encode une protéine de 130kDa, l'hamartine. Le gène TSC2 est quant à lui localisé sur le chromosome 16p13 et encode la protéine tubérine de 198kDa. TSC1 et TSC2 sont des gènes suppresseurs de tumeurs. L'hamartine et la tubérine forment un complexe qui inhibe la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin) (8).

La conférence internationale de consensus de 2012 sur la STB, définit une mutation pathogénique comme étant : « *une mutation qui inactive clairement la fonction des protéines TSC1 ou TSC2* ». L'identification d'une telle mutation est à elle seule un critère diagnostic. Elle est un atout précieux pour confirmer les suspicions d'atteinte, notamment chez l'enfant, et permet ainsi d'espérer de meilleurs résultats cliniques en mettant en œuvre une surveillance et un traitement précoce (11).

Les patients atteints de STB présentent ainsi une anomalie génétique soit sur TSC1, soit sur TSC2. Plus de 8000 variants de TSC1 et TSC2 ont été reportés. (14) Il n'y a pas de différences dans les manifestations cliniques liées à l'un ou l'autre de ces gènes. Cependant, les formes liées à TSC1 conduiraient à une atteinte moins sévère (10).

Les mutations de TSC1 représentent environ 30% des mutations et celles de TSC2 70% (15). Il est possible d'identifier une mutation chez 80 à 90 % des patients. Malheureusement, certaines mutations s'avèrent indétectables en utilisant des tests génétiques conventionnels : manque de puissance des tests ou mise en cause d'un mosaïsme (coexistence de cellules saines et cellules mutées chez un même patient) ? Chez les patients à mutations non identifiées le recours au diagnostic purement clinique est ainsi primordial (10).

La STB est une maladie génétique autosomique (les anomalies n'étant pas localisées sur les chromosomes sexuels) dominante (un seul allèle muté suffit à exprimer la maladie) (Figure 7). La mutation à l'origine de la STB est héritée de l'un des deux parents atteints dans environ 30% des cas. Pour les 70% restant, il s'agit d'une néomutation ; la mutation survient accidentellement au cours de la formation des gamètes d'un des deux parents non atteints de STB. L'enfant est alors le premier malade identifié dans la famille. Si lui-même a par la suite des enfants, le risque de transmettre la maladie est de 50 % (10).

De par le polymorphisme des manifestations et le degré d'expressivité variable de la maladie, un patient peut être atteint et l'ignorer. Cependant, la pénétrance pour la STB est quasi-complète ; toutes les personnes porteuses du gène muté présentent des signes de la maladie (lésions oculaires, rénales, cérébrales...) (10).

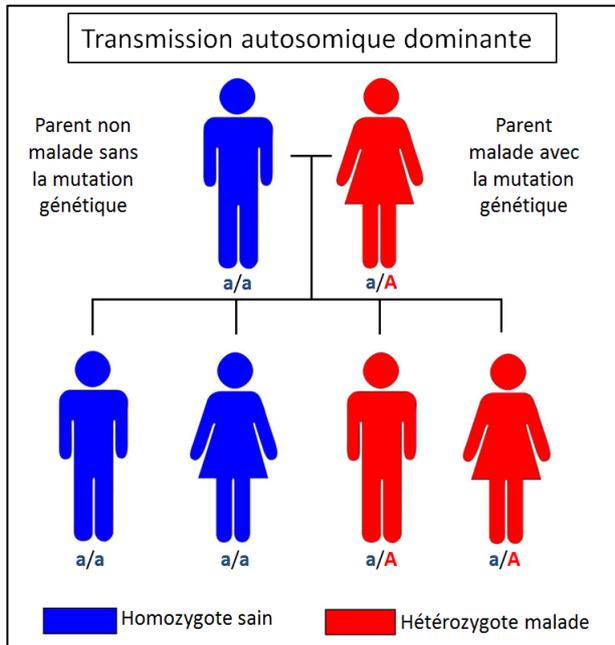


Figure 7 : illustration de la transmission autosomique dominante.

Un des parents possède une copie mutée du gène (A) et est atteint de la STB, tout comme son enfant a/A. À chaque grossesse, le risque qu'un enfant d'une personne a/A soit malade est de 50%. Les enfants a/a ne sont pas malades et ne peuvent pas transmettre la maladie.

Le diagnostic prénatal peut être réalisé si la mutation est connue dans la famille par biopsie du trophoblaste (placenta) ou par amniocentèse. Une technique de fécondation in vitro et un diagnostic préimplantatoire pourront être proposés. Si la mutation est inconnue, il est possible de surveiller les signes échographiques (rhabdomyome cardiaque) ou de réaliser une IRM cérébrale fœtale à 30 semaines d'aménorrhée, mais cela ne permettra pas de déceler tous les cas de STB (10).

b. La voie du mTOR

La voie de signalisation intracellulaire du mTOR (Figure 8, (16)) est un modulateur central de la réponse cellulaire face aux stimuli de l'environnement : nutriments, oxygène, facteurs de croissance, énergie. Elle joue un rôle important dans la régulation de la croissance, la mobilité, la prolifération ou bien la survie cellulaire. Cette voie est complexe, composée de nombreux effecteurs principaux et secondaires et est gérée par plusieurs systèmes de rétrocontrôle (17).

La cible de la rapamycine (TOR), est une protéine qui a en premier lieu été découverte dans une levure, *Saccharomyces cerevisiae*, mutée et résistante à la rapamycine. L'homologue structurel et fonctionnel mTOR a par la suite été identifié chez les mammifères. Jusqu'à présent, chaque génome eucaryote étudié contenait un gène codant cette protéine. C'est une sérine thréonine kinase de 289kDA qui appartient à la famille des PIKKs (*PI3K-related protein kinase*), et située en aval de la voie PI3K/AKT (17) (Figure 8, (16)).

La protéine mTOR se présente sous la forme de deux complexes protéiques distincts, mTORC1 et mTORC2, composés de différents domaines activateurs et inhibiteurs (17) (Figure 9, (17)) :

- Le complexe mTORC1 est activée par la voie PI3K/AKT, mais aussi MAPK et AMPK et inhibée par les complexes TSC1/2. Elle active à son tour par phosphorylation les protéines S6K1 et 4EBP1, impliquées dans la traduction des ARN messagers. Le but est principalement de contrôler la croissance. mTORC1 est sensible à la rapamycine.
- Le complexe mTORC2 est considéré comme résistant à la rapamycine et est généralement insensible aux nutriments et aux signaux énergétiques. Il active PKC- α et AKT, régule la survie cellulaire, la migration et le cytosquelette d'actine.

mTORC1 et mTORC2 ont ainsi des fonctions physiologiques spécifiques et une sensibilité différente vis à vis de la rapamycine. Bien que mTORC2 y soit insensible, un traitement prolongé par inhibiteurs de mTOR peut à long terme détruire l'assemblage de mTORC2 et sa fonction (17).

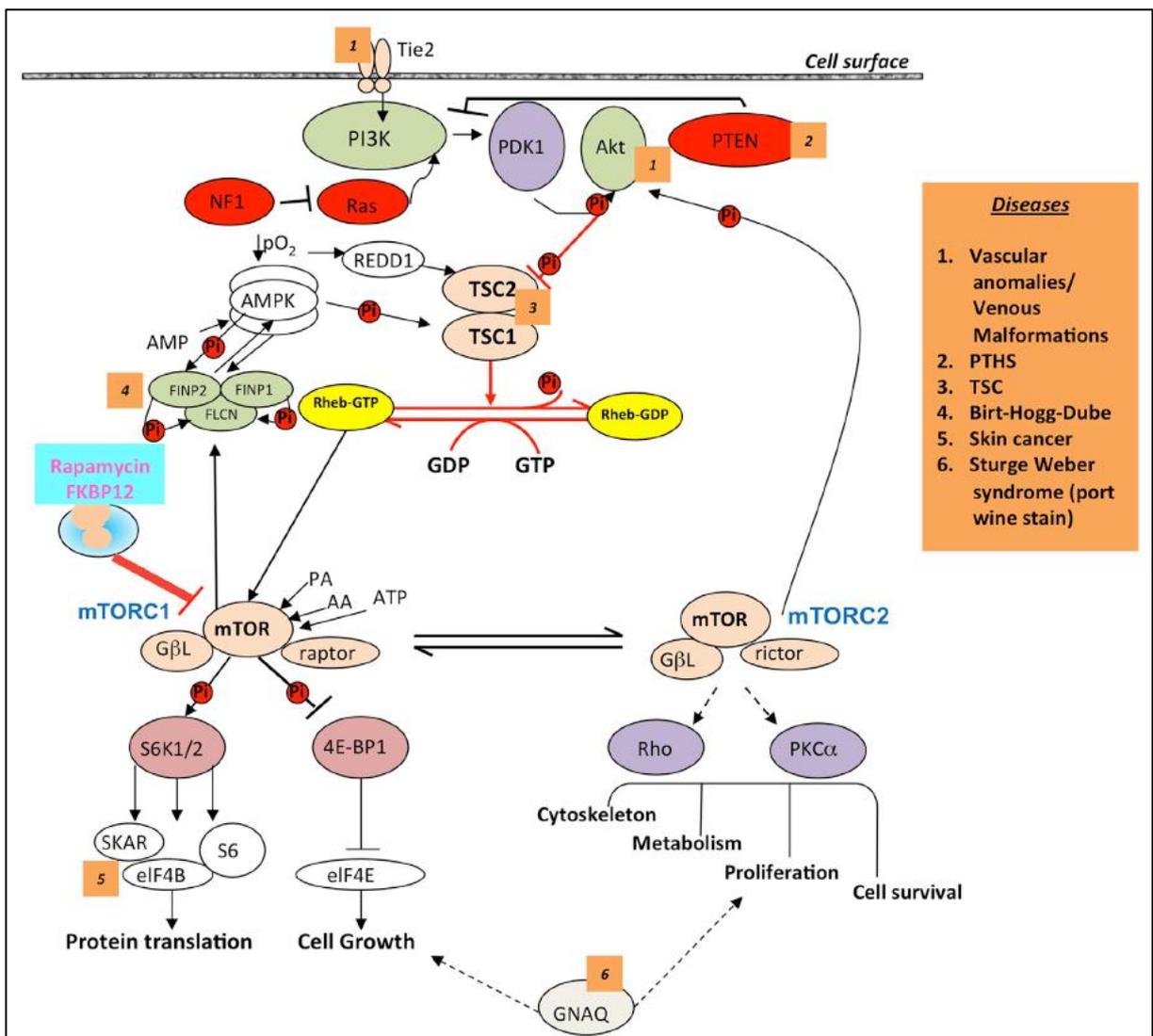


Figure 8 : schéma de la voie du mTOR et exemples de pathologies qui en découlent.

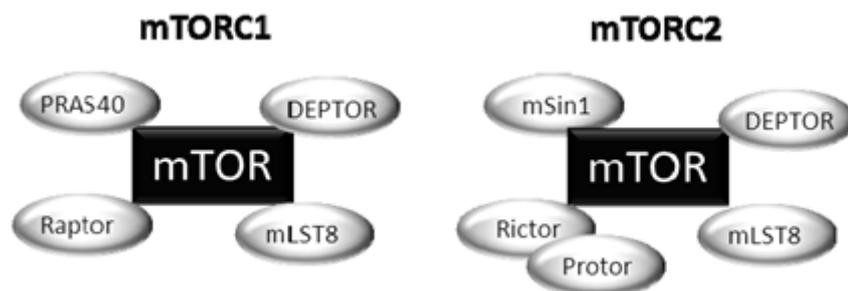


Figure 9 : composition schématique des complexes mTOR : sous-unités activatrices (Raptor, mLST8, Rictor et Protor) et sous unités inhibitrices (PRAS40, Deptor et mSin1).

La dérégulation d'éléments de la voie du mTOR par l'amplification, la perte de fonction ou la surexpression, sont impliquées dans de nombreuses pathologies, notamment les troubles néoplasiques : activation des effecteurs AKT (cancer du sein et ovarien), PI3K (cancer ovarien, gastro-intestinal, du sein ou de la prostate), de PTEN (mélanome et "syndromes des hamartomes par mutation du gène PTEN"), folliculine (syndrome de Birt-Hogg-Dubé) etc... (17) (16).

La voie du mTOR est normalement inhibée par les protéines des gènes TSC1 et TSC2, l'hamartine et la tubérine. Dans la STB, le manque de ces protéines conduit à une hyperactivation constitutive de la voie du mTOR qui entraîne à son tour une prolifération incontrôlée, une différenciation et une migration cellulaire importante (16).

3. Diagnostic

La dernière conférence internationale de consensus sur la STB date de juin 2012 (la précédente datant de 1998). 79 spécialistes de 14 pays se sont réunis pour actualiser les connaissances et mettre à jour les recommandations sur le diagnostic, la surveillance et la prise en charge des patients STB (12) (18). L'évolution majeure de cette harmonisation est l'incorporation des tests génétiques de screening de TSC1 et TSC2 dans le diagnostic. La classification des symptômes cliniques a été mise à jour et a abouti à leur répartition en fonction de deux critères : sensibilité et spécificité. 11 critères ont été définis comme majeurs et 6 comme mineurs (Tableau 1, (12)).

Le diagnostic et l'évaluation clinique d'une STB chez un patient passe par une longue série de tests : génétiques, IRM (Imagerie par résonance magnétique) de la tête et de l'abdomen, évaluation psychiatrique, EEG (électroencéphalogramme), HRCT (tomographie haute résolution du tronc), échographie cardiaque et rénale, ECG (électrocardiogramme), évaluation des fonctions respiratoires et enfin inspections dermatologique, dentaire et ophtalmologique minutieuses.

La prise en charge des patients et le diagnostic de la STB relèvent d'une multidisciplinarité importante. Le dermatologue y joue un rôle important au vu des nombreux critères dermatologiques (4 majeurs et 3 mineurs) (11)(Tableau 1, (12)).

Tableau 1 : critères diagnostiques de la sclérose tubéreuse complexe

A. Critères diagnostiques génétiques	
L'identification d'une mutation pathogène de TSC1 ou TSC2 (qui inactive la fonction de la protéine ou empêche sa synthèse) dans un tissu normal pose un diagnostic certain de STB, même sans lésion clinique. Un variant non pathogène ne permet pas de poser le diagnostic. N.B. - 10 à 25% des patients n'ont pas de mutation identifiée, ce qui n'exclut pas le diagnostic de STB et ne dispense pas de recourir aux critères cliniques.	
B. Clinique	
Critères majeurs	Critères mineurs
1. Macules hypomélaniques de 5mm de diamètre au moins (≥ 3)	1. Lésions cutanées « confetti »
2. Angiofibromes (≥ 3) ou plaques fibreuses céphaliques*	2. Anomalies de l'émail dentaire (> 3)
3. Fibromes unguéaux (> 2)	3. Fibromes intra-buccaux ou gingivaux (> 2)
4. Plaque « peau de chagrin »	4. Tache achromique rétinienne
5. Hamartomes rétinien multiples	5. Kystes rénaux multiples
6. Dysplasie corticale**	6. Hamartomes non rénaux ****
7. Nodules sous-épendymaires (NSE)	
8. Astrocytome sous-épendymaire à cellules géantes (SEGA)	
9. Rhabdomyome cardiaque	
10. Lymphangioliéomyomatose (LAM) ***	
11. Angiomyolipomes (> 2) ***	

* Les angiofibromes sont un critère diagnostique mineur lorsqu'ils apparaissent à l'âge adulte
** Regroupe deux anciens critères (tuber cortical et anomalies de migration de la substance blanche)
*** Quand une LAM et un angiomyolipome sont présents, ils constituent ensemble un seul critère majeur et ne suffisent donc pas au diagnostic
**** Cette terminologie regroupe les hamartomes du système endocrinien : angiomyolipomes des surrénales, adénome papillaire de la thyroïde et autres angiomyolipomes ou fibroadénomes de l'hypophyse, du pancréas, des gonades

Diagnostic certain
✓ 2 critères cliniques majeurs
ou
✓ 1 critère majeur et au moins 2 critères mineurs
ou
✓ critère génétique indépendant
Diagnostic possible
✓ 1 critère majeur
ou
✓ au moins 2 critères mineurs

4. Epidémiologie

L'incidence a fortement augmenté depuis les années 80 du fait de l'hétérogénéité des symptômes et du sous diagnostic des personnes atteintes mais présentant des symptômes. Estimée auparavant entre 1/100.000 ou 1/200.000, l'incidence de la STB est aujourd'hui estimée entre 1/6000 et 1/10.000 naissances dans le monde. La prévalence globale est quant à elle estimée à environ 1/20.000 habitants (12).

5. Surveillance et traitement

La prise en charge de la STB est multidisciplinaire. La coordination des soins entre spécialités médicales est essentielle tout au long de la vie du patient, notamment lors du passage à l'âge adulte. De par son caractère évolutif, il est nécessaire de suivre très régulièrement les patients pour limiter la morbi-mortalité, apporter un confort de vie et une qualité de vie optimale. Comme lors de la pose du diagnostic, il est nécessaire d'examiner soigneusement le patient et de réaliser des imageries régulières (18).

L'espérance de vie des patients STB est influencée par différents facteurs : l'épilepsie, l'importance des tumeurs cérébrales, le développement d'une hydrocéphalie, la progression des AML (risque d'hémorragies) ou de la LAM (diminutions significatives des fonctions pulmonaires) (18). La détection et la prise en charge médicamenteuse précoce de l'épilepsie permettraient de maximiser les chances d'un développement cognitif normal. Le choix des antiépileptiques est à adapter en fonction du type de manifestations exprimées et de l'âge du patient. En cas d'échec thérapeutique ou de pharmacorésistance après association d'antiépileptiques, un traitement chirurgical ou une stimulation du nerf vague peuvent être envisagés. Concernant les autres manifestations, notamment rénales, l'exérèse chirurgicale des tumeurs compressives est possible. Les récurrences sont nombreuses et l'anesthésie générale des patients épileptique est délicate à gérer, ce qui limite la fréquence des opérations.

Les nouvelles connaissances apportées par la génétique et la biologie moléculaire ont permis d'apporter de nouveaux espoirs pour la prise en charge de la STB. La voie de signalisation du mTOR étant désinhibée dans la STB, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de cette voie tels que le sirolimus et l'everolimus prend tout son sens. La démonstration de leur efficacité dans plusieurs essais cliniques a permis leur autorisation dans le traitement des SEGA, des AML et de la LAM (19) (Tableau 2, page 41).

L'instauration du traitement par un inhibiteur de mTOR chez un patient dépend notamment de l'étendue, de l'évolution et du caractère symptomatique des lésions. Il est ainsi nécessaire de traiter au plus tôt les manifestations lorsque cela est possible ; d'où l'importance d'un suivi régulier et d'une bonne observance médicamenteuse. Néanmoins, il est nécessaire de garder à l'esprit que la STB est une maladie génétique et que les recrudescences après arrêt des traitements, ou après chirurgie, sont courantes.

III. Les angiofibromes faciaux

1. Description et physiopathologie

a. Description physique et données

De par leur proéminence et leur étendue, les angiofibromes faciaux (AF) sont les lésions dermatologiques les plus emblématiques de la STB. Ils se manifestent dans l'enfance entre l'âge de 2 et 5 ans et affectent entre 75 et 90% des patients.

Les AF apparaissent initialement comme des points rouges sur la surface des joues lorsque l'enfant est excité, énervé ou chaud. Avec le temps, ils deviennent papuleux (8). L'aspect des AF varie d'un patient à l'autre, allant de l'apparence d'une tache de rousseur à celle de nodules proéminents, cireux et défigurants. Généralement en forme de dôme, ils peuvent être pédiculés ou former des nodules plus larges ou des plaques sur les fosses nasolabiales. Leur développement peut être précédé par un léger érythème qui s'intensifie avec les émotions et la température corporelle. Leur taille varie généralement de 1 à 4 mm de diamètre et leur coloration va de l'aspect couleur de peau à rouge ou brun. On peut en compter de 1 à plus d'une centaine chez un patient. Ils prédominent sur la partie centrale du visage, spécifiquement sur les fosses nasolabiales. S'étendant de façon symétrique et bilatérale sur les joues, le nez et le menton, ils ont une distribution caractéristique en forme d'ailes de papillon (8) (Figure 10). Ils tendent à grossir progressivement avec un pic de progression à l'adolescence. Durant l'âge adulte, leur croissance se stabilise et la rougeur peut diminuer progressivement. L'exposition solaire favorise leur apparition et leur accentuation (10). De par leur aspect inesthétique et stigmatisant, les AF entraînent des répercussions psychologiques importantes chez les enfants et les adolescents, notamment sur l'image et l'estime de soi (20). Les complications qu'ils entraînent sont généralement des saignements spontanés (ou en réponse à des traumatismes mineurs), voire quelques infections (8). Dans de rares cas, leur taille peut obstruer la vision et les conduits nasaux (21).

Exceptionnellement, des AF multiples bilatéraux « isolés » peuvent apparaître sans être associés à aucune manifestation systémique (22). Dans certains cas, ils peuvent même être unilatéraux (23) (24). Bien qu'étroitement liés à la STB, les AF peuvent également apparaître comme des manifestations d'autres entités : la neurofibromatose de type 2, le Birt-Hogg-Dubé syndrome ou la néoplasie endocrine multiple de type 1 (MEN 1) (8) (25). À la différence de la STB, l'âge d'apparition des AF dans le Birt Hogg Dubé syndrome et la MEN 1 est plus tardif. De ce fait, dans des circonstances inhabituelles, l'apparition d'AF à l'âge adulte devient un critère mineur et non majeur du diagnostic de la STB (11) (Tableau 1, page 31).

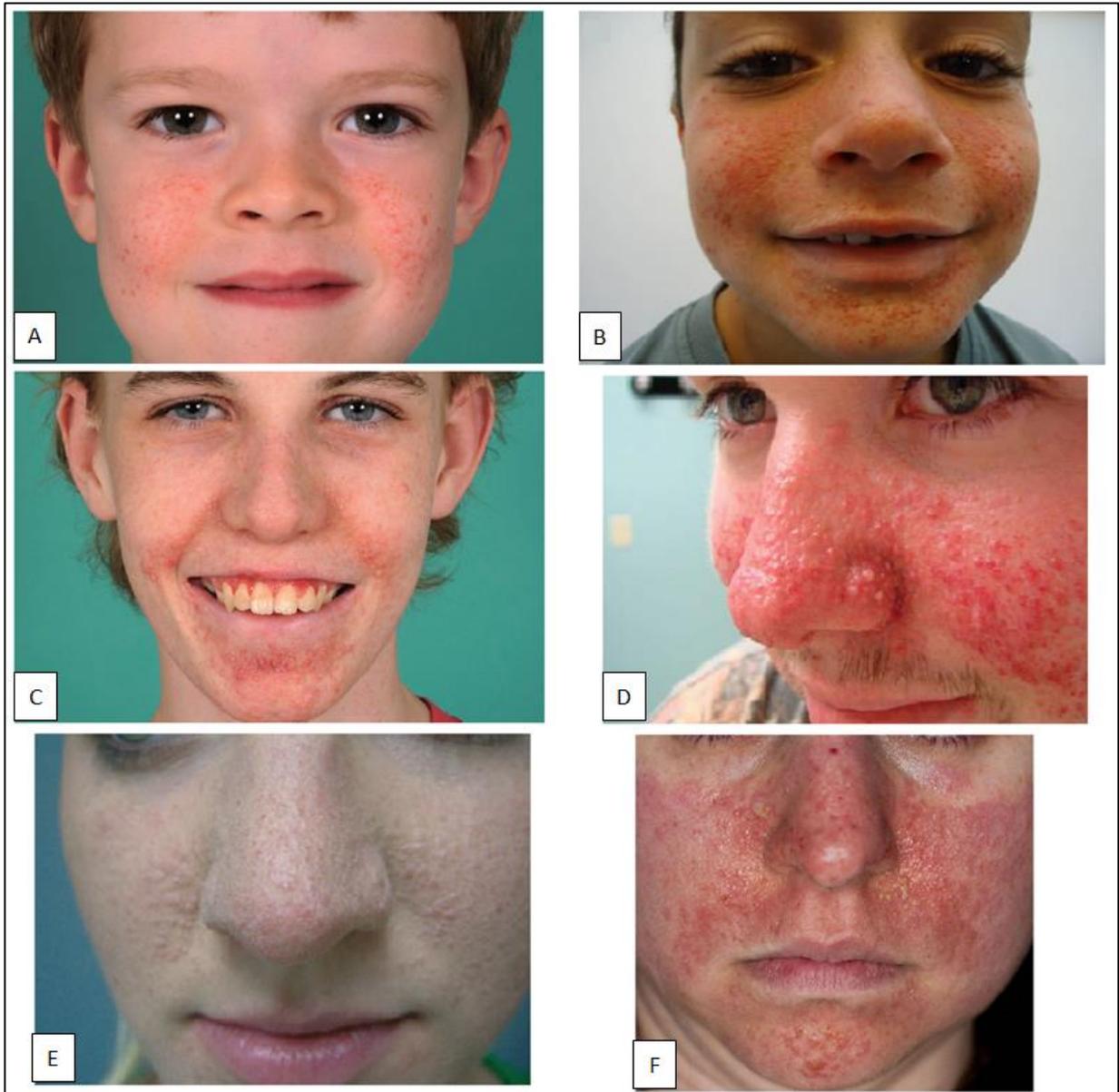


Figure 10 : exemples de manifestation des angiofibromes et âges respectifs des patients.

A. 3ans (26); B. 8ans (27) ; C. 17ans (26) ; D. 21 ans (28) ; E. 26 ans (29); F. 26 ans (30).

b. Physiopathologie/Histologie

Bourneville identifia les lésions faciales dans la présentation de ses cas sous le nom « *d'acne rosacea* ». Pringle inventa par la suite le terme « *adenoma sebaceum* » (25). À la suite d'études histopathologiques, ce terme fut considéré comme inapproprié. En effet, les lésions faciales sont des adénomes et ne sont pas dérivées des glandes sébacées. Caractérisées par une fibrose dermique et une hyperplasie du tissu conjonctif, elles sont associées à une prolifération et une dilatation vasculaire. Des changements dans les glandes sébacées contiguës et autres structures annexes sont simplement secondaires. De ce fait, le terme « *angiofibrome* » est un terme mieux approprié.

Les angiofibromes sont des hamartomes, c'est-à-dire des excroissances contenant des cellules typiquement retrouvées dans la peau mais anormales dans leur nombre et leur organisation (31). La coupe histopathologique d'un AF (Figure 11, (32)) présente ainsi une double composante cellulaire et vasculaire. De grands fibroblastes en forme de fuseaux ou d'étoiles se répartissent dans le derme. Les vaisseaux sanguins prolifèrent excessivement et se dilatent (la rougeur des angiofibromes chez l'enfant en est la conséquence). Les fibres de collagène prennent la forme de peau d'oignon autour des follicules et des vaisseaux (8). Avec le temps, les couches de collagène tendent à se scléroser et à se fibroser (33).

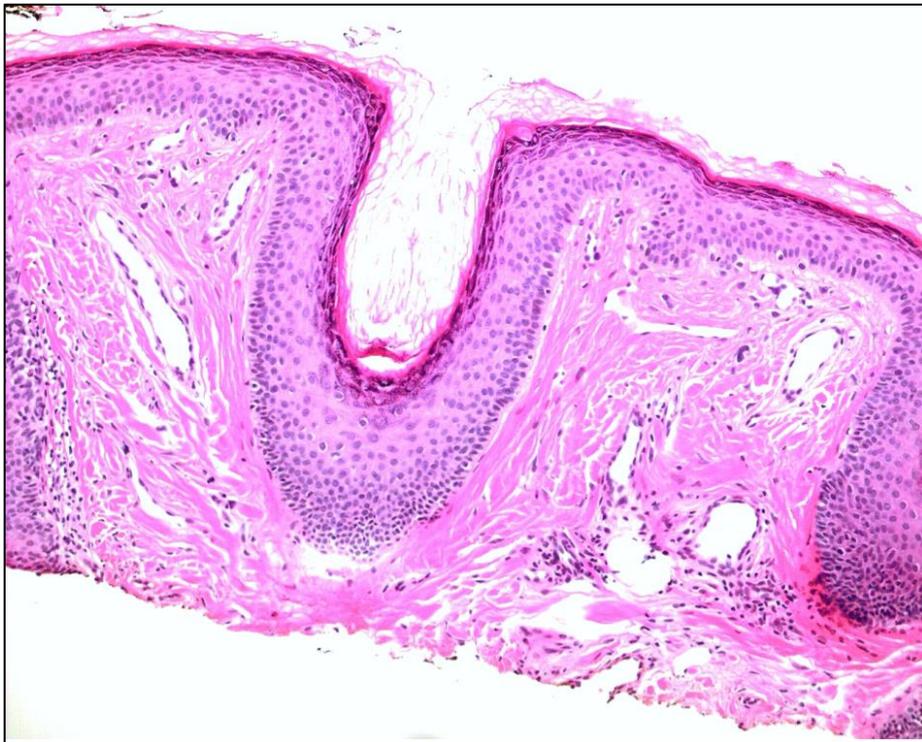


Figure 11 : coupe histologique d'un angiofibrome. Lésion du nez prélevée chez une femme de 47 ans.

On y distingue une prolifération vasculaire importante et de nombreux fibroblastes.

N.B. – : la littérature et les données portant sur l'histologie des AF est assez limitée. Il est ainsi difficile d'en réaliser une description plus complète et poussée.

c. Pathogénie

La perte de fonction du complexe hamartine-tuberine conduit à un déficit de régulation de la voie mTOR. On assiste ainsi à une production incontrôlée de protéines, de facteurs et de promoteurs de la tumorigénèse, comme :

- Le VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) impliqué dans l'angiogénèse.
- La MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) surexprimé par les cellules fibroblastiques. Il stimule l'angiogénèse, la fibrogénèse et le recrutement de monocytes.
- L'épiréguline, surexprimée par les fibroblastiques. L'épiréguline est un membre de la famille des EGF qui stimule notamment la prolifération des kératinocytes.
- La MLH1 (MutL homolog 1), protéine ayant un rôle dans la réparation de l'ADN
- La psoriasine, facteur chimiotactique pour les lymphocytes CD4+, également impliqué dans les mécanismes de défenses antibactériennes de la peau.

Ainsi, la formation des angiofibromes est la conséquence d'une prolifération cellulaire importante, une hyperplasie du tissu conjonctif, du recrutement de cellules immunitaires (lymphocytes, monocytes et cellules fibroblastiques) et d'une prolifération vasculaire importante (34) (35).

2. Traitements

a. Traitements physiques

Malgré les souffrances liées aux crises épileptiques, aux tumeurs rénales ou aux problèmes respiratoires, la préoccupation principale des patients reste l'impact négatif des angiofibromes faciaux sur leurs relations sociales et leur estime de soi.

Différentes approches chirurgicales ont été utilisées pour y remédier : chirurgie couplée au laser, excision, curetage, cryothérapie, électrodessiccation, dermabrasion, radiofréquence etc... Plusieurs types de laser ont été testés, notamment les lasers au CO₂ et les lasers pulsés (PDL) (8) (11) (25).

Il est difficile d'émettre des recommandations de traitement quant à ces méthodes physiques. La réussite dépendant notamment de l'âge du patient, de l'étendue des lésions, mais surtout de l'expérience du chirurgien ou du dermatologue dans la maîtrise de ces techniques. Cependant, certains auteurs rapportent que les lasers PDL seraient très efficaces vis-à-vis des AF à prédominance vasculaire, notamment s'ils sont traités précocement, avant que la composante fibreuse ne prédomine. À l'inverse, les lasers au CO₂ auraient une meilleure efficacité sur les AF à composante fibreuse (11) (25).

Même si les résultats sont encourageants, notamment chez des patients sévèrement touchés, les techniques chirurgicales montrent leurs limites. Elles sont invasives et douloureuses, d'efficacité limitée dans le temps (une recrudescence est systématique, notamment chez les patients jeunes) et nécessitent fréquemment une anesthésie générale (délicate à gérer sur des terrains épileptiques). Des complications comme des

cicatrices ou des infections peuvent également survenir. Elles sont limitées en nombre et y avoir recours nécessite d'évaluer au préalable la balance clinico-psychologique (11) (25).

b. Traitements médicaux

On retrouve dans la littérature différentes tentatives de traitement médical des angiofibromes. Parmi elles, on peut citer l'utilisation du tranilast per os, molécule à propriétés antiallergiques et antiprolifératives utilisée dans le traitement de l'asthme bronchique ; ainsi que l'utilisation locale d'une solution de podophyllotoxine à 25%, alcaloïde utilisé dans le traitement des verrues et de la kératose. D'une relative efficacité, aucune étude supplémentaire n'a été menée à grande échelle sur l'utilisation de ces molécules (25).

Depuis une dizaine d'années, des préparations à base d'inhibiteurs de mTOR ont fait leur apparition. L'utilisation du sirolimus par voie orale a tout d'abord montré son efficacité sur la réduction du nombre d'AF (36) (37). Ces premiers résultats ont été confirmés lors d'un essai-clinique où 57% des patients notaient une diminution importante du nombre d'AF (38). L'everolimus a également montré son efficacité en utilisation per os dans la prévention de l'apparition des AF (39).

Depuis, des essais de formulation topique chez l'animal (40) puis chez l'homme ont été menés (41). Ainsi, recourir à une action locale, par l'intermédiaire de formulations topiques, permettrait théoriquement de réduire les effets secondaires de la voie systémique et d'améliorer la biodisponibilité des inhibiteurs de mTOR.

L'ensemble des connaissances sur les préparations topiques de sirolimus fait l'objet de la seconde partie de cette thèse.

Deuxième partie : comment développer une préparation topique de sirolimus pour traiter les angiofibromes de la sclérose tubéreuse de Bourneville ?

I. Cahier des charges initial

Afin de réaliser une telle préparation, il est possible de lister les principaux objectifs et paramètres dont nous devons tenir compte et ainsi de rédiger un premier cahier des charges. Celui-ci évoluera après une étude de la littérature (Figure 12).

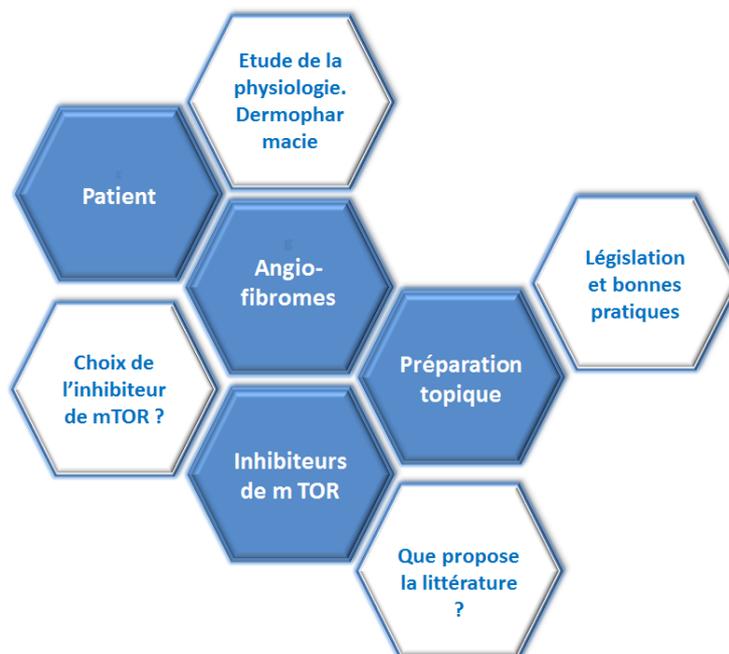


Figure 12 : illustration du cahier des charges initial

- ✓ **Objectif principal** : mettre à disposition des patients atteints de la STB, une forme topique à base d'inhibiteur de mTOR pour traiter leurs angiofibromes faciaux (AF).
- ✓ **Justification du traitement** : esthétique et médical (éviter le développement de complications comme les infections ou les saignements).
- ✓ **Justification de la voie** : la voie topique permettrait d'obtenir une action locale, une diminution des concentrations en principe actif nécessaires, une diminution des effets indésirables systémiques. La pénétration cutanée présente l'avantage d'une large surface d'absorption ainsi qu'une faible dégradation enzymatique.
- ✓ **Les patients à traiter** : enfants et adolescents ne présentant pas tous le même degré d'atteinte.
- ✓ **La cible** : les angiofibromes faciaux. Ils possèdent un caractère évolutif au cours du temps (fibrose).

- ✓ **Alternatives disponibles** : aucun traitement topique n'est commercialisé. Il faut donc avoir recours à une préparation magistrale ou hospitalière. Aucune préparation de ce genre n'est inscrite au formulaire national (42).

La mise au point de cette préparation doit passer par l'étude des inhibiteurs de mTOR (notamment leurs propriétés physico-chimiques), de la physiologie de la peau et du mécanisme d'absorption cutanée. Il est essentiel de voir ce que propose la littérature scientifique, de s'en inspirer et au besoin d'en améliorer les points faibles. Enfin, il est également nécessaire de se conformer à la réglementation en vigueur ainsi qu'aux bonnes pratiques de préparation.

II. Le sirolimus et les inhibiteurs de mTOR

1. Historique

La rapamycine a été isolée en 1975 à partir d'une bactérie, *Streptomyces hygroscopicus*, découverte dans des échantillons de terre ramenés de l'île de Pâques. Le nom de rapamycine dérive de "Rapa Nui" qui est le nom de l'île dans la langue ethnique polynésienne. Le sirolimus est le nom générique donné à la rapamycine. Elle a tout d'abord été classifiée comme un "macrolide antifongique" car présentant une activité contre plusieurs souches de levures et de champignons (43) (44). D'autres propriétés lui ont ensuite été progressivement découvertes dans les années 80 comme ses capacités immunosuppressives ou son activité anticancéreuse et antiangiogénique. Des recherches sur son mécanisme d'action ont permis d'identifier sa cible nommée TOR (target of rapamycin).

2. Mécanisme d'action

La rapamycine et ses analogues se fixent au récepteur intracellulaire FKBP12 (FK506 binding protein 12) (Figure 8, page 29). Cet assemblage se lie ensuite au complexe mTORC1 et empêche la phosphorylation des protéines S6K1 et 4EBP. La rapamycine ne peut se lier au complexe mTORC2, mais celui-ci peut être inhibé indirectement lors d'un traitement prolongé par l'inhibition de la phosphorylation de la protéine AKT (17) (Figure 8). Les inhibiteurs de mTOR ralentissent ou stoppent la croissance cellulaire (ils empêchent le cycle cellulaire de progresser de la phase G1 à la phase S), induisent l'apoptose, inhibent la migration cellulaire et l'invasion tissulaire, réduisent l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), réduisent la prolifération et l'activation des lymphocytes T et la production d'anticorps (17) (16) (25) (44).

3. Les inhibiteurs de mTOR sur le marché et en développement

Il existe deux types de familles de molécules pouvant agir sur la voie du mTOR : la famille de la rapamycine et ses analogues qui sont des inhibiteurs allostériques de mTORC1, et celle plus récente dite des « kinases inhibitrices de mTOR » (17).

a. Les inhibiteurs de mTOR

La rapamycine a été approuvée par la FDA (USA Food and Drug Administration) comme immunosuppresseur dans la prévention du rejet des greffons rénaux en 1999, et a obtenu son AMM en France en 2002. Différents dérivés ont été synthétisés et mis sur le marché afin d'améliorer le profil pharmacocinétique et la solubilité de la rapamycine :

- everolimus, RAD001
- temsirolimus, CCI-779
- zotarolimus. ABT-578 (17)
- deforolimus ou ridaforolimus, AP23573 (17) (45)

Les inhibiteurs de mTOR sont utilisés pour leurs propriétés immunosuppressives (prévention du rejet de greffe), anticancéreuses (traitement du carcinome rénal, mammaire...), ou leur mécanisme d'action (inhibiteur de mTOR dans la STB) (Tableau 2, (46)). Ils sont également utilisés dans d'autres indications (hors autorisations) ou font l'objet d'essais cliniques :

- En cancérologie, ils sont administrés seuls ou en association aux chimiothérapies conventionnelles, ex : rhabdomyosarcomes, glioblastomes, cancers du poumon à petites cellules, ostéosarcomes, cancers du sein, de la prostate etc... (17)
- En dermatologie, ex : sclérose systémique, PWS (port-wine stain) et anomalies du complexe vasculaire, sarcome de Kaposi, syndrome de Muir Torre, cancer de peau, psoriasis etc... (16) (44).

Plusieurs études suggèrent que l'effet antiprolifératif des analogues du sirolimus varie, en fonction des cellules cancéreuses, par échec d'inhibition de mTORC2 dans certains types de tumeurs (17).

Leurs propriétés antiprolifératives sont également utilisées en angioplastie coronarienne. Certains stents sont imprégnés d'inhibiteurs de mTOR : everolimus PROMUS PREMIER® (Boston Scientific®); sirolimus CYPHER® (Cordis®), zotarolimus ENDEAVOR® (Medtronic®) (47).

b. Autres inhibiteurs de la voie du mTOR

D'autres générations d'inhibiteurs de mTOR ont été développées :

- Les « ATP-competitive mTOR kinase inhibitors » ou « kinases inhibitrices de mTOR ». Ces molécules bloquent mTORC1 et mTORC2, inhibent la phosphorylation des effecteurs sous-jacents et les mécanismes de rétrocontrôle de PI3K/AKT.
- Les doubles inhibiteurs de PI3K et mTOR (Dual mTOR/ PI3K inhibitors) qui ciblent autant la protéine PI3k que le récepteur à l'ATP de la protéine mTOR.

Leurs conséquences sur le devenir de la cellule sont les mêmes que pour les inhibiteurs de mTOR conventionnels, mais leur activité anticancéreuse, reportée dans des études précliniques, serait supérieure. Ces molécules sont prometteuses mais aucune n'est pour le moment disponible sur le marché. Des études complémentaires s'avèrent nécessaires pour évaluer leurs profils de toxicité à long terme et leurs modalités d'utilisation, seules ou en association aux inhibiteurs de mTOR conventionnels (17) (48).

Tableau 2 : les inhibiteurs de mTOR sur le marché

Molécule, spécialité, laboratoire	Formes galéniques	Dosages	AMM	Approbation FDA/ AMM
Sirolimus/ Rapamycine Rapamune® PFIZER®	Comprimés Solution buvable	0.5, 1 et 2 mg 1mg/ml, fl 60ml	Prévention du rejet du greffon en cas de transplantation rénale (SMR important). Rq : La FDA autorise son utilisation dans le traitement de la lymphangioliomyomatose (LAM) depuis 2015 (49)	1999/2002
Everolimus Afinitor® NOVARTIS®	Comprimés	5 et 10mg	Traitement de l'adénocarcinome rénal (SMR important); cancer du pancréas endocriné (SMR important); cancer du sein (SMR modéré).	2009/2010
Certican® NOVARTIS®	Comprimés	0.1 à 0.75 mg	Prévention du rejet du greffon (transplantation rénale, cardiaque et hépatique) (SMR important).	2004/2005
Votubia® NOVARTIS®	Comprimés	2.5, 5 et 10mg	Traitement des SEGA des patients non candidats à une résection chirurgicale (SMR important); AML renal de la STB ne nécessitant pas d'intervention chirurgicale immédiate (SMR important). Rq : le Votubia® n'est pas commercialisé aux Etats-Unis et c'est l'Afinitor® qui possède ces autorisations d'utilisation.	2011
Temsirolimus Torisel® PFIZER®	Injectable	25mg/ml, fl 1.2ml	Traitement de l'adénocarcinome rénal (SMR important); lymphome à cellules du manteau (SMR important).	2007/2008

SMR : Service médical rendu

4. Caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétique

a. Physico-chimie

Le sirolimus fait partie de la famille chimique des macrolides. Les autres inhibiteurs de mTOR sont des analogues semi-synthétiques du sirolimus (Figure 13, (36) (42) (43)).

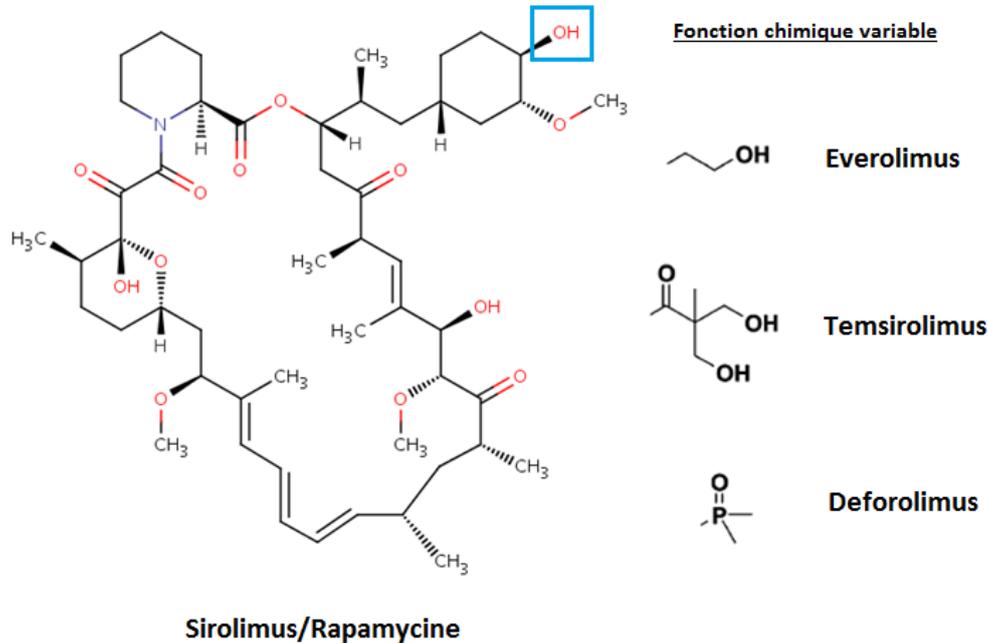


Figure 13 : structure chimique des inhibiteurs de mTOR

Le temsirolimus est une pro-drogue du sirolimus. Sa fonction chimique supplémentaire lui permet d'être soluble dans l'eau et d'être administré par voie veineuse. Il est rapidement métabolisé en sirolimus après administration. L'everolimus, le temsirolimus et le deferolimus ont été développés à partir du sirolimus afin d'augmenter sa faible solubilité dans l'eau et son activité (44) (50).

N.B. - Malgré une consonance commune et une similarité structurale, le tacrolimus (FK506) appartient à la famille des anticalcineurines au même titre que la cyclosporine. Ils se lient tous deux au même récepteur FK506, mais le sirolimus ne montre pas d'activité anticalcineurine. Le tacrolimus est commercialisé sous forme topique (Protopic®) dans le traitement de la dermatite atopique.

Les données du Tableau 3 (51) nous montrent que les inhibiteurs de mTOR sont des molécules volumineuses et de tailles importantes (poids moléculaires élevés) ; hydrophobes ($\log P > 0$, $\log S < 0$) et peu solubles dans l'eau ; dont le passage des membranes cellulaires pourrait s'avérer difficile (polar surface area (PSA) > 140) (52).

Tableau 3 : propriétés physico-chimiques des inhibiteurs de mTOR

Molécule	Poids moléculaire	Formule	Log P	Solubilité dans eau	Log S	pka		Nombre de liaison hydrogène		Surface polaire (PSA)
						Acide	Basique	Donneurs (NHD)	Accepteurs (NHA)	
sirolimus	914.1719 Da	C ₅₁ H ₇₉ NO ₁₃	4.3-7.45	0.00173 mg/ml	-5.7	9.96	-3	3	12	195.43 Å ²
everolimus	958.2244 Da	C ₅₃ H ₈₃ NO ₁₄	5.01-7.4	0.00163 mg/mL	-5.8	9.96	-2.7	3	13	204.66 Å ²
temsirolimus	1030.2871 Da	C ₅₆ H ₈₇ NO ₁₆	4.39-7.13	0.00235 mg/mL	-5.6	9.96	-2.9	4	14	241.96 Å ²

b. Pharmacocinétique et métabolisme

Les inhibiteurs de mTOR ont une fenêtre thérapeutique étroite et nécessitent des dosages sanguins, excepté le temsirolimus (Tableau 4, (46) (51)).

Tableau 4 : pharmacocinétique des inhibiteurs de mTOR

	sirolimus	everolimus	temsirolimus
Fixation protéines plasmatiques	92%	74%	87%
1/2 vie	57-63 h	30 h	Elimination biexponentielle : 17.3 h (temsirolimus) puis 54.6 h (sirolimus)
Métabolisme	CYP 3A4	CYP3A4 et Pgp	CYP 3A4
Elimination	Fèces majoritairement 2% urines	80% fèces 5% urines	76 % fèces 5% urines
Concentrations sanguines recommandées	4-20 ng/ml (dans la prévention du rejet de greffe)	5 à 15 ng/ml (dans le traitement de la STB)	Pas de surveillance

5. Les effets indésirables

Les effets indésirables des inhibiteurs de mTOR sont conséquents et nécessitent parfois des pauses thérapeutiques. À titre d'exemple, la liste ci-dessous reporte les effets indésirables les plus fréquemment rencontrés lors de la prise orale de sirolimus :

- Troubles de l'état général (céphalées, œdèmes périphériques, fièvre, altération de la cicatrisation...)
- Troubles cutanés (acné, éruption cutanée)
- Troubles du système immunitaire (infections en général et notamment urinaires)
- Troubles du système sanguin et lymphatique (anémie, thrombocytopénie, neutropénie, purpura thrombotique...)
- Troubles musculo-squelettiques (arthralgie, ostéonécrose)

- Troubles gastro-intestinaux
- Troubles hépatobiliaires
- Troubles du métabolisme (hypokaliémie, hypercholestérolémie, diabète...)
- Troubles rénaux (élévation de la créatininémie, protéinurie)
- Troubles cardiovasculaires (hypertension...)
- Etc...

Source : (46)

6. Données de sécurité

Les inhibiteurs de mTOR présentent un risque pour les personnes manipulant ces molécules. Certains d'entre eux sont classifiés par l'organisme NIOSH (The National Institute for Occupational Safety and Health) parmi la liste des « *antinéoplasiques et autres médicaments dangereux manipulés dans les établissements de soins* ». Le NIOSH classe les molécules selon la toxicité qu'elles représentent : carcinogène, tératogène, toxicité sur la reproduction, toxicité d'organes à faibles doses, génotoxicité etc..

Sirolimus : il est classé dans le tableau 2 (médicaments non antinéoplasiques) de la liste NIOSH et présente des risques accrus de développement de lymphomes et autres tumeurs. Il est embryotoxique et foetotoxique.

Everolimus et temsirolimus : ils sont répertoriés dans le tableau 1 (médicaments antinéoplasiques). Ce sont des médicaments cytotoxiques qui présentent également un risque pour les femmes enceintes et allaitantes.

L'équipement et les locaux doivent être adaptés aux risques cités précédemment. Ainsi, couper ou écraser des comprimés, manipuler de la poudre ou des topiques à base d'inhibiteurs de mTOR nécessite : de réaliser cette opération dans une pièce à atmosphère contrôlée ; le port d'une blouse protectrice, d'une double paire de gants et de lunettes (tableau 5 de la liste NIOSH). Ces recommandations sont également reportées dans les fiches de données de sécurité des laboratoires et fournisseurs de ces molécules.

Source : (53)

III. Physiologie et principe de la pénétration cutanée

1. La peau

La peau est une structure hétérogène composée de trois couches superposées : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Elle est également parcourue par des glandes sudoripares et des follicules pileux ainsi que par des glandes sébacées qui sécrètent le sébum à sa surface (Figure 14 (54)). D'une épaisseur variant de 0.5 à 5 mm, sa surface oscille entre 1.5 et 2 mètres carrés chez l'adulte ; la peau du visage représentant entre 3.5% (adulte) et 9 % (enfant) de cette surface totale (55) (56).

a. Structure de la peau

L'épiderme : il mesure en moyenne 100 µm et est composé de différentes couches partant de la couche basale vers le *stratum corneum* en surface. Il est parcouru par le phénomène de kératinisation et de migration verticale : les cellules vivantes des couches inférieures, les kératinocytes, migrent progressivement vers les couches supérieures. Elles se chargent alors presque exclusivement en kératine et deviennent des cellules quasi-mortes, les cornéocytes. L'épiderme a surtout un rôle de protection.

Le stratum corneum ou couche cornée : couche la plus externe de l'épiderme, elle possède une épaisseur de 10 à 20 µm. Grâce à sa structure et à sa constitution chimique, le *stratum corneum* est responsable de « l'effet barrière » et de la quasi imperméabilité de la peau lorsque son intégrité est conservée. Lieu de stockage pour les substances lipidiques, il participe de façon très active au phénomène d'hydratation de la peau en ralentissant la diffusion de l'eau en provenance des couches profondes du derme. Les cornéocytes sont presque totalement déshydratés (13% d'eau vs 80-90% dans les autres cellules de l'organisme) et composés de kératine, une protéine extrêmement résistante. Ils sont agrégés entre eux par un ciment intercellulaire lipidique composé d'acides gras polyinsaturés, de cholestérol et de céramides. Leur cohésion est de plus assurée par des liens protéiques, les cornéosomes (Figure 15 (56)).

Rq: l'effet barrière est considérablement influencé par l'intégrité du *stratum corneum* face aux agressions extérieures (brûlures, coupures, frottements...) et à l'hydratation cutanée.

Le derme : d'une épaisseur variant de 500 µm à 1 mm, il assure le maintien des propriétés mécaniques de la peau et sert de réservoir d'eau par l'intermédiaire de gels de protéoglycanes.

N.B. – : c'est à partir de cette couche que se développent les angiofibromes.(cf page 35)

L'hypoderme : c'est un tissu conjonctif lâche de même structure que le derme mais chargé en adipocytes, lui conférant un pouvoir isolant thermique et mécanique et constituant une réserve d'énergie.

Vascularisation et innervation : La vascularisation lymphatique et artério-veineuse parcourt l'hypoderme, le derme et s'arrête en dessous de la jonction dermo-épidermique. L'épiderme n'est pas irrigué directement mais reçoit ses nutriments par diffusion à partir du derme. L'épiderme et le derme sont parcourus par des terminaisons nerveuses.

Source : (56)

b. Caractéristiques de la peau

pH cutané : du derme à la surface de la peau, le pH passe respectivement d'une valeur de 7 à 5. Le pH cutané est variable selon l'âge (il augmente en vieillissant), le sexe (plus alcalin chez les femmes), les zones corporelles (il se varie de 4 et 7 avec une moyenne de 5.5) et le lavage (il augmente avec le lavage par les détergents). Le pH cutané est régulé par l'excrétion

sudorale acide qui représente un moyen de défense vis-à-vis des micro-organismes. L'acidité cutanée est une caractéristique importante, et l'on observe que presque toutes les dermatoses sont accompagnées d'une alcalinisation.

Film hydrolipidique : il se situe à la surface du *stratum corneum*. C'est une émulsion H/L (hydrophile/lipophile) où l'eau est représentée par les sécrétions sudorales, les lipides provenant de la sécrétion des glandes sébacées et du phénomène de kératinisation. Il a pour rôle le maintien du pH acide de la peau, permet l'établissement de la barrière cutanée et intervient dans l'aspect esthétique de la peau.

Flore cutanée : elle est constituée de bactéries Gram + (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* etc...), d'organismes fongiques (*Candida albicans*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* etc...) qui participent à la défense de la peau.

Métabolisme cutané et système immunitaire : il existe dans l'épiderme et dans le derme des activités enzymatiques pouvant contribuer au métabolisme de certains médicaments : réactions d'hydrolyse, d'oxydation, de réduction et de conjugaison. Cependant, la contribution du métabolisme cutané est modeste (moins de 5% du médicament absorbé en général) principalement en raison de la saturation rapide des enzymes cutanées. Le système immunitaire peut également reconnaître les molécules comme des corps étrangers et les orienter vers le système lymphatique.

Sources : (55) (56) (57)

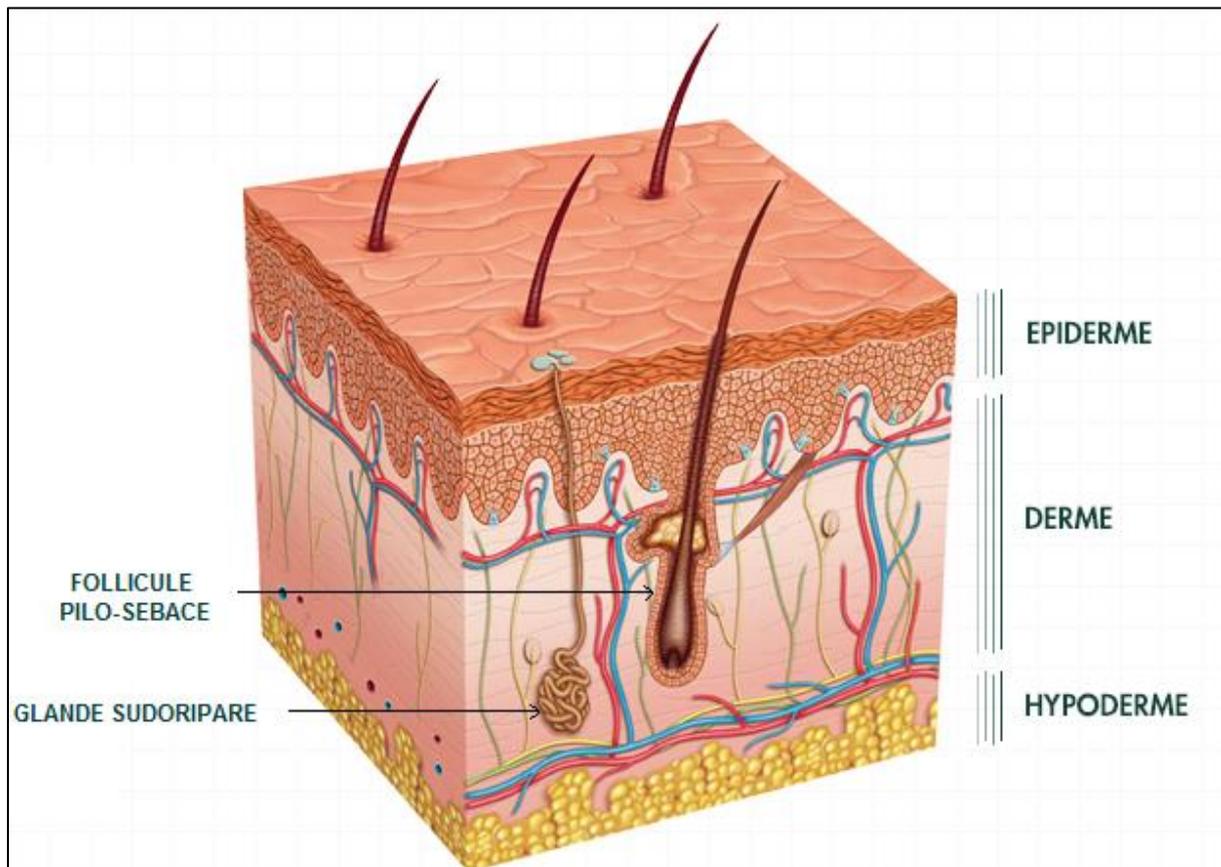


Figure 14 : structure schématique de la peau

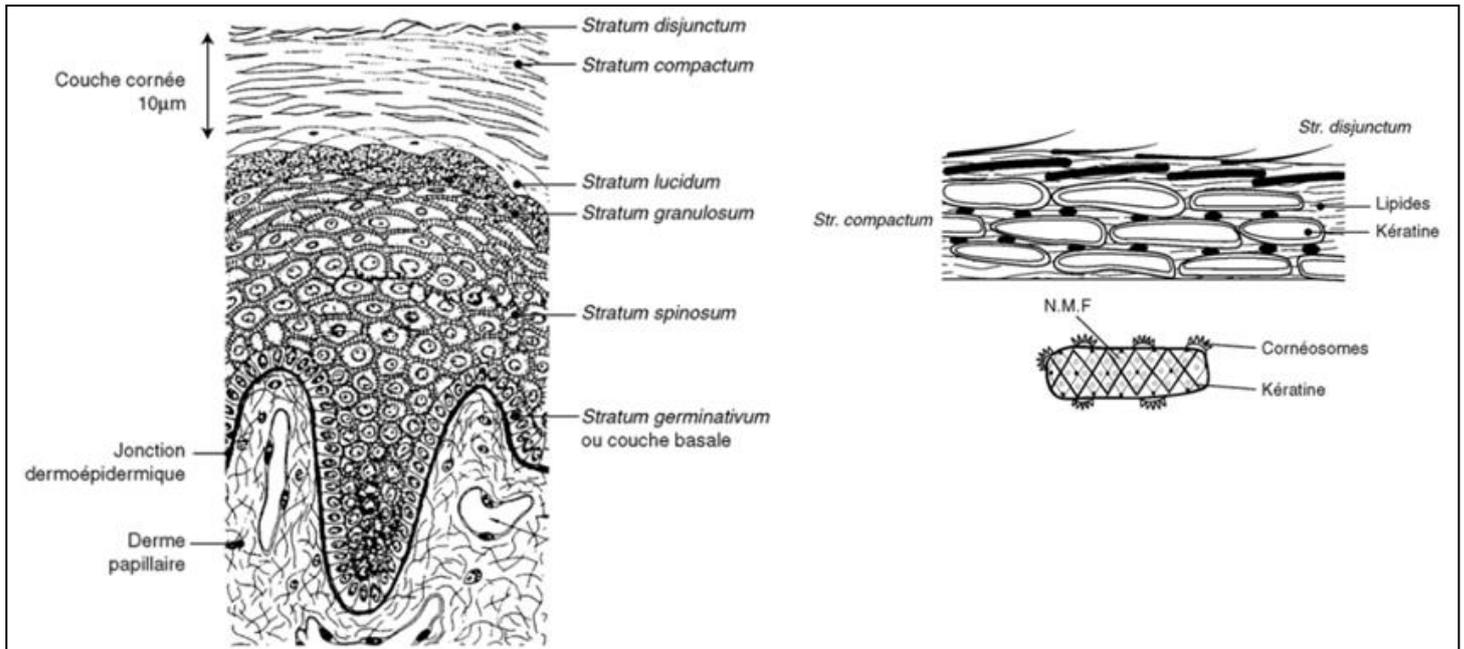


Figure 15 : structure schématique de l'épiderme à gauche et du *stratum corneum* à droite.

2. Principes fondamentaux de la pénétration cutanée ou perméation

a. Facteurs influençant l'absorption cutanée

La peau

L'état de la peau : la pénétration des médicaments varie selon l'état de peau, son âge et le type de pathologie. Dans le cas des plaies, la peau est alors plus ou moins détruite et ne joue plus son rôle de barrière protectrice ; les possibilités de pénétration sont alors profondément modifiées. La pénétration cutanée est généralement augmentée dans les dermatoses et les phénomènes inflammatoires.

La région d'application : selon les régions du corps, la couche kératinisée est plus ou moins importante et les follicules pileux plus ou moins nombreux.

Le degré d'hydratation : une hydratation excessive (comme un patch occlusif) hyperhydrate la couche cornée qui perd sa capacité de barrière et devient perméable dans les deux sens ; à l'inverse, si la peau est excessivement desséchée, elle perd sa souplesse et se craquelle, l'eau étant un plastifiant de la kératine.

La température : elle modifie les propriétés de la peau et augmente la diffusion. Elle est de 32°C en surface.

Sources : (55) (56) (58)

Nature physico-chimique de la substance active

La taille de la molécule : la pénétration est d'autant plus facilitée que la masse moléculaire est peu élevée (< 500 Da). Elle influe sur son coefficient de diffusion.

La forme de la molécule : les longues molécules linéaires ou plus ou moins ramifiées ont moins de facilité pour s'insinuer entre les cellules cornées que des molécules de forme plus ramassée.

La nature chimique de la molécule :

- Le nombre de donneur de liaisons hydrogène (NHD) et le nombre de liaisons hydrogènes accepteurs (NHA) contrôlent l'interaction avec la surface des cornéocytes.
- Le coefficient de partage octanol-eau (log P) représente le partage *stratum corneum*-eau. Les substances lipophiles s'accumulent dans le ciment intercellulaire et se séparent difficilement d'un véhicule lipidique. Inversement, les substances hydrophiles ne peuvent traverser que si la peau est hydratée au maximum. Les molécules les plus aptes à pénétrer sont donc amphiphiles.

La concentration de la molécule : notamment la différence de concentration entre le véhicule et la peau.

Remarque : la règle des 5 définie par Lipinski prévoit une faible absorption ou perméation pour une molécule de : masse moléculaire > 500 Da, NHD > 5 et NHA > 10 ou log P > 5. Selon cette règle, la diffusion du sirolimus et ses analogues serait limitée (cf Tableau 3).

Sources : (55) (56)

Véhicule

Les véhicules topiques utilisés pour le traitement d'une affection locale, doivent en général faciliter la pénétration des principes actifs dans les tissus. Ils ont eux-mêmes très peu de possibilités de pénétration.

Les constituants du véhicule : les matières premières constitutives de la phase grasse modulent la capacité de pénétration des substances actives à travers la barrière cutanée. Les excipients qui n'ont qu'une action de surface et ne pénètrent que peu la peau sont généralement de nature hydrocarbonée comme la paraffine liquide, la vaseline, les paraffines, les silicones hydrophobes etc... On retrouve également les cires, les acides, les alcools gras (stéarique, cétylique) qui ont un effet plus ou moins occlusif et superficiel.

Pour obtenir une pénétration plus importante, les excipients doivent se mélanger au film hydrolipidique cutané pour céder leur principe actif. Pour diffuser, le coefficient de partage du principe actif doit être en faveur des tissus. On emploie des émulsions dans la formulation de la phase grasse et en particulier des huiles végétales qui favorisent la

pénétration cutanée en se combinant aux lipides épidermiques, ainsi que des tensioactifs, amphiphiles, qui modulent la pénétration des molécules actives, améliorent leur biodisponibilité et ont une capacité de pénétration propre.

Le pH de la préparation peut intervenir sur le degré d'ionisation des principes ionisables et donc sur leur pénétration.

Sources : (56) (58)

La forme galénique du véhicule : elle influe sur la pénétration cutanée d'une molécule active, notamment grâce au sens de l'émulsion qui doit être compatible avec les caractéristiques physicochimiques de la molécule à véhiculer.

- Les émulsions, qu'elles soient L/H ou H/L sont des promoteurs d'absorption. Ce sont des dispersions dans lesquelles la taille des particules est comprise entre 10 et 100 µm et qui contiennent une forte proportion de tensioactifs (de 10 à 30%). L'utilisation d'émulsions multiples peut conduire à une libération prolongée de la substance active mais sans que les capacités de franchissement de la barrière cutanée ne soient modifiées par rapport à celles de l'émulsion simple.
- Les gels hydrophiles ne facilitent généralement pas la pénétration à cause du film de polymères qu'ils déposent sur la peau. C'est pourquoi ils contiennent très souvent une proportion importante d'éthanol, permettant une meilleure effraction de la barrière cutanée.
- Les liposomes transportent des actifs hydrophiles contenus dans le cœur aqueux de la vésicule ou des actifs lipophiles inclus dans leurs bicouches de phospholipides. En s'insinuant entre les cornéocytes par l'intermédiaire du ciment intercellulaire, ils aident considérablement au franchissement de la barrière.
- Les véhicules anhydres tels que la vaseline ont un rôle ambigu. Très lipophiles et occlusifs, ils ont une action superficielle avec le pouvoir de retenir en eux les actifs lipophiles qui, de ce fait, quittent difficilement le véhicule. A contrario, ils agissent comme un patch occlusif qui augmente l'hydratation cutanée et favorisent ainsi le passage de molécules hydrophiles.

Les modes d'application : les diverses manières d'appliquer un topique influencent sa pénétration : simple étalement ou étalement accompagné de frictions et massages ; application en couches plus ou moins épaisses; temps de contact plus ou moins long et répétition plus ou moins fréquente; application suivie ou non de la pose d'un bandage ou pansement (l'occlusion augmente l'hydratation du *stratum corneum*) etc...

Sources : (56) (58)

b. Mécanisme de l'absorption cutanée

Voies de passage transcutané

Il existe plusieurs voies de passage permettant de franchir la barrière de la couche cornée (Figure 16 (56)).

Passage transcellulaire : il est emprunté surtout par les molécules de petite taille et hydrophiles lorsque le *stratum corneum* est suffisamment hydraté. Ce passage peut aussi faire intervenir la voie des cornéosomes, qui réalisent des pontages entre les cellules et sont suffisamment amphiphiles pour laisser passer des molécules plus ou moins lipophiles.

Passage intercellulaire : c'est la voie du ciment lipidique intercellulaire empruntée par les molécules amphiphiles ou lipophiles. Elle prédomine par rapport à la voie intracellulaire.

Passage transfolliculaire : elle fait intervenir les follicules pilosébacés. Cette voie se heurte au flux de sébum qui s'écoule de l'intérieur vers l'extérieur et contrarie l'introduction de substances exogènes. Elle est à l'opposée prépondérante chez l'animal au vu de la densité des follicules sébacés.

Passage par le canal sudoripare des glandes eccrines : cette voie est théoriquement possible mais rarement mise en évidence du fait de la pression positive exercée vers l'extérieur.

Sources : (55) (56) (58)

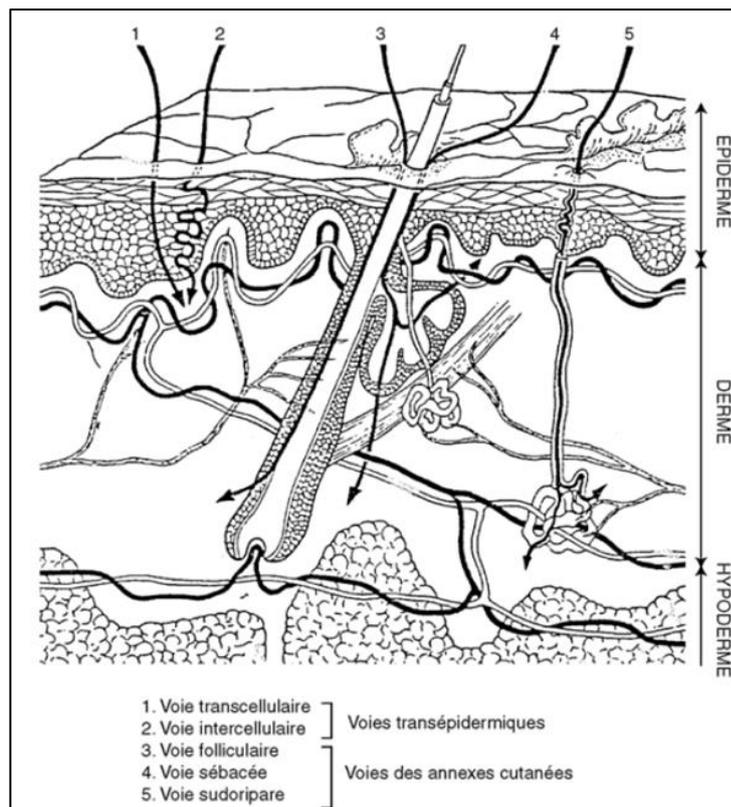


Figure 16 : différentes voies de passage transcutané

La couche cornée a la propriété de retenir dans sa structure des substances actives, c'est l'effet réservoir. La libération progressive de cette réserve conduit à des effets prolongés. Les substances qui la traversent peuvent se concentrer dans les parties profondes de la peau et les régions sous-cutanées favorables aux actions locales. L'épiderme vivant, en dessous de la couche cornée, est une barrière moins efficace, sa perméabilité étant comparable à celle des autres membranes biologiques.

Cinétique du passage transcutané

L'absorption transcutanée est un phénomène de diffusion passive. Après avoir quitté le véhicule topique, les molécules doivent traverser la barrière cutanée de nature lipidique, puis diffuser dans les différentes couches de l'épiderme totalement hydratées, pour ensuite continuer à diffuser dans le derme, également hydrophile. Elles peuvent ensuite entrer en contact avec le système vasculaire capillaire, être résorbées, diffuser dans la circulation générale et fournir une action systémique. La diffusion peut se poursuivre dans l'hypoderme et même dans les tissus sous-cutanés.

La diffusion d'une substance à travers une membrane semi-perméable est proportionnelle à la différence de concentration de part et d'autre de la membrane. Elle obéit à une loi de Fick :

$$J = K_p \times \Delta C = \frac{K_m \times D \times \Delta C}{e}$$

$$D = \frac{e^2}{6T_L}$$

J = flux percutané ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$)

Kp = coefficient de perméabilité (cm/s)

ΔC = différence de concentration de part et d'autre de la membrane (C1-C2)

Km = coefficient de partage couche cornée/véhicule

D = coefficient de diffusion (cm^2/s)

e = épaisseur de la couche cornée (cm)

T_L = temps de latence (s)

La cinétique de diffusion d'une molécule à travers la peau montre que le flux diffusant ne devient constant qu'après un temps de latence variable d'une substance à l'autre. La courbe devient ensuite linéaire en atteignant un état d'équilibre. La valeur de latence est en relation directe avec le coefficient de diffusion. Elle est obtenue en extrapolant la partie linéaire de la courbe à l'axe des abscisses (Figure 17 (56)).

Remarque :

- le coefficient de partage Km correspond au rapport de solubilité de la substance diffusante dans le *stratum corneum* et dans l'excipient. Cette donnée étant généralement inconnue, on utilise le

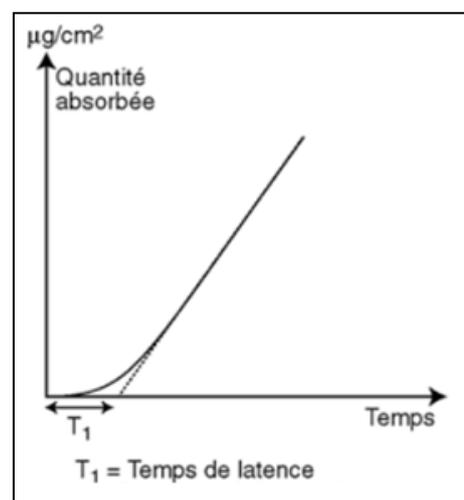


Figure 17 : cinétique de diffusion d'une substance à travers la peau

coefficient de partage octanol/eau.

- Le coefficient de diffusion D traduit la mobilité de la substance diffusante à travers le *stratum corneum*. Plus la molécule est complexe (grande taille, masse moléculaire élevée), plus la diffusion est faible. Il traduit également la valeur de l'imperméabilité des différentes couches de la peau. Sa valeur est généralement voisine de 10^{-9} cm^2/s dans le *stratum corneum* et de 10^{-6} cm^2/s dans l'épiderme et le derme, ce qui indique que la couche cornée est 1000 fois plus imperméable que les couches sous-jacentes.

Sources : (56)

Méthodes d'évaluation de la pénétration cutanée

Le degré de pénétration cutanée d'une molécule peut être évalué afin de connaître le lieu d'action de cette molécule ainsi que le pourcentage de substance ayant traversé la peau par rapport à la quantité appliquée.

La méthode *in vitro* officielle de mesure de la pénétration cutanée est la mesure sur cellules de Franz (Figure 18 (56)). Elle utilise des fragments de peau humaine ou de porc et un compartiment récepteur rempli du liquide. Celui-ci est choisi en fonction des caractéristiques physicochimiques de la molécule (NaCl 0.9% pour une

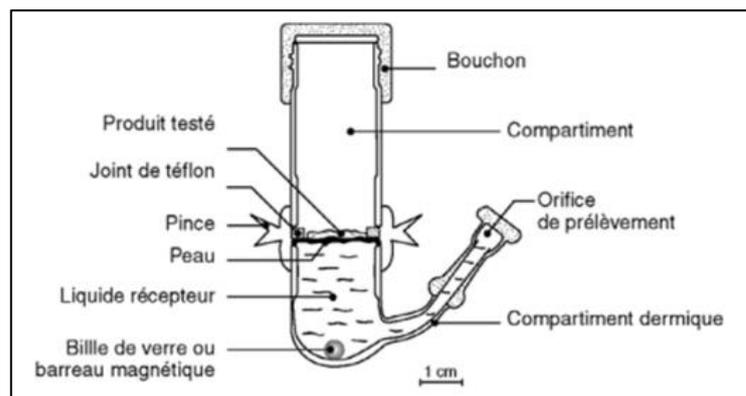


Figure 18 : schéma de la cellule de Franz modifiée par J.P.Marty

molécule hydrophile ; mélange d'eau/ sérum albumine ou d'un tensioactif pour une molécule lipophile). Placée au bain-marie, la molécule est dosée dans les prélèvements du liquide récepteur à différents temps. C'est une méthode simple, rapide, répétable et d'un faible coût. Néanmoins, les milieux utilisés ne sont pas physiologiques et le niveau d'hydratation du tissu peut être supérieur par à *l'in-vivo*, ce qui peut influencer certains paramètres comme le coefficient de diffusion.

Méthodes *in vivo* :

- Dosages chez l'animal ou l'homme réalisés dans le sang, les urines, les fèces, le rein, le foie, parfois le muscle. Ces essais sont surtout réservés aux dispositifs transdermiques.
- Méthode des strippings : après application du topique, des prélèvements des différentes couches cellulaires du *stratum corneum* sont réalisés à l'aide de rubans adhésifs. La quantité de substance présente dans les strippings est ensuite dosée.
- Technique de microdialyse.

Sources : (56)

c. Stratégies pour augmenter l'absorption

Pour faciliter la pénétration cutanée, il faut diminuer ou annuler l'efficacité de la barrière cutanée en :

- Éliminant le film hydrolipidique par décapage à l'aide de détergents ou de solvants.
- Hydratant la peau grâce à la nature des excipients. Un excipient hydrophobe peut constituer un revêtement occlusif qui maintient la peau sous-jacente très humide et faciliter la pénétration de substances hydrophiles.
- Employant des promoteurs d'absorption. Ils assurent alors une dissociation des cellules cornées, une certaine dissolution du ciment lipidique intercellulaire et augmentent la perméabilité. Ex : éthanol, isopropanol, propylène glycol, certaines huiles essentielles etc... Il est également possible d'utiliser des tensio-actifs.
- En augmentant la circulation cutanée par l'emploi de vasodilatateurs (ex : nicotinate de méthyle).

Source : (56)

IV. Les inhibiteurs de mTOR en application cutanée : vers le traitement des angiofibromes

L'efficacité des traitements systémiques a montré tout l'intérêt d'utiliser des inhibiteurs de mTOR pour traiter les AF. Cependant, leurs effets indésirables limitent leur utilisation à cette seule indication. Depuis maintenant une dizaine d'année, les publications se sont multipliées sur le sujet et plusieurs essais cliniques ont été mis en place. Le but de la recherche bibliographique présentée ci-dessous est de réaliser un état de l'art et de répertorier l'ensemble des connaissances nécessaires à la mise en place d'une formulation topique à base de sirolimus.

1. Revue de la littérature

Les articles trouvés dans la littérature scientifique peuvent être classés en deux groupes : le premier regroupant des essais pour traiter des affections autres que la STB comme le psoriasis (59); puis à partir de 2010, des articles uniquement consacrés à l'efficacité du sirolimus topique pour traiter les AF.

Avant d'être utilisé chez l'homme, le sirolimus en topique a d'abord démontré son efficacité sur des modèles murins (40) et lors de tests *in vitro* sur des explants de peau (60). La première publication d'utilisation du sirolimus par voie topique chez l'homme pour traiter les AF date de 2010 et a été publiée par l'équipe de Haemel aux Etats-Unis (41).

Réf	Auteurs	Année	Type d'étude	[C]	Formulation	Nombre patients	Age (ans)	Posologie	Résultats	Effets secondaires	Remarques
(41)	Haemel <i>et al.</i> (USA)	2010	Etude de cas	1%	Pommade à la vaseline (cpr écrasés)	1 ♀	16	2/j	Amélioration	Non	Première publication sur le sujet
(61)	Wataya-Kaneda <i>et al.</i> (Japon)	2011	Série de cas	0.2%	Crème Protopic® (tacrolimus 0.03%)	6 ♀ 3♂	9-46 (Me=17)	2/j	Amélioration. Efficacité fonction de l'âge	Non	Protopic® seul ne fonctionne pas. Etude comparative gauche droite. Recrudescence après arrêt.
(29)	Mutizwa <i>et al.</i> (USA)	2011	Etude de cas	1mg/ml	Rapamune® solution	2 ♀	15,26	2/j puis 1/j	Amélioration	Irritation locale. Corticoïdes locaux prescrits	Diminution de posologie nécessaire. Traitement local trop irritant.
(62)	DeKlotz <i>et al.</i> (USA)	2011	Etude de cas	1%	Pommade à la vaseline et paraffine liquide (cpr écrasés)	1 ♀	NP	2/j	Amélioration	Non	Amélioration de la galénique de la pommade faite à partir de comprimés
(63)	Salido <i>et al.</i> (Espagne)	2012	Série de cas	0.4%	Pommade à la vaseline	5 ♀ 5♂	6-43 (Me=13)	3/semaine	Amélioration	Non	Développent l'index FASI.
(26)	Foster <i>et al.</i> (Australie)	2012	Série de cas. Etude comparative	0.1%	Pommade à la vaseline (cpr écrasés)	2 ♂	5-17 (Me=6)	2/j	Amélioration	Non	Les patients traités par solution ont dû switcher sur la pommade un mois avant la fin de l'étude.
(64)	Truchuelo <i>et al.</i> (Espagne)	2012	Etude de cas	1%	Dexeryl® crème	1 ♀	11	1/j	Amélioration	Non	
(65)	Koenig <i>et al.</i> (USA)	2012	Essais clinique	0.003% vs 0.015% vs Placebo	Skincerity®	23	>13	1/j	Amélioration: 73% bras traités vs 38% bras contrôle	Deux patients avaient sensation d'inconfort	Randomisé. Double aveugle. Durée de 6 mois. 28 patients enrôlés (retrait de 5 patients dont 2 pour inconfort). Efficacité sur critères subjectifs du patient.
(28)	Kaufman McMamara <i>et al.</i> (USA)	2012	Etude de cas	0.1%	Mélange de Rapamune® (solution) et d'Eucerin®	2♂	6-21	1/j	Efficacité chez l'enfant. Réponse partielle chez le jeune adulte.	Non	Un keratolytique est ajouté à la formulation pour augmenter la pénétration. Jeune adulte traité par sirolimus per os également.
(66)	Valerón - Almazan <i>et al.</i> (Espagne. USA)	2012	Etude de cas	1mg/ml	Solution	1 ♀	27	2/j	Amélioration	Non	Ne précise pas quelle solution est utilisée
(67)	Cuevas Asencio <i>et al.</i> (Espagne)	2012	Rapport d'activité	0.4%	Pommade à la vaseline et paraffine liquide	12	NP	3/semaine	Amélioration	Non	Les auteurs précisent préparer la pommade depuis 2009
(68)	Wheless <i>et al.</i> (USA)	2012	Etude de cas	0.1%	Pommade ou crème hydrophile ? (cpr écrasés)	1 ♀ 1♂	10-12	2/j (2 semaines) puis 1/j	Amélioration	Non	Manque de précision sur la nature de la forme galénique (crème ou pommade hydrophile ?)

Réf	Auteurs	Année	Type d'étude	[C]	Formulation	Nombre patients	Age (ans)	Posologie	Résultats	Effets secondaires	Remarques
(30)	Bae-Harboe et al. (USA)	2013	Etude de cas	0.2%	Pommade	1 ♀	26	2/j	Amélioration	Non	Pas de précisions sur la formulation. Patiente traitée durant la même période par laser.
(69)	Tanaka et al. (Japon)	2013	Etude comparative	0.2%	Pommade (poudre de sirolimus)	2 ♀ 2 ♂	2-36	2/j	Amélioration	Un patient présentant un erythème temporaire	Comparaison gauche droite pour les deux groupes. Etudes de pénétration réalisées in vitro en faveur du gel.
(70)	Svendsen et al. (Norvège)	2013	Etude de cas	0.4%	NP	1 ♂	NP	3/semaine	Amélioration	Non	
(71)	Knöpfel et al. (Espagne)	2013	Etude de cas	0.2%	Pommade	1 ♂	13	1/j (5/semaine)	Amélioration	Non	Utilisent également la formulation pour traiter les macules hypomélaniques. Bons résultats.
(72)	Park et al. (Corée du Sud)	2014	Etude de cas	0.1 et 0.2%	Pommade à la vaseline et base de pommade (cpr écrasés)	3 ♀ 1 ♂	11-26-32-38	2/j puis 3/semaine	Amélioration	Non	Comparaison gauche-droite. Thérapie par laser concomitante sur les lésions les plus importantes.
(73)	Tu et al. (Australie)	2014	Etude clinique	0.1, 0.5 et 1%	Pommade à la vaseline (cpr écrasés puis poudre)	6 ♀ 13 ♂	6-20	2/j puis 1/j puis 3/semaine	Amélioration	Un patient avec une dermatite péri-oral	Continuité de l'étude de Foster et al. (26) . Des patients prétraités par la solution sont passés à la pommade
(74)	Rodrigo-Nicolás et al. (Espagne)	2014	Etude de cas	1%	Pommade à la vaseline (cpr écrasés)	1 ♀ 3 ♂	25-48 (Me=44)	NP	Amélioration légère	Légère irritation (diminution de la posologie)	Utilisation du FASI index. Faible efficacité.
(75)	Vasani. (Inde)	2015	Etude de cas	0.1% puis 1%	Pommade à la vaseline (cpr écrasés)	1 ♀	17	2/j	Amélioration	Non	
(27)	Pynn et al. (Royaume-Uni)	2015	Etude de cas	0.1%	Pommade à la vaseline (cpr écrasés)	2 ♂	8-11	1/j	Amélioration	Quelques sensations de piqûres à l'instauration du traitement.	
(76)	Dill et al.	2014	Etude de cas	0.4%	Pommade à l'évérolimus : la vaseline et paraffine liquide (cpr écrasés)	1 ♀	10	1/j	Amélioration	Légers picotements au début .Rougeurs transitoires en rapport avec une exposition solaire	Première publication utilisant l'évérolimus en topique

a. Les inhibiteurs de mTOR en topique pour traiter les angiofibromes faciaux

Depuis 2010, le sirolimus est l'inhibiteur de mTOR le plus utilisé pour réaliser des formes topiques. 21 publications, en majorité des études de cas isolés ou des petites séries de cas, rapportent son efficacité. Deux revues ont été consacrées à ce sujet (77) (78). À ce jour, seule une publication sur l'everolimus a été proposée (76) et aucun article n'a été retrouvé concernant les autres inhibiteurs de mTOR. Les données ci-dessous sont un résumé des articles trouvés dans la littérature.

Patients : plus d'une centaine de patients ont été traités. La répartition homme/femme est assez équitable. Ce sont pour la majorité des enfants, des adolescents ou des jeunes adultes. Ils sont rarement âgés de plus de 30 ans. Une partie d'entre eux, adolescents et adultes, ont déjà été traités par chirurgie et/ou laser, avec une efficacité modérée (41) (63).

Formulations utilisées : la plupart des publications s'attardent peu sur les formulations et leurs procédés de préparation. Lors des premiers essais, le sirolimus en poudre n'était pas accessible. Les matières premières disponibles étaient alors les comprimés enrobés (broyés pour obtenir une poudre) et les solutions de sirolimus (Rapamune®).

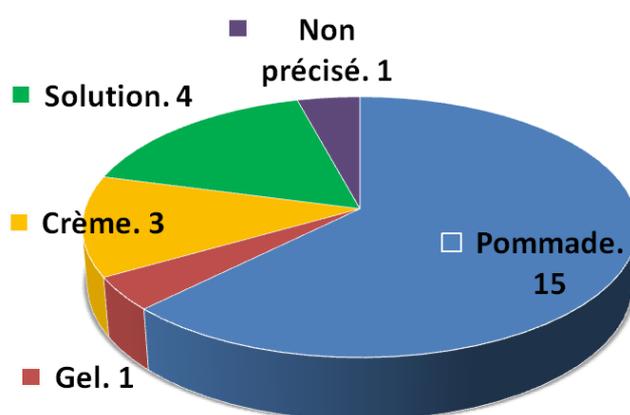


Figure 19 : formes galéniques reportées dans la littérature

La forme galénique la plus utilisée est la pommade, citée 15 fois (Figure 19). La poudre de comprimés est ainsi mélangée à de la vaseline (véhicule lipidique) seule ou préalablement dissoute dans de l'huile de paraffine. Wheless en 2013 rapporte l'utilisation d'une pommade hydrophile dont la composition n'a pas été précisée (68). Dans d'autres publications, le sirolimus était mélangé à une forme topique pré-existante (Dexeryl® crème, Protopic® crème) ou à un cosmétique (Euceryl®, Skincerity®).

N.B. - Les gammes Euceryl® et Skincerity® sont des noms de gammes de cosmétiques dont le catalogue est étendu. Comme aucune précision supplémentaire n'est apportée, il est difficile de connaître la forme galénique exacte utilisée dans les publications concernées.

Malgré le manque de précisions galénique de certains articles, quelques équipes partagent leurs résultats. De Klotz précise ainsi que le mélange de sirolimus en solution et la vaseline

forme une émulsion instable. Il a également tenté de retirer l'enrobage des comprimés en les mélangeant à de l'alcool, mais les résidus d'alcool ont provoqué des irritations chez les patients. Il propose aussi une formulation à base de comprimés de sirolimus broyés au blender, tamisés puis mixés de nouveau au blender avec de la vaseline (62).

L'application directe de la forme buvable sur la peau a été rapportée dans 4 publications (26) (29) (66) (73). Une autre publication japonaise a proposé la formulation d'un gel de sirolimus (69).

Concentration du sirolimus : les concentrations testées vont de 0.003% à 1% (Figure 20). Les plus utilisées sont le 0.1% (7 publications), le 1 % (6 publications) et le 0.2% (6 publications). Un article suggère qu'à des concentrations inférieures à 0.1 % il n'y aurait pas d'efficacité (27). Cependant, l'étude de Koenig en 2012 rapporte une efficacité à des concentrations plus faibles lors d'un essai clinique (65).

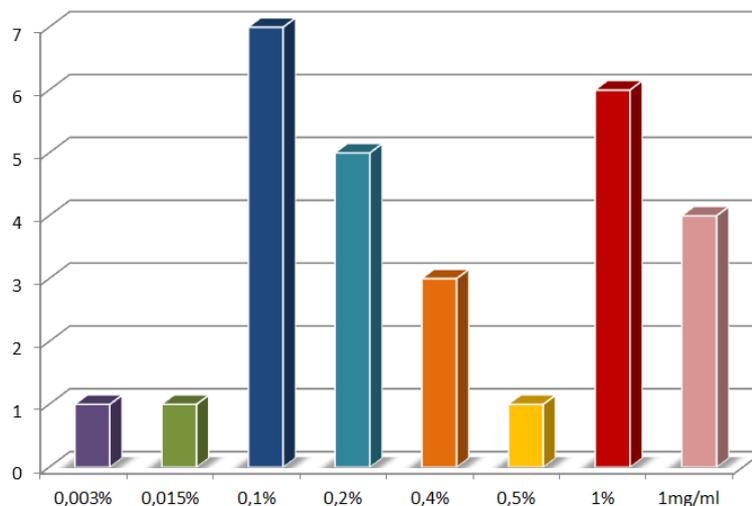


Figure 20: concentrations des formes galéniques reportées dans la littérature et nombre d'études les rapportant

La préparation : les formes topiques sont fournies, quand cela est précisé, par la pharmacie de l'hôpital concernée. Il n'y a que très peu d'explications sur les techniques de préparation et les moyens utilisés pour les dispenser. La sécurité de l'étape de préparation n'a pas été évoquée, mais cela ne veut pas dire que des moyens de protection n'ont pas été pris.

Schéma et fréquence d'application : le sirolimus en topique doit être appliqué sur une peau saine, après lavage et séchage (75). L'application sur des blessures récentes (au vu du mécanisme d'action) pourrait modifier le processus de cicatrisation (63) (67).

Le schéma posologique le plus évoqué est l'application en 1 à 2 fois par jour. Mais, du fait de la difficulté de l'observance chez les enfants et de la consistance des préparations (corps gras), l'application bi-journalière est très souvent passée à une simple application nocturne sur la propre décision des parents. Les tests d'application débutent rarement à 3 applications par semaine. Ce schéma est plutôt adopté lorsque les patients sont traités depuis plusieurs mois et que la réduction du nombre d'AF semble stagner ; privilégiant une efficacité sur la durée (72).

Efficacité générale / échelle de mesure : après lecture des articles, à tous les dosages, on retrouve une efficacité du traitement par voie topique. Mais l'efficacité est dépendante du degré d'atteinte du patient et de son âge. Plusieurs séries de cas ont débutées par le traitement d'un seul côté du visage et sont rapidement passées au traitement du visage entier après constatation de l'efficacité (61) (69) (72).

Les résultats observés sont souvent « spectaculaires » et rapides, notamment sur les érythèmes qui disparaissent en quelques semaines. Pour certains d'entre eux, ils sont même supérieurs aux résultats observés après utilisation de la laserthérapie ou l'excision chirurgicale sous anesthésie générale (26).

Malgré les superlatifs utilisés, la comparaison de l'efficacité des différents traitements proposés est d'autant plus difficile qu'il n'existe pas de recommandations pour classer les patients en fonction de leur degré d'atteinte. Peu d'échelles objectives ont été utilisées, hormis la FASI (Facial Angiofibromas Severity Index) développée par des équipes espagnoles (63) (74) (79). Seul l'âge est un critère comparable.

Cependant, un profil d'efficacité tend à se démarquer. Le sirolimus topique, tous dosages et formes galéniques confondus, semble plus efficace chez les enfants et les adolescents ; les résultats « spectaculaires » étant moins fréquemment décrits chez les adultes (26) (28) (63) (69) (73) (74). Une des explications probables serait le degré de la composante proliférative et fibrotique des AF, moindre chez les plus jeunes qui augmenterait leur sensibilité à l'action du sirolimus (74) (75).

Le tacrolimus (Protopic®) a été utilisé seul et n'a pas montré de réelle efficacité (61) (66).

Des pauses thérapeutiques ont été entreprises, mais dans la majorité des cas les érythèmes et angiofibromes réapparaissent systématiquement (27) (72) (74).

Effets secondaires : très peu d'effets indésirables ont été reportés. Seuls quelques cas anecdotiques et transitoires de démangeaisons (27), d'irritations (74) ou de légers érythèmes (69), ont été observés. Néanmoins, lors de l'utilisation des solutions buvables de sirolimus en application directe sur les AF, des irritations importantes ont été rapportées (26) (29). Les patients se voyaient obligés de diminuer la fréquence d'application et d'utiliser des corticoïdes topiques, voire d'arrêter le traitement. Ces irritations s'expliquent par la concentration importante d'alcool éthylique (20mg/ml) dans la solution buvable (46).

Dosages sanguins : des dosages sanguins ont été réalisés dans une grande majorité des études et n'ont permis de détecter que 3 fois le sirolimus à des concentrations inférieures aux concentrations thérapeutiques immunosuppressives (26) (73). Les auteurs restent cependant imprécis sur les formulations utilisées à ces occasions : pommade à 0.1% ou solution buvable de sirolimus à 1mg/ml (26) ? Pommade à 0.5 ou 1% (73) ?

Retours sur les formulations : le retour des patients vis-à-vis des formulations n'est que très peu évoqué. Certains patients trouvent que les pommades rendent la peau grasse et huileuse (74) et sont parfois difficiles à appliquer.

Les remarques récurrentes sur les formes préparées à partir de comprimés écrasés concernent la texture rugueuse et granuleuse des préparations (67) (72). Quelques saignements causés par le frottement de morceaux de comprimés restés dans la formulation, voire des morceaux retrouvés sur le visage après application auraient parfois été observés (73).

Malgré certains de ces inconvénients, les patients sont globalement satisfaits par l'efficacité des traitements, notamment sur les érythèmes (74).

Coût : le coût important des préparations est évoqué et chiffré dans plusieurs publications. Il est grande partie dû aux matières premières (comprimés et poudre) et est fonction de la concentration en sirolimus et de la fréquence d'application des topiques. A titre d'exemples, selon les auteurs, il peut être de :

- 280£ (360€) pour 50 g de pommade à 0.1% réalisée à partir de comprimés (27)
- 232.42€ pour 30g de pommade à 1% réalisée à partir de comprimés (74)
- 410\$ (375€) pour 50g de pommade à 0.1% faite à partir de comprimés. Pour la même quantité et une concentration de 0.5%, la préparation à partir de poudre de sirolimus coûterait seulement 125\$ (115€) (73)
- 3000\$ pour 30g de pommade à 1% (29)

Ces coûts élevés (environ 2000 à 3000\$ par an par patient pour une préparation à 0.1%) sont à rapporter aux coûts (hospitalisation) et aux risques des techniques chirurgicales et physiques évoquées précédemment (11000\$) (26). Certains auteurs remettent parfois en cause la justification du coût vis-à-vis de l'efficacité, notamment chez les adultes (74).

b. Les inhibiteurs de mTOR en topique, autres indications

On peut également retrouver dans la littérature des publications rapportant l'utilisation de topiques à base de sirolimus dans d'autres indications :

- Le sarcome de Kaposi (80), pommade à 0.5% à base de comprimés écrasés. Bonne efficacité et tolérance.
- Les macules hypomélaniques (81) (82) . Etude de cas et petit essai clinique d'un gel à 0.2%. Bonne efficacité et tolérance.
- Les malformations capillaires vasculaires du syndrome de Sturge-Weber (83). Essai clinique d'une crème au sirolimus à 1% et d'un traitement concomitant par laserthérapie. Crème élaborée à partir de poudre dissoute dans de l'alcool benzylique à 3,8% et mixée dans une émulsion E/H. Outre divers effets indésirables (acné, aphtes, herpès labial...) probablement liés à l'utilisation du laser, la moitié des patients rapportent une irritation après application de la crème.
- Etc...

La plupart des autres articles sont consacrés à des études chez l'animal ou à des petites séries de cas utilisant des solutions de sirolimus en application topique.

c. Conclusion

Le sirolimus utilisé en topique, malgré une faible diffusion théorique (cf page 48), a montré son efficacité et sa sécurité d'utilisation dans la littérature. En régulant négativement la protéine mTOR, il inhibe rapidement l'angiogénèse et la prolifération des fibres de collagène (68). Cependant, l'ensemble de ces résultats manque d'uniformité. Les formes galéniques utilisées ainsi que les concentrations ont été très diverses. Il n'est pas possible de comparer les patients entre eux par manque d'échelle d'évaluation commune. Malgré cela, un profil d'efficacité chez les enfants, les adolescents et les jeunes adultes et un schéma thérapeutique peut être mis en évidence. Voici ce qui en ressort :

Parmi toutes ces formulations, il est possible d'envisager le choix d'une formule de base permettant de pouvoir varier les concentrations en principe actif. De faibles concentrations pourraient être utilisées suivant une posologie d'attaque (ex : 0.1% chez les enfants) puis, du fait des recrudescences après arrêt, pourraient être maintenues à des applications plus espacées ou répétées selon des cycles. Les concentrations pourraient également être augmentées suivant la sévérité d'atteinte et l'âge des patients (ex : 0.5 et 1%) (73). Il se peut que l'utilisation d'un topique seul ne montre pas une efficacité suffisante, et que le recourt à un traitement per os, à des ablations par chirurgie ou laser, ou une combinaison de ces thérapeutiques s'avèreraient nécessaires. Utiliser une échelle de caractérisation telle que l'index FASI permettrait de classer les patients, de leur proposer un schéma thérapeutique le plus adapté pour une action efficace et à long terme, et permettrait aussi de diminuer les coûts (25) (72). Un exemple de schéma thérapeutique est proposé par l'équipe de Salido (Figure 21) (25).

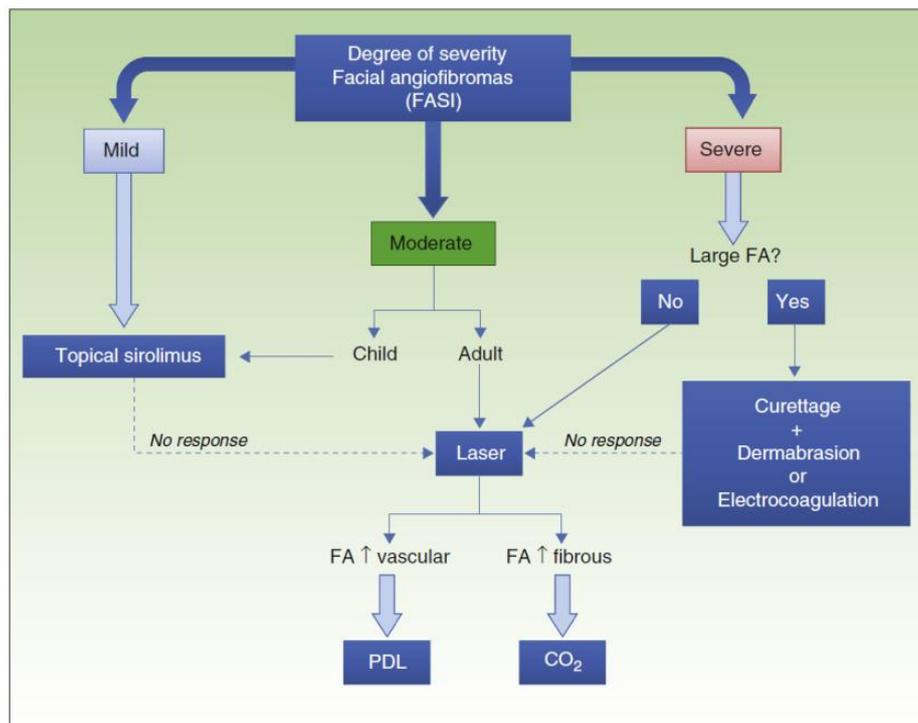


Figure 21 : illustration d'un schéma thérapeutique possible

La formule galénique idéale n'a pour le moment pas encore été trouvée. Il nous semble que l'utilisation de comprimés écrasés ne s'avère pas être satisfaisante. En effet, outre l'apport d'excipients non destinés à la voie topique et les éventuelles blessures par des morceaux de comprimés (73), les étapes d'écrasement peuvent être évitées en utilisant directement la poudre de principe actif actuellement commercialisée, répondant ainsi aux exigences des BPP (Bonnes Pratiques de Préparation) (cf page 67) . L'incorporation du sirolimus et sa solubilisation, indispensable pour obtenir une préparation homogène, en seraient facilitées. Le choix des excipients a un impact direct sur la stabilité du sirolimus au sein du topique, sur sa pénétration à travers la peau (ex : utilisation de facilitateurs de pénétration), et influe sur les concentrations en principe actif à mettre en œuvre.

2. Essais cliniques

Plusieurs essais cliniques ont été déposés sur les préparations topiques d'inhibiteurs de mTOR. Les résultats qui suivent ont été obtenus sur les bases de données clinicaltrials.gov et clinicaltrialsregister.eu.

Essai NCT02634931 : étude japonaise multicentrique de phase 3, simple bras. Déposée en décembre 2015 pour une durée de 2 ans par l'entreprise Nobelpharma. Intitulée "***A Long-term, Single-arm, Open-label Trial of NPC-12G (Topical Formulation of Sirolimus) to Angiofibroma and Other Skin Lesions in Patients With Tuberous Sclerosis Complex***". Elle évalue la sécurité et l'efficacité du traitement à long terme d'un gel de sirolimus à 0.2% administré deux fois par jours pendant 52 semaines et plus (84).

Les deux études suivantes ont été proposées par le Dr Koenig de l'université de Houston aux États-Unis. Cette équipe proposait en 2012 l'utilisation d'une formulation à base de Skincerity® (65).

Essai NCT01526356 : étude de phase 2, débutée en février 2012 et terminée en juin 2015. Intitulée "***Phase II Study of Topical Rapamycin to Erase Angiofibromas in TSC-Multicenter Evaluation of a Novel Therapy***". Elle était composée de 3 bras : bras placebo, bras crème à 0.1% et bras crème à 1%. Aucun détail n'est précisé sur la nature de cette crème. 177 patients ont été inclus (85).

Essai NCT0103190 : étude de phase 1, débutée en décembre 2009 et terminée en février 2012. Intitulée "***Topical Rapamycin Therapy to Alleviate Cutaneous Manifestations of Tuberous Sclerosis Complex (TSC) and Neurofibromatosis I (NF1)***". Elle répartissait les patients dans 3 bras : bras placebo, bras sirolimus à 1% et bras sirolimus à 5%. La formulation était composée de Skincerity®. Elle a recruté 52 patients (86).

L'étude qui suit a été déposée par l'équipe de Wheless de l'université de Memphis aux États-Unis, auteur d'une publication sur l'utilisation d'une pommade hydrophile (68).

Essai NCT01853423 : étude de phase 1, ouverte depuis avril 2013 et en cours de recrutement. Le laboratoire Pfizer® fait partie des investigateurs. Elle est intitulée "***Tuberous Sclerosis Complex : Facial Angiofibroma Skin Cream***". Elle étudie l'efficacité et la tolérance

d'une pommade au sirolimus à 0.1% appliquée deux fois par jours durant une phase d'attaque de deux semaines puis une fois par jour. Pour le moment, elle a recruté environ 15 patients.

Essai 2011-006308-12 : étude espagnole de phase 2, ouverte en juillet 2012, et sponsorisée par la « Fundación Investigación Hospital Ramón y Cajal » de Madrid. Elle est nommée "***phase II clinical trial, to study the efficacy and safety of topical rapamycin in reducing facial angiofibromas***". Elle évalue l'efficacité d'une solution orale de sirolimus utilisée en topique (87).

N.B. - Il est à noter qu'aucun rapport sur les résultats des études terminées n'a été publié. Comme dans la littérature scientifique, on peut également retrouver d'autres essais qui évaluent l'efficacité du sirolimus en topique dans d'autres pathologies que la STB. Aucun essai utilisant un autre inhibiteur de mTOR en topique que le sirolimus n'a été trouvé sur ces bases. Aucun autre type de traitement n'est évalué dans le traitement des AF.

Tout récemment, le CHU de Lyon a obtenu en 2015 un financement PHRC (programme hospitalier de recherche clinique), le n°15-552 dont le titre est le suivant : « ***Traitement topique par évérolimus des angiofibromes faciaux chez les patients atteints de sclérose tubéreuse de Bourneville : essai combiné de phase II/III, multicentrique, contrôlé, randomisé, en double-insu, contre placebo*** ». Son acronyme est EVEROST et le budget a été évalué à 789.020 € (88).

3. Brevets

Les recherches sur les brevets ont été effectuées sur les bases de données de Google patent et de l'INPI (institut national de la propriété intellectuelle). À la différence des articles scientifiques, les brevets publient des principes inventifs, des idées, et ne proposent pas une formulation bien établie. Ils sont un ensemble d'idées de composition très variables. Et proposent des formulations généralement plus complexes que celles citées précédemment (page 53).

À titre d'exemple, on peut citer le brevet WO 2008015539 A2, nommé « ***Topical preparation containing sirolimus for treating inflammatory skin diseases dermatitis, including psoriasis and lichen ruber planus*** ». Publié en 2008 (89), il propose la formulation de la pommade suivante :

Composants	Fonctions	Proportions (%)
Sirolimus	Principe actif	0.03-0.1
Paraffine liquide	Emollient	1-20
Glyceryl monostearate	Emulsifiant	1-10
Cire blanche	Solvant	0.1-5
N-Methyl-2-pyrrolidone	Composé hydratant	1-10
Lanoline anhydre	Emollient,	2-5
Butyl hydroxyl toluene	Antioxydant	0.0075-0.1
Vaseline	Base de pommade	2-100

De même, la recherche sur ces bases a mis en lumière les brevets suivants (souvent déposés par des équipes citées dans le paragraphe « revue de la littérature », page 53) :

Tableau 6 : exemples de brevets

Identifiants des brevets	Titres et principales revendications
WO2015121836 A1	« Complexes of sirolimus and its derivatives, process for the preparation thereof and pharmaceutical compositions containing them ». Propose une méthode de dispersion du sirolimus de façon liquide et son incorporation à une forme topique (90).
WO2014117035 A1	“ Compositions for transdermal delivery of mTOR inhibitors ” Formulation déposée pour la délivrance transcutanée du sirolimus (91).
US20130317053 A1	“ Externally-used drug for treating skin disorder and method for producing same ”. Propose la formulation d’un gel ou d’une pommade (92). Brevet déposé par l’équipe de Wataya-Kaneda (61).
WO 2012142145 A1	« Methods of treating skin conditions exhibiting telangiectasia » Propose plusieurs formes topiques (solution, spray, gel, crème) (93).
US 20120022095 A1	« Topical rapamycin for treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis ». Formulation élaborée d’une pommade au sirolimus (94), déposée par l’équipe d’Haemel (41).
WO2004110347	« Compositions and methods for reducing scar tissue formation ”. Formulations topiques de sirolimus utilisées en chirurgie pour faciliter la cicatrisation (95).
US6958153 B1	“ Skin penetration enhancing components ” Propose des formulations comportant des agents facilitant la pénétration des principes actifs (96). Proposé par l’équipe d’Ormerod (59)

Afin de trouver des éléments d’inspiration pour concevoir une formulation, l’étude des brevets peut s’avérer intéressante pour peu que l’on passe outre leur langage très complexe pour un néophyte. Les brevets apportent des idées mais ne démontrent pas la preuve d’une réalisation, d’une efficacité ou d’une stabilité comme on l’attend dans l’étude d’articles scientifiques.

4. Audit en France sur la préparation

Nous avons rédigé un questionnaire en ligne par le biais du logiciel SphinxOnline (97). Celui-ci a été envoyé aux pharmaciens responsables du préparatoire des PUI de 30 CHU (98) et de 40 établissements membres de l'APHP en île de France dont l'AGEPS. Cette étude a été réalisée en mai 2015 et clôturée un mois après l'envoi du questionnaire, un seul rappel ayant été envoyé en cas de non réponse à la première sollicitation. Le questionnaire interrogeait les pharmaciens sur la réalisation ou non d'une préparation topique pour le traitement des AF de la STB. Si la réponse était positive, des précisions étaient demandées concernant la préparation (composition, conditions de réalisation, études menées...) et la délivrance aux patients (de quelle manière et nombre de patients traités). Le pharmacien était invité, s'il le souhaitait à partager son protocole de préparation. En cas de réponse négative, il était demandé si la pharmacie avait déjà été sollicitée par les équipes médicales à ce sujet, quel était le motif de non réalisation et enfin est-ce que des projets de mise en place étaient prévus ou en cours ?

29 centres ont répondu au questionnaire et 19 réponses ont été obtenues directement par téléphone, soit 48 réponses au total parmi les 70 centres interrogés (taux de réponse= 68%). Les résultats obtenus ont été les suivants :

- 1) Réalisation :** concernant les CHU, 9 PUI réalisent régulièrement ou ponctuellement une préparation topique. Selon l'enquête, aucune PUI ne réalisait la préparation parmi les centres membre de l'APHP en île de France. Les CHU étaient les suivants : CHU d'Amiens, CHU de Besançon ; CHU de Brest ; CHU de Clermont-Ferrand ; CHU de Metz ; CHU de Montpellier ; CHU de Rennes ; CHU de Saint Etienne ; CHU de Strasbourg.
- 2) Depuis combien de temps ?** Hormis les PUI du CHU de Strasbourg (2011) et du CHU de Metz (2012) et du CHU de Caen (2013), les PUI ont mis en place cette préparation depuis un an ou moins environ.
- 3) Quelle molécule est utilisée ?** le sirolimus est employé à l'unanimité.
- 4) À quel dosage ?** 0.1% (2) ; 0.33%(1) 0.2% (1) ; 1% : (7). Trois établissements (CHU de Brest, CHU de Caen, CHU de Rennes) préparent simultanément deux dosages de sirolimus (0.1% et 1% ; 0.33% et 1%, 0.2 et 1% respectivement).
- 5) Quelle matière première est utilisée ?** poudre de sirolimus (6), comprimés écrasés (3).
- 6) Quelle est la forme galénique de la préparation et quels en sont les excipients ?**
 - Crème (3) : les CHU de Montpellier, de Strasbourg et de Besançon réalisent une préparation de sirolimus dilué dans du Dexeryl® et conditionnée en seringue de 10 ml ou en tube de 15, 30 ou 50g.
 - Pommade (6) : 5 formulations sont réalisées avec de la vaseline seule ; une formulation est un mélange de vaseline et d'huile de paraffine. Elles sont conditionnées en seringue de 10 ml ou en pots de 25 ml, 10, 50 ou 60g.

- 7) Conditions de préparation mises en œuvre ?** 3 préparations sont réalisées directement sur paillasse (dont une dans une salle en dépression avec exclusion des PPH (préparateurs en pharmacie hospitalière) enceintes), 4 en isolateur et 2 sous hotte.
- 8) Études de stabilité réalisées et date limite d'utilisation (DLU) ?** Une étude de stabilité a été réalisée par la PUI du CHU de Strasbourg. La DLU a été fixée à 1 mois. Pour les autres centres qui n'en ont pas réalisé, la DLU a été fixée entre 1 et 3 mois.
- 9) Nombre de patients et type de délivrance :** tous les centres délivrent leur préparation aux patients par le biais de la rétrocession. La PUI du CHU de Montpellier est celle qui rétrocède la préparation au plus grand nombre de patients (entre 20 et 50 patients). Les autres PUI rétrocèdent pour moins de 10 patients. Il est délivré entre 1 et 7 seringues ou des pots de 15, 25, 30 et 50 g selon l'étendue des lésions.
- 10) PUI ne réalisant pas la préparation mais ayant été sollicitées par les services de soins pour la réaliser :** 6 établissements rentrent dans cette catégorie. La préparation n'a pas été réalisée pour les motifs suivants : absence de données (2), arrêt du projet (1), demande de PHRC pour mettre en place une préparation à base d'everolimus (1, CHU de Lyon), étude de faisabilité en cours (2). 4 PUI ont pour projet de la mettre en place (CHU de Lille, CHU de Lyon, CHU de Toulouse, CHU de Tours).

Le but de cette étude n'était pas d'être exhaustif mais d'avoir une idée globale de la préparation en France. C'est pourquoi, le choix a été fait de ne cibler en province que les CHU. Il semble en effet plus vraisemblable que, du fait de l'importance de la maladie, les patients atteints de STB soient plus fréquemment suivis en CHU. En Ile de France, tous les hôpitaux membres de l'APHP ont été interrogés. Cette non restriction découle d'une méconnaissance de l'organisation de l'APHP et des hôpitaux qui auraient été susceptibles de prendre en charge les patients atteints de STB. En ciblant plus particulièrement les CH où exercent des dermatologues et/ou des pédiatres, on peut restreindre la liste de 40 à 20 établissements ; le taux de réponse passant ainsi de 68 à 78%.

La mise en œuvre de cette préparation est assez récente et suit la publication des premiers articles sur le sujet. Si l'on compare les résultats de cette étude aux données de la littérature internationale (page 53), on retrouve beaucoup de similitudes. Aucune préparation n'est réalisée avec une autre molécule que le sirolimus ; néanmoins, le CHU de Lyon a pour projet la réalisation d'une forme topique à base d'everolimus dans le cadre d'un PHRC et se base très probablement sur les résultats de la publication de Dill (76). La concentration en sirolimus à 0.1% est peu fréquemment utilisée alors que c'est la concentration la plus utilisée dans la littérature. La forme galénique majoritairement utilisée est la pommade, ce qui concorde avec les données des articles répertoriés. La formulation de crème de sirolimus ajoutée à du Dexeryl® n'a été retrouvée qu'une fois dans la littérature et semblerait avoir été mise en place au CHU de Strasbourg avant l'équipe espagnole (64).

Les BPP recommandent l'utilisation de matières premières (ici la poudre de sirolimus) plutôt qu'une spécialité lorsqu'elles sont disponibles (comprimés ou solution buvable) (99). En réalité, le coût important de la matière première et le faible nombre de patients à traiter pourrait expliquer le choix d'utiliser des comprimés écrasés. Des mesures de sécurité ont été prises par les pharmaciens, en réalisant la préparation sous hotte ou en isolateur. Il est vrai que pour les deux centres qui indiquent la réaliser sur paillasse, aucune précision concernant l'habillage des PPH ou des particularités de la salle n'avait été demandées dans le questionnaire, ni précisées dans les réponses ; ces données ne sont donc pas totalement interprétables.

Aucune étude de stabilité d'une forme topique n'a été publiée jusqu'à présent et aucun détail n'a été retrouvé dans ces publications sur la DLU fixée. Le CHU de Strasbourg ayant mené son étude de stabilité et fixé une DLU d'un mois.

Le CHU de Montpellier a un recrutement de patient important par rapport à la date de mise en application de la préparation (décembre 2014), soit un peu plus de 6 mois pour traiter plus d'une vingtaine de patients.

4 pharmaciens ont accepté de partager leurs protocoles (CHU de Brest, CHU de Metz, CHU de Rennes et CHU de Strasbourg).

En conclusion, en France, les formes galéniques et les concentrations utilisées sont variées. Le manque d'homogénéité des pratiques découle d'un manque de connaissance sur le mécanisme biopharmaceutique, ainsi que des doses nécessaires en principe actif à utiliser. Un échange entre les différents centres sur les résultats afin d'harmoniser les procédés s'avérerait nécessaire. Enfin, une étude à grande échelle pourrait être envisagée.

Ce travail a fait l'objet d'un poster publié lors des Journées Dermatologiques de Paris du 8 au 12 décembre 2015 (Annexe 1, page 104) (100).

V. Définitions et exigences réglementaires des préparations

N.B. - Les paragraphes réglementaires suivants ne répertorient que les définitions et les exigences qui concernent notre préparation.

1. Définitions des préparations selon le code de la santé publique (CSP)

Selon l'Article L5121-1 du CSP (101) :

« On entend par **préparation magistrale**, tout médicament préparé selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé **en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible** disposant d'une autorisation de mise sur le marché, soit extemporanément en pharmacie, [...]. »

« On entend par **préparation hospitalière**, tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la **pharmacopée** et en conformité avec les **bonnes pratiques** mentionnées, [...] en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché, [...] par une **pharmacie à usage intérieur** d'un établissement de santé [...]. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une pharmacie à usage intérieur dudit établissement. Elles font l'objet d'une **déclaration** auprès de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé . »

Il est à noter que l'autorisation de réalisation des préparations hospitalières en PUI est délivrée par l'ARS (102). Leur déclaration auprès de l'ANSM est obligatoire et comprend des renseignements sur la préparation et notamment la justification du recours à une préparation hospitalière. Sur la base de ces déclarations, l'ANSM identifie les préparations comme indispensables car sans équivalent thérapeutique, ou non indispensables car pouvant être remplacées par des spécialités pharmaceutiques disponibles en France (AMM ou ATU) (102).

2. Les Bonnes Pratiques de Préparations (BPP)

L'article L. 5121-5 du CSP précise que « la réalisation de la préparation magistrale et hospitalière doit être en conformité avec les bonnes pratiques de préparation opposables définies par l'Afssaps (JO du 21/11/2007) ». La réalisation des préparations en PUI est ainsi soumise aux BPP et BPH (article R. 5126-14 du CSP et arrêté du 22 juin 2001, BOMES n° 2001-BOS 2 bis).

N.B. - L'Afssaps est devenue l'ANSM depuis le 1^{er} mai 2012.

Concernant la responsabilité du pharmacien :

« Le pharmacien a le **pouvoir de décision** sur l'exécution de la préparation. [...]. Il en apprécie la **faisabilité**. La pertinence de la préparation doit toujours être évaluée en termes de bénéfices et de risques pour la santé ».

« Dans le cas des préparations magistrales et hospitalières, il peut éventuellement proposer au prescripteur, [...] des modifications pour une **optimisation de la formule**. En toutes circonstances, le pharmacien engage pleinement sa **responsabilité** dans la réalisation et la délivrance de la préparation ».

« Le pharmacien ne peut **se soustraire à l'acte de préparation** qu'en cas d'impossibilité découlant des textes en vigueur, ou lorsque la préparation est dangereuse ou non conforme à l'état des connaissances scientifiques, médicales et techniques, ou par défaut de moyens techniques adaptés. [...] »

La réalisation d'une préparation se déroule de la manière suivante :

Une préparation n'est entreprise qu'après vérification par le pharmacien de sa **conformité aux textes en vigueur**. Elle n'est réalisée que si la pharmacie possède les **moyens appropriés** spécifiques pour la réaliser et la contrôler. La préparation est menée sous la responsabilité du pharmacien par des **personnes compétentes et qualifiées**. L'organisation, l'hygiène, la protection et la formation du personnel réalisant des préparations sont conformes aux principes généraux des BPPH. Les locaux, les matériels, les appareillages, les équipements et les installations de préparation ou de contrôle sont adaptés aux opérations effectuées et qualifiées. Toute **méthode de préparation et de contrôle est validée** avant sa mise en œuvre. Les matières premières à usage pharmaceutique utilisées répondent aux spécifications de la pharmacopée sauf en cas d'absence de matière première répondant auxdites spécifications disponibles.

Selon les produits et la nature des opérations effectuées, les matériels et les dispositions mis en œuvre sont **adaptés aux risques encourus**. Lorsque la préparation requiert l'utilisation de médicaments contenant des substances dangereuses pour le personnel et l'environnement, des mesures sont prises en adéquation avec la dangerosité de ladite substance : organisation appropriée, protection du personnel, habillage et équipements adaptés à l'usage et au risque potentiel encouru, locaux dédiés, méthode de préparation maîtrisée et validée pour limiter les risques de contamination des locaux de préparation.

Les préparations terminées sont maintenues en quarantaine en attente de **contrôle**. Les contrôles réalisés garantissent que les analyses nécessaires, **appropriées et validées** ont réellement été effectuées ; et que les matières premières (substances actives, excipients et adjuvants de préparation), les articles de conditionnement et les préparations terminées sont libérés pour l'utilisation dès lors que leur qualité a été jugée satisfaisante.

La **date limite d'utilisation** des préparations terminées est fixée à la suite d'études bibliographiques et/ou **d'essais de stabilité**. À défaut, la date limite d'utilisation ne peut dépasser un mois.

L'étiquetage des préparations est conforme à la réglementation en vigueur. Si des conditions particulières d'utilisation le justifient, la préparation est accompagnée d'une **notice de bon usage**.

Un **échantillon** de chaque lot représentatif du lot dont ils sont issus est conservé pendant au moins un an après la date limite d'utilisation. La quantité minimale conservée permet de réaliser au moins une analyse complète. Ces échantillons sont conservés dans une échantillothèque, dans les conditions prévues pour la préparation.

Il faut assurer la **traçabilité** des différentes opérations. Un dossier de lot est constitué pour chaque lot préparé [...].

La **conformité** d'une préparation terminée passe par la vérification des matières premières entrant dans la composition de la préparation, des calculs visant à déterminer les volumes ou les quantités utilisées, des résultats des contrôles réalisés, des articles de conditionnement, des conditions de préparation, la surveillance de l'environnement, l'examen des documents de préparation, la conformité aux spécifications de la préparation terminée et font l'objet d'une attention particulière du pharmacien en charge de la libération. Le pharmacien est le seul apte à procéder à la libération (acceptation ou refus) des préparations terminées au vu des données enregistrées dans le dossier de lot de la préparation [...]

Source : (99)

3. Les préparations topiques selon la Pharmacopée Européenne

« Les préparations semi-solides pour application cutanée sont formulées en vue d'une libération locale ou transdermique de substances actives, ou pour leur action émolliente ou protectrice. Elles présentent un aspect homogène. Elles sont constituées d'un excipient, simple ou composé, dans lequel sont habituellement dissous ou dispersés une ou plusieurs substances actives. Selon sa composition, cet excipient peut avoir une influence sur l'activité de la préparation. Les excipients utilisés peuvent être des substances d'origine naturelle ou synthétique, et peuvent être monophasé ou multiphasés. Selon la nature de l'excipient, la préparation peut avoir des propriétés hydrophiles ou hydrophobes. La préparation peut également contenir d'autres excipients appropriés tels que des agents antimicrobiens, des antioxydants, des agents stabilisants, des émulsifiants, des épaississants et des agents de pénétration. Les préparations semi-solides pour application cutanée destinées à être appliquées sur une peau gravement lésée sont stériles ».

Plusieurs catégories de préparations semi-solides pour application cutanée peuvent être distinguées : les pommades, les crèmes, les gels, les pâtes, les cataplasmes, les emplâtres médicamenteux, les dispositifs cutanés. Les pommades et les crèmes sont les préparations topiques majeures. Elles se définissent de la manière suivante :

Pommades : les pommades se composent d'un excipient monophasé dans lequel peuvent être dispersés des liquides ou des solides. Peuvent être des :

- **Les pommades hydrophobes** ne peuvent absorber que de petites quantités d'eau. Les excipients les plus communément employés pour leur formulation sont la paraffine solide, la paraffine liquide, la paraffine légère, les huiles végétales, les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides.
- **Les pommades absorbant l'eau** peuvent absorber des quantités plus importantes d'eau et conduire par conséquent à l'obtention d'émulsions eau-dans-huile ou huile-dans-eau, après homogénéisation, selon la nature des émulsifiants [...]. Les excipients utilisés sont ceux d'une pommade hydrophobe.
- **Les pommades hydrophiles** sont des préparations dont l'excipient est miscible à l'eau. Cet excipient est habituellement constitué de mélanges de macrogol (polyéthylène glycols) liquides et solides. Il peut contenir des quantités appropriées d'eau.

Crèmes : les crèmes sont des préparations multiphasées composées d'une phase lipophile et d'une phase aqueuse.

- Dans **les crèmes lipophiles** : dans les crèmes lipophiles, la phase externe est la phase lipophile. Ces préparations contiennent généralement des agents émulsifiants eau-dans-huile tels que des alcools de graisse de laine, des esters de sorbitan et des monoglycérides.
- Dans **les crèmes hydrophiles**, la phase externe est la phase aqueuse. Ces préparations contiennent des agents émulsifiants huile-dans-eau tels que des savons de sodium ou de trolamine, des alcools gras sulfatés, des polysorbates et des esters d'acides et d'alcool gras polyéthylénés, éventuellement en combinaison avec des agents émulsifiants eau-dans-huile.

Source : (103)

4. Les exigences de la Pharmacopée Européenne concernant les préparations topiques

« Lors de la fabrication des préparations semi-solides pour application cutanée, des mesures adéquates sont prises pour assurer l'obtention des **propriétés rhéologiques** recherchées. Dans les cas appropriés, les essais suivants, d'application non obligatoire, peuvent être effectués : mesure de la consistance par pénétrométrie (2.9.9), viscosité (viscosité apparente) (2.2.10) et un essai approprié peut être réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante ».

« Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation, et de la distribution des préparations semi-solides pour application cutanée, **des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit** (5.1.4) ».

Source : (103)

Troisième partie : cahier des charges, matériel et méthode

I. Cahier des charges de la préparation à réaliser

Suite à une recherche détaillée sur les angiofibromes faciaux et les inhibiteurs de mTOR, et après analyse de la littérature et de la réglementation, le cahier des charges initial s'étoffe (Figure 22).

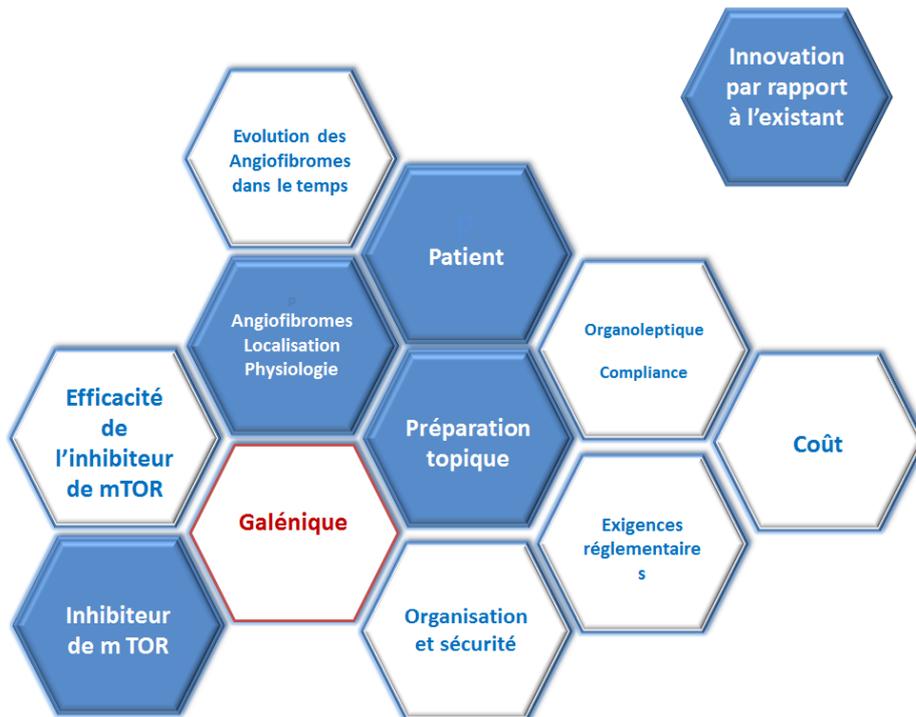


Figure 22 : illustration du cahier des charges de la préparation

✓ **Le patient :**

- Proposer une préparation topique qui facilitera la compliance du patient au traitement, en travaillant notamment sur l'aspect organoleptique. Ce critère est renforcé du fait de l'âge des patients, du handicap mental d'une partie d'entre eux et du probable traitement à long terme.

✓ **Les angiofibromes :**

- Situés dans le derme, le topique devra permettre la délivrance du principe actif et assurer sa bonne diffusion, tout en limitant la distribution dans la circulation sanguine.
- Lésions qui ne nécessitent pas l'application d'un topique stérile.

✓ **L'inhibiteur de mTOR :**

- Choix du sirolimus comme principe actif : recul de la littérature scientifique sur son utilisation et efficacité démontrée.
- Choix d'une concentration à 0.1% :
 - une des plus utilisées. Elle a montré son efficacité
 - une faible concentration permet de débiter prudemment nos travaux et si besoin d'augmenter les concentrations
 - notre formulation doit permettre une diminution des concentrations théoriques nécessaires
 - permet de diminuer le coût de revient de la préparation
- Les propriétés physico-chimiques du sirolimus ne sont pas en faveur d'une bonne diffusion à travers la peau (Tableau 3 page 43 ; III.2.a page 47 ; (52)). Cependant, l'efficacité a été démontrée. Le choix des excipients doit donc permettre de faciliter la diffusion du sirolimus (facilitateurs de pénétration).
- Type de formulation par rapport aux propriétés physico-chimiques du sirolimus et l'utilisation à long terme. Le sirolimus étant hydrophobe, la préparation devra être « monophasique hydrophobe » ou être une émulsion.

✓ **Le topique :**

- Doit être agréable à appliquer et facile à étaler. Une crème pourrait être envisagée et serait moins « grasse » qu'une pommade.
- Doit être de préférence simple à réaliser en termes de nombre d'étapes de préparation, de matériel, de locaux, de temps nécessaire etc... ; tout en assurant la sécurité du personnel.
- Avoir le contrôle galénique sur notre préparation :
 - ne pas écraser des comprimés, utiliser la poudre de sirolimus
 - solubiliser le principe actif pour mieux l'incorporer au topique
- Doit transporter le sirolimus et ne pas le détruire.
- Doit être stable dans le temps sur le plan physico-chimique et biologique (avantage pour la sécurité du patient et organisationnel). Études à réaliser en relation avec les exigences de la Pharmacopée Européenne, ainsi que les tests qui nous sembleront utiles.
- Excipients :
 - doivent être tolérés et avoir un potentiel allergisant faible
 - doivent faciliter la pénétration du sirolimus dans les AF.
- Coût à diminuer dans la mesure du possible (choix des excipients et réalisation de préparations en lots).

II. Essais de formulation

1. Matériel

La poudre de sirolimus, le polysorbate 80 (Tween® 80) et le sorbitan trioleate (Span® 85) proviennent du laboratoire Inresa®, (Bartenheim, France). Le Transcutol® P, l'huile d'olive, l'huile de ricin, la paraffine liquide et l'huile d'amande douce proviennent de la COOPER® (Melun, France). Tous les excipients répondent aux exigences de la Pharmacopée Européenne.

2. Locaux et protection

Selon les recommandations du NIOSH (page 44), les étapes de solubilisation du principe actif et d'incorporation à la base de crème ont été réalisées dans un isolateur non stérile (Jacomex® monoposte) situé dans une salle non classée du préparatoire. L'étape de conditionnement de la crème est réalisée sur paillasse, également dans une salle non classée du préparatoire. Les préparateurs en pharmacie s'habillaient en conséquence : surblouse, gants, masques et lunettes de protection.

3. Solubilisation du sirolimus dans diverses huiles ou surfactants

Un échantillon de 10 mg de poudre de sirolimus a été mélangé avec 500 mg d'huile, de solvant ou de surfactant (Tableau 7). Le mélange sous agitation a été maintenu pendant 60 minutes à température ambiante.

4. Stockage de la crème

La crème a été conditionnée dans des tubes en aluminium de 30ml (COOPER, Melun, France). Le stockage a été réalisé dans une étuve qualifiée, correspondant aux critères ICH (104), à 25°C ± 2°C sous 60 ± 5% d'humidité relative.

III. Méthode d'extraction et de dosage du sirolimus

1. Extraction du sirolimus à partir de la crème

Un aliquot de 2g de crème est disposé dans un bécher et mélangé à 10ml de méthanol, sous agitation magnétique, pendant 10min. 2ml de la solution sont centrifugés (Rotofix 32A HETTICH Zentrifugen) à 4000 rpm, soit 900g pendant 10min 1ml du surnageant est prélevé, disposé dans un vial pour HPLC et analysé.

2. Dosage du sirolimus par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Une méthode de dosage HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) a été développée, basée sur la méthode publiée par l'équipe de Ricciutelli (105). L'appareil utilisé (pompe,

injecteur et four) était une HPLC du fabricant PerkinElmer®, Séries 200. Le détecteur était un détecteur à barrette de diode (Flexar PDA detector, PerkinElmer®, Walthman, USA) opérant entre 190 et 700 nm. Le logiciel Chromera (v4.1.0) (Perkin Elmer, Walthman, USA) a été utilisé pour quantifier les pics chromatographiques. La phase mobile consistait en un mélange de méthanol et d'eau (80:20 v:v). Le débit était fixé à 1ml/min. Une colonne C18 Supelcosil® (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) (Supelco® Analytical, Sigma-Aldrich®, Bellefonte, USA) a été utilisée et maintenue à 50 °C. Le volume d'échantillon injecté était de 10 µl et le temps d'analyse était de 10minutes. La détection du sirolimus et sa quantification ont été réalisées à 278 nm.

3. Validation de la méthode

La gamme étalon a été réalisée à 5 concentrations de crèmes différentes : 0.06%, 0.08% 0.10%, 0.12% et 0.14%. Chaque échantillon a été extrait puis dosé. La linéarité de la méthode a été évaluée sur trois grammes étalons différentes.

La fidélité (ou précision) de la méthode a été évaluée en préparant 6 échantillons de crème à une concentration de 0.1% en sirolimus et répétée sur trois jours différents. Chaque échantillon a été extrait puis dosé.

L'exactitude (ou justesse) a été établie en utilisant trois niveaux de concentration différents (0.08, 0.1 and 0.12 %) en triplicata, et répété sur trois jours différents. Chaque échantillon a été extrait puis dosé.

4. Étude de dégradation forcée

Sensibilité à la chaleur : un échantillon de 2g de crème a été chauffé à 90°C durant 1heure (n=3). Puis l'échantillon a été extrait et dosé en utilisant la même méthode que pour le dosage du sirolimus dans la crème.

Sensibilité à l'oxydation : un échantillon d'1g de crème a été mixé avec 1ml d'H₂O₂ durant une minute (n=3). Puis l'échantillon a été extrait et dosé en utilisant la même méthode que pour le dosage.

IV. Études de stabilité de la préparation

1. Stabilité physico-chimique

Le dosage du sirolimus dans la crème a été réalisé aux jours : 0, 3, 7, 14, 21, 28, 63, 85, 117, 153 et 189 (n=3 pour chaque jour). La concentration moyenne a été exprimée par rapport au pourcentage de la concentration initiale obtenue à J0. Pour chaque temps, le pourcentage moyen était calculé ainsi que l'intervalle de confiance à 95% autour de cette moyenne, selon les recommandations du GERPAC (106) et la formule suivante :

$$\left[\bar{x} - 2 \frac{\sigma (X)}{\sqrt{n}} ; \bar{x} + 2 \frac{\sigma (X)}{\sqrt{n}} \right]$$

La moyenne et l'intervalle de confiance étaient considérés comme acceptables s'ils étaient supérieurs à 90% de la concentration initiale, sans présence d'un pic de dégradation caractéristique.

2. Stabilité microbiologique

Trois conditions ont été étudiées, chacune en triplicata :

- Contrôle positif : la crème, contenant ou non du sirolimus, a été artificiellement infectée avec des souches de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* à J0 et analysée après 7 jours d'incubation. La crème formulée avec du sirolimus a été utilisée pour s'assurer que le sirolimus n'inhibait pas la pousse microbienne.
- Simulation des conditions de stockage : analyse après 28, 85 et 189 jours de stockage correspondant à la stabilité physico-chimique de la crème.
- Simulation d'une prise par le patient : un aliquote était prélevé chaque jour. Les aliquots des jours 7, 14, 21 et 28 ont été analysés.

Pour réaliser l'analyse microbiologique, 1g de crème était pesé et dilué dans 5ml d'eau injectable. Puis, 400 µl ont été étalés sur des géloses au sang de mouton (n=5) (Thermo Fisher Scientific®, United Kingdom) puis incubés à 37°C. L'ensemble des manipulations ont été réalisées sous hotte à flux laminaire. L'analyse visuelle et microscopique des boîtes était réalisée au bout de 48h.

Selon la monographie de la Pharmacopée Européenne des produits non stériles (107), les formulations correspondaient aux exigences microbiologiques si le comptage des germes aérobie était inférieur à 10² UFC/g (unité formant colonie), la quantité de levures et moisissures inférieure à 10² UFC/g et en cas d'absence de *Staphylococcus aureus* ou de *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Mesures de viscosité

Les propriétés d'écoulement de la crème ont été étudiées en utilisant un rhéomètre Kinexus® (Malvern Instruments S.A., United Kingdom), avec un cône à géométrie plane (diamètre 50 mm, angle : 2°), à une vitesse de cisaillement contrôlée allant de 0.5 à 50 s⁻¹ à température ambiante. Deux cycles d'augmentation et de diminution de la vitesse de cisaillement ont été réalisés pour chaque mesure.

Les profils d'évolution de la viscosité ont été étudiés directement après la formulation des crèmes puis après 28, 85 et 189 jours d'incubation à température ambiante, en triplicata, et comparés à l'Excipial® Hydrocrème ; les résultats de viscosité ont été exprimés sur une moyenne et un écart type.

4. Appréciations organoleptiques

L'odeur, l'apparence et la couleur des préparations ont été évaluées aux jours : 0, 3, 7, 14, 21, 28, 63, 85, 117, 153 et 189 (n=3 pour chaque jour). L'odeur a été évaluée comme le

décrit la Pharmacopée Européenne, en étalant 1,5g de crème sur un verre de montre. Après 15 minutes, la crème était sentie.

V. Recrutement des patients et évaluation de l'efficacité des premiers traitements

Le traitement topique de sirolimus a tout d'abord été proposé à 6 patients suivis au CHU d'Angers et non traités par évérolimus per-os. Les premières consultations ont débuté entre novembre et décembre 2015.

L'importance et l'étendue des lésions a été évaluées selon l'échelle FASI (79) lors de la première consultation (avant traitement) puis lors des consultations suivantes (à 1,2 et 3 mois). Trois paramètres ont été étudiés et notés sur une échelle de 1 à 3 : l'importance des érythèmes, la taille des lésions et la surface qu'occupent les AF sur les joues. Le score FASI était obtenu en additionnant l'ensemble de ces résultats. Le score permettait de classer les patients suivant une atteinte légère ($FASI \leq 5$), modérée ($6 \leq FASI \leq 7$) ou sévère ($FASI \geq 8$). Les AF étaient également dénombrés (Annexe 2 page 105).

Un dosage du sirolimus sanguin a été réalisé à 1 mois par le laboratoire de pharmacologie du CHU d'Angers.

Enfin, il était demandé aux patients leur appréciation vis à vis de la crème (tolérance, compliance) et leur satisfaction globale sur le traitement (noté de 1 à 10).

Quatrième partie : résultats et discussion

I. La formulation

Au vu des caractéristiques physico-chimiques évoquées précédemment, le sirolimus diffuse naturellement peu à travers la peau. Le rôle de la formulation galénique employée joue donc un rôle primordial pour son application topique et sa pénétration dans les angiofibromes.

Plusieurs formes topiques étaient théoriquement réalisables : pommades, crèmes, gels, lotions etc... Nous n'avons pas choisi de développer une formulation de pommade, principalement utilisée par nos confrères, pour les motifs suivants : action majoritairement réalisée en surface ; difficulté d'étalement ; non compliance du patient pour une application à long terme. Nous n'avons pas non plus préparé une formulation à partir de cosmétiques et de médicaments topiques comme le Dexeryl®; non conçus pour l'incorporation de principes actifs supplémentaires. Le développement d'une crème nous semblait être le choix le plus approprié pour répondre à notre cahier des charges en termes de critères organoleptiques, de satisfaction et de compliance du patient. De plus, comme évoqué dans la partie consacrée aux principes fondamentaux de la pénétration cutanée (cf page 47), les émulsions présentent l'avantage d'une meilleure pénétration par rapport aux pommades composées uniquement de vaseline grâce à la présence de tensio-actifs ; une facilité d'étalement et une application agréable. De par les propriétés physico-chimiques du sirolimus et notamment sa faible solubilité dans l'eau (cf page 42), le sens de l'émulsion choisi a été une crème L/H (ou H/E) (phase interne lipophile, phase externe hydrophyle).

Il est théoriquement possible de préparer une crème à partir de ses excipients simples. Nous avons réalisé un essai de crème à blanc, faite à partir de : tefose 63® (7.5g), labrafil (1.5g), paraffine liquide (4g) et d'eau distillée (37g). Les résultats étaient satisfaisants, la crème était aisée à fabriquer, avait une bonne texture et était facile à appliquer. Néanmoins, l'inconvénient majeur était la multiplicité des étapes, des matériaux et des locaux nécessaires, qui rendait sa production en routine plus complexe et chronophage.

Nous nous sommes donc orientés vers l'utilisation d'une base de crème hydrophile (H/E) prête à l'emploi. Plusieurs gammes sont proposées dans le commerce : Codexial®, Diprobace®, Excipial®, Néribase®. Notre choix s'est porté sur la spécialité Excipial Hydrocrème®, couramment utilisée dans la réalisation de préparations magistrales. Elle peut incorporer des principes actifs et des excipients. Sa texture et son application sont agréables. Elle est non comédogène, lavable à l'eau, et son coût est faible (6,50€ TTC). Sa composition est la suivante : « eau, paraffine liquide, ethylhexyl stearate, palmitate de glycol, monostearate de glycérol, palmitate de cétyle, stearate de PEG-40, diméthicone, steareth-2, distearate de PEG-8, triclosan, dihydrohydrate de chlorhexidine, EDTA disodique ».

Nous avons décidé d'acquérir une poudre de sirolimus et de ne pas recourir à l'écrasement de comprimés, afin de respecter les recommandations des BPP, de diminuer les excipients

superflus et non destinés à la voie topique et de simplifier la préparation en ne recourant pas à une étape de broyage.

Certaines formulations retrouvées dans la littérature proposaient le mélange du sirolimus dans de la paraffine liquide, tel un solvant, avant son incorporation à la vaseline. Sur la base de cette observation, nous avons voulu dissoudre le sirolimus, peu soluble dans l'eau, pour mieux l'incorporer à notre crème et assurer une meilleure homogénéisation de notre préparation. De plus, la solubilisation du principe actif est également importante pour permettre sa diffusion à travers la peau et faciliter son application. Nous avons donc testé plusieurs excipients (Tableau 7).

Selon différentes publications, le sirolimus est facilement incorporé dans la paraffine liquide avant son incorporation à la formulation (77) (78) ; ce n'est pas ce que nous avons pu observer. En effet, la solubilisation dans le sirolimus s'est avérée très faible et inférieure à 2 mg/ml selon nos calculs. Nous avons également testé différents excipients couramment utilisés et décrits à la pharmacopée. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le Transcutol® qui solubilise très rapidement le sirolimus. En ce qui concerne les autres excipients, Le sirolimus s'y est avéré très peu soluble.

Tableau 7 : solubilité du sirolimus dans différents solvants, huiles ou surfactants

Huile, surfactant ou solvant testé	Solubilité du sirolimus
Huile d'olive vierge	< 2mg/ml
Huile de ricin	< 2mg/ml
Huile d'amande douce	< 2mg/ml
Paraffine liquide	< 2mg/ml
Sorbitan trioleate (Span® 85)	< 2mg/ml
Polysorbate 80 (Tween® 80)	< 2mg/ml
Diethylene glycol monoethyl ether P (Transcutol®)	Très soluble (20.2mg/ml)

Le Transcutol® (diethylene glycol monoethyl ether), est déjà utilisé dans des médicaments topiques disponibles sur le marché (46) et possède sa monographie à la Pharmacopée Européenne (108). Il permet d'augmenter la pénétration des principes actifs dans la peau (109) ; propriété fort intéressante à exploiter pour améliorer le traitement des AF. C'est pourquoi, le reste de l'étude a été réalisée avec du Transcutol®.

Du fait d'une diffusion théorique accrue, une concentration faible à 0.1% en sirolimus a été choisie. Cette concentration pouvant théoriquement être augmentée au regard de l'efficacité et des premiers retours patients.

La crème est réalisée en solubilisant la poudre de sirolimus dans le Transcutol®. Ensuite, ce mélange est progressivement incorporé à l'Excipial® Hydrocrème sous agitation manuelle

pendant quelques minutes. La composition de la crème est représentée dans le Tableau 8. La crème finale présente une légère odeur huileuse, une apparence homogène et une couleur blanche. Ces caractéristiques restent constantes tout au long de l'étude.

Tableau 8 : composition de la crème au Sirolimus à 0.1%

Composants	Quantité
Sirolimus	0.03g
Transcutol®	1.5g
Excipial Hydrocrème	Qsp 30g

La crème est conditionnée dans des tubes en aluminium de 30g. D'autres types de conditionnements étaient envisageables, comme les pots à couvercles ou les pots poussoirs airless. Les tubes présentent un moindre risque de contamination par rapport aux pots à couvercle ; ce qui n'est pas le cas des systèmes airless. Cependant, ces derniers systèmes ont coûté de revient plus important que les tubes (environ 4€ l'unité contre 0.30€).

II. Méthodes d'extraction et de dosage

Une dizaine de méthodes d'extraction de principes actifs à partir d'une crème ont été analysées. Ex : trétinoïne (110), miconazole (111), méthylsalicylate (112) etc.... Nous en avons retenu les principales étapes (extraction avec un solvant de même nature que la phase mobile de la méthode de dosage, agitation, centrifugation etc..) et développé la méthode décrite en page 73. L'extraction du sirolimus depuis la crème, comparé aux résultats obtenus par rapport à des solutions de sirolimus dans du méthanol, ont permis de définir un taux d'extraction d'environ $64,2\% \pm 1.2\%$. Ce résultat ne permet pas de détecter la totalité du sirolimus présent dans la crème. Néanmoins, cette méthode permet de détecter des produits de dégradation.

Parmi les nombreuses publications présentant des méthodes de dosage du sirolimus, nous en avons retenu et testé trois (59) (105) (113). Ces méthodes diffèrent par la composition de la phase mobile, la colonne utilisée ou le temps de rétention obtenu. Les meilleures conditions chromatographiques obtenues sont basées sur la méthode utilisée par l'équipe de Ricciutelli (105). Elles ont permis d'obtenir des pics symétriques bien définis, un temps de rétention court d'environ 6 min en moyenne, et de coupler aisément en amont la méthode d'extraction. La Figure 23 présente un exemple de chromatogramme obtenu après extraction du sirolimus à partir de la crème. Ce chromatogramme est similaire au chromatogramme que l'on obtient en solubilisant le sirolimus dans du méthanol (Figure 24).

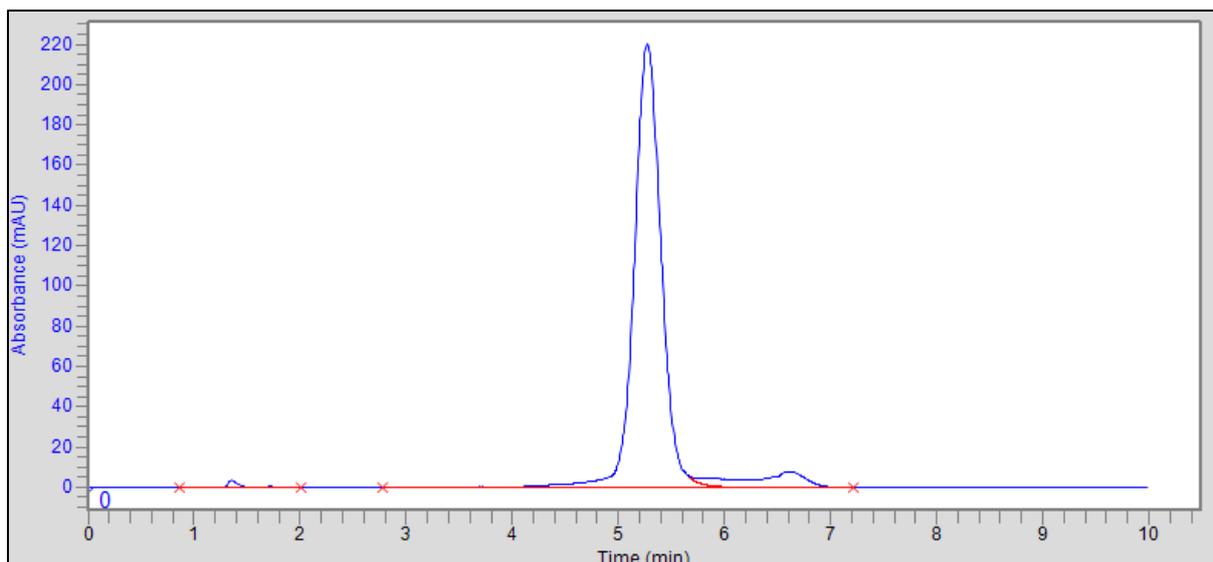


Figure 23 : exemple d'un pic chromatographique obtenu après extraction du sirolimus à partir d'une crème à 0.1%

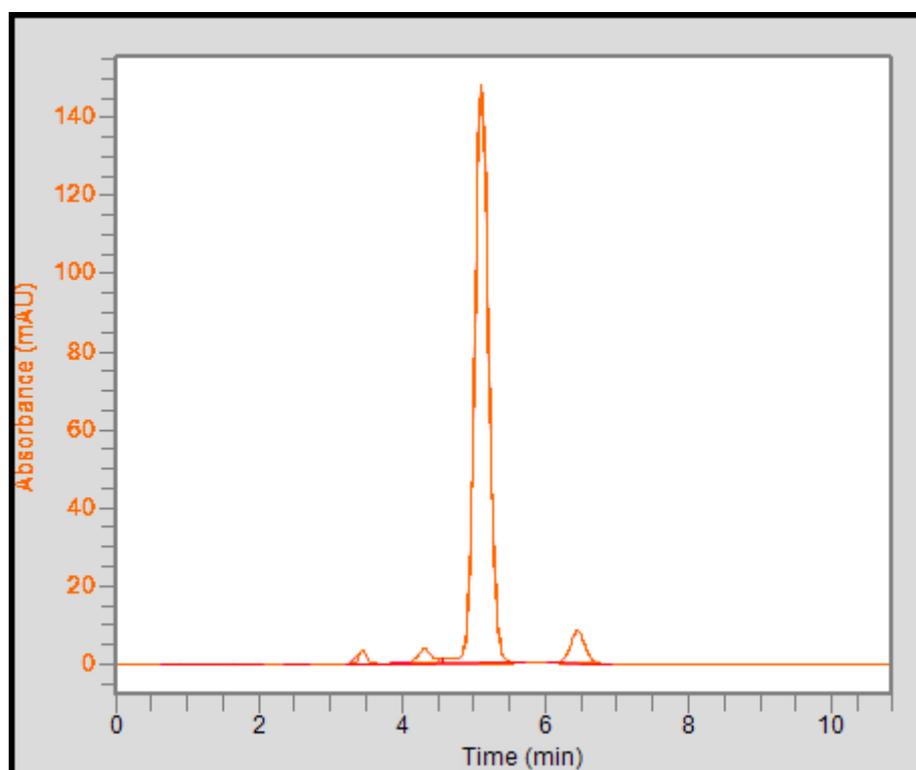


Figure 24: exemple de chromatogramme obtenu avec du sirolimus solubilisé dans le méthanol à une concentration de 0.2mg/ml

Remarque : il est à noter que le temps de rétention pouvait osciller entre 5 et 7min suivant la pression exercée, l'usure de la colonne ou la conservation de la phase mobile.

Le coefficient de corrélation obtenu sur la courbe de calibration, $r^2=0.994$, montre la linéarité de la gamme étalon (0.06% - 0.14%) (cf Annexe 3 page 107) Son équation est la suivante :

$$y = 2.6007 E^{-08}x - 0.0022856.$$

Les résultats d'évaluation de la fidélité (précision), réalisés sur une crème à 0.1% et déterminés 18 fois (6 répétitions sur 3 jours différents), étaient tous inférieurs à un coefficient de variation de 7% (Annexe 3 page 107). Ceux obtenus pour déterminer l'exactitude (justesse), réalisés sur trois concentrations de crèmes, 0.08-0,1 et 0,12 % (9 mesures répétées sur 3 jours différents), étaient systématiquement supérieurs à 94% de la valeur attendue. (Annexe 3 page 107). Ces résultats ont été considérés comme acceptables pour valider la méthode de dosage.

Selon les données du fournisseur, le sirolimus est sensible à l'oxydation, à la lumière, aux acides, aux bases et à la chaleur. La dégradation forcée portant sur l'oxydation (Figure 25) et la chaleur (Figure 26) a permis de valider la méthode comme indicatrice de stabilité. Elle a permis de détecter des produits de dégradation à des temps de rétention entre 1 et 2 minutes comme l'ont montré les travaux de Oyler (114) (115).

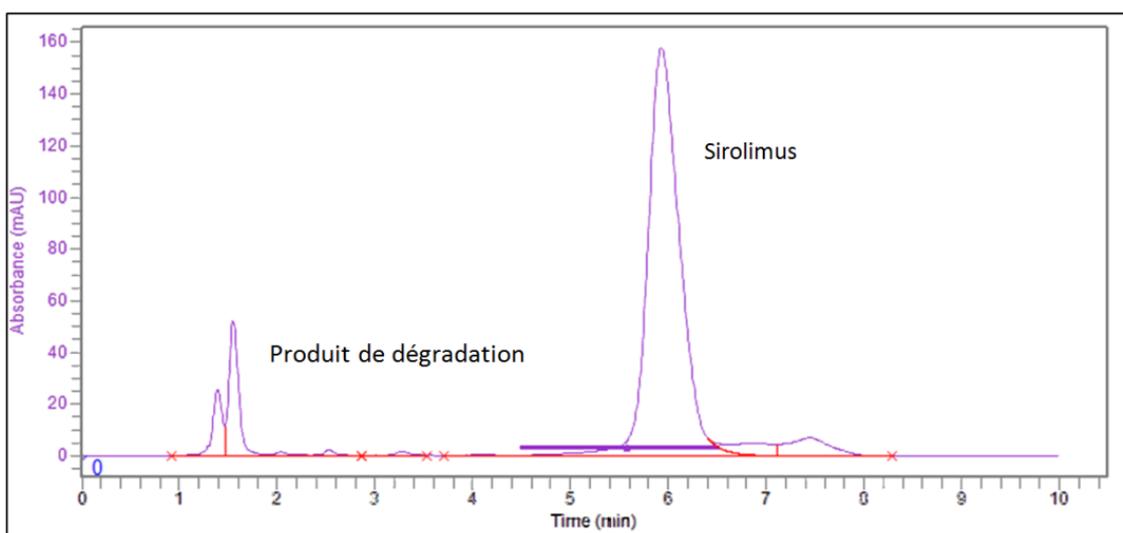


Figure 25 : sensibilité du sirolimus à l'oxydation

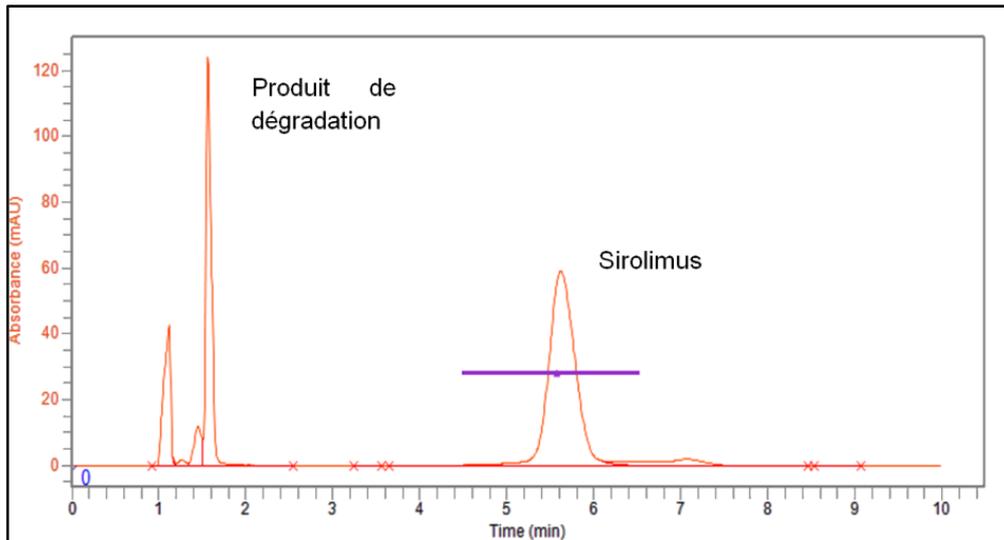


Figure 26 : sensibilité du sirolimus à la chaleur

La méthode de dosage ainsi validée est une méthode facilement applicable à la routine hospitalière, robuste et permettant la détection de produits de dégradation malgré une extraction modérée.

III. Études de stabilité

1. Stabilité physico chimique

L'évolution des concentrations dans les préparations est indiquée dans le Tableau 9. Le pourcentage moyen et l'intervalle de confiance à 95% étaient systématiquement supérieurs à 90% de la concentration initiale, indiquant que le sirolimus était stable dans la crème (Tableau 9 Figure 27). De plus, aucun pic de dégradation n'a été détecté sur les chromatogrammes tout au long de l'étude.

Tableau 9 : concentration en sirolimus dans la crème exprimée par l'intervalle de confiance à 95% (n=3) par rapport à la concentration à J0

Temps (jours)	3	7	14	21	28	63	85	117	153	168
IC 95 (% comparé à J0)	101,6-102,6	102,2-102,8	103,7-104,0	106,7-107,3	105,1-106,0	99,5-100,2	100,5-101,7	105,6-107,3	103,3-104,3	102,1-103,1

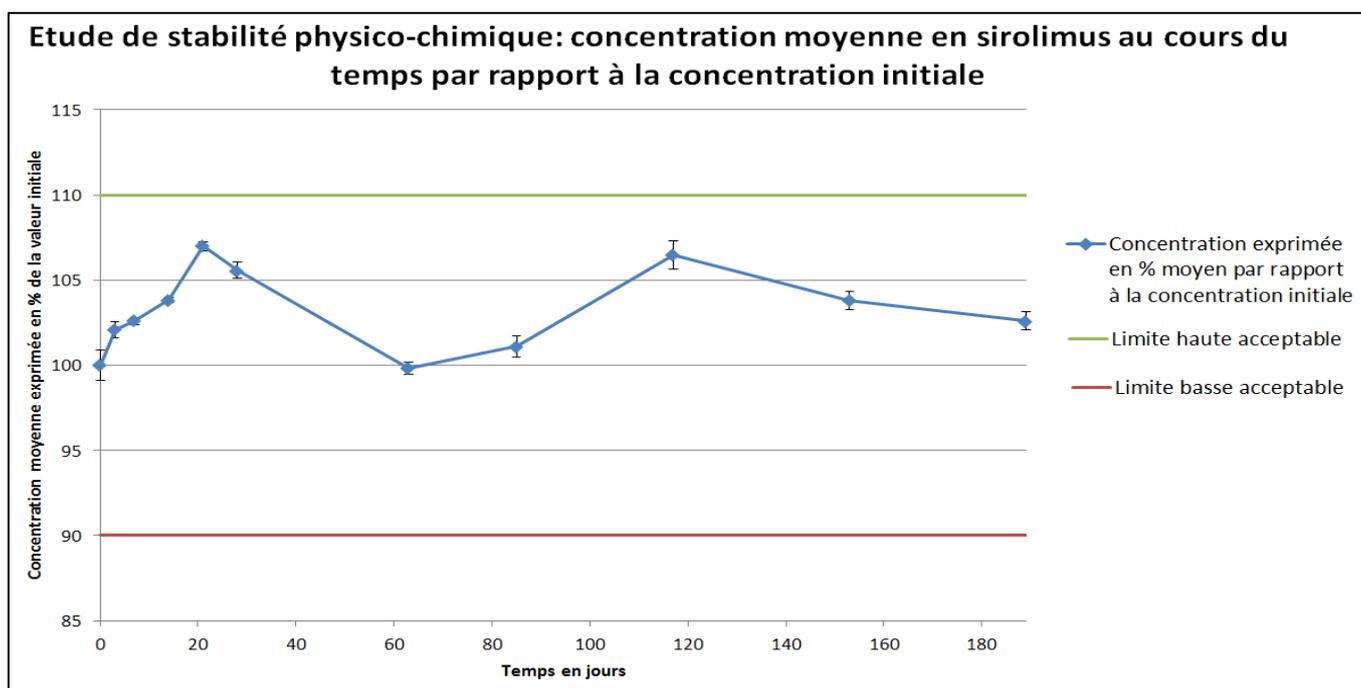


Figure 27: étude de stabilité physico-chimique: concentration moyenne en sirolimus au cours du temps

L'ensemble des résultats de l'étude de stabilité physico-chimique est reporté dans l'annexe 6 page 122.

2. Stabilité microbiologique

La présence de certains microorganismes dans des préparations non stériles peut réduire voire annuler l'activité thérapeutique du principe actif, et constitue un danger potentiel pour la santé du patient. Il est donc recommandé d'assurer une faible charge microbienne dans les préparations pharmaceutiques finies, et ce grâce à l'application des Bonnes Pratiques de Préparation tout au long du processus de fabrication, de conservation et de distribution.

La crème au sirolimus respecte les recommandations de la Pharmacopée Européenne (103) (107). Le test de contrôle positif a tout d'abord démontré que le sirolimus n'inhibait pas la croissance microbienne après 7j d'incubation d'une crème contaminée artificiellement. La contamination durant le test de stockage à 30°C à J28, J85 et J169 est restée en dessous de la limite fixée à 10² UFC/g (Tableau 10). De plus, les germes *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient absents dans les prélèvements réalisés.

Le test de simulation de prise par le patient, réalisé par prélèvement journalier de crèmes durant un mois et la mise en culture à J0, J7, J14 et J28, a également respecté les limites de contamination microbienne (Tableau 11).

Tableau 10 : contamination microbienne de la crème durant le stockage (UFC = Unité Formant Colonie).

Jour	0	28	85	185
Nombre d'UFC/g de crème	25 ± 0	1 ± 1.5	0	0 ± 2.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence	Absence	Absence	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	Absence	Absence	Absence

Tableau 11 : contamination microbienne de la crème dans les conditions d'utilisation patient (UFC= unité Formant Colonie).

Jour	7	14	21	28
Nombre d'UFC/g de crème	4.2 ± 3.8	3 ± 1.5	3 ± 1.5	3 ± 1.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence	Absence	Absence	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	Absence	Absence	Absence

Ces résultats sont attribués aux précautions prises lors du procédé de préparation qui limite la contamination microbienne initiale, aux conservateurs de l'Excipial® Hydrocrème (triclosan, disodium EDTA et chlorhexidine dihydrochloride) ainsi qu'au conditionnement primaire dans des tubes en aluminium qui limite les contacts avec des contaminants extérieurs.

3. Mesures de viscosités

La mesure de viscosité apparente est réalisée en appliquant, à un temps donné, à l'échantillon, une vitesse de cisaillement. Graphiquement, on représente la mesure de viscosité (η) en fonction de la vitesse de cisaillement (τ). Chaque mesure est composée de deux cycles d'augmentation et de diminution de la vitesse de cisaillement ; chaque cycle est lui-même composé de deux courbes (rampes 1 et 2 pour le premier, rampes 3 et 4 pour le second). Enfin, chaque rampe est composée de 31 points de mesure. Cela est illustré par la Figure 28.

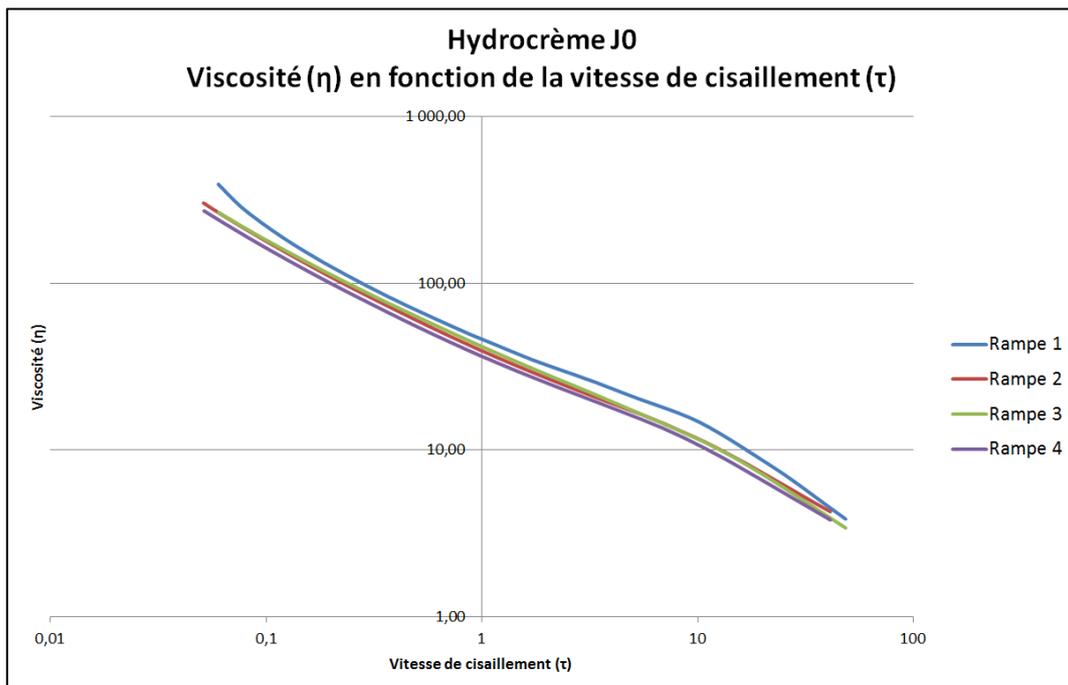


Figure 28: exemple de mesure de viscosité. Hydrocrème à J0

La viscosité de l'Excipial® Hydrocrème et des crèmes formulées au sirolimus diminue quand la vitesse de cisaillement augmente et inversement ; démontrant leurs propriétés rhéofluidifiantes. Des profils de viscosité similaires ont été observés pour l'ensemble des échantillons, sans comportement thixotrope. Les faibles coefficients de variation pour les trois crèmes formulées montrent la répétabilité du processus. La comparaison des mesures de viscosité à J0 entre l'Excipial® Hydrocrème et les crèmes formulées au sirolimus a été réalisée par un test de Wilcoxon. Ce dernier n'a pas mis en évidence de différence significative, montrant que la viscosité l'Excipial® Hydrocrème et les crèmes formulées étaient similaires (l'incorporation du sirolimus et la trituration ne modifie donc pas la viscosité de l'Excipial® Hydrocrème).

Durant les trois premiers mois, les profils de viscosité des trois crèmes formulées sont restés inchangés, démontrant leurs stabilités. Le test statistique de Kruskal-Wallis n'a pas montré de différence significative au regard de la nature de la formulation et du temps. Cependant, les mesures de viscosités réalisées à 6mois s'écartent nettement des précédentes (lignes bleues, Figure 29 et Figure 30).Rq : pour plus de lisibilité, seules les rampes 3 et 4 ont été représentées sur les graphiques

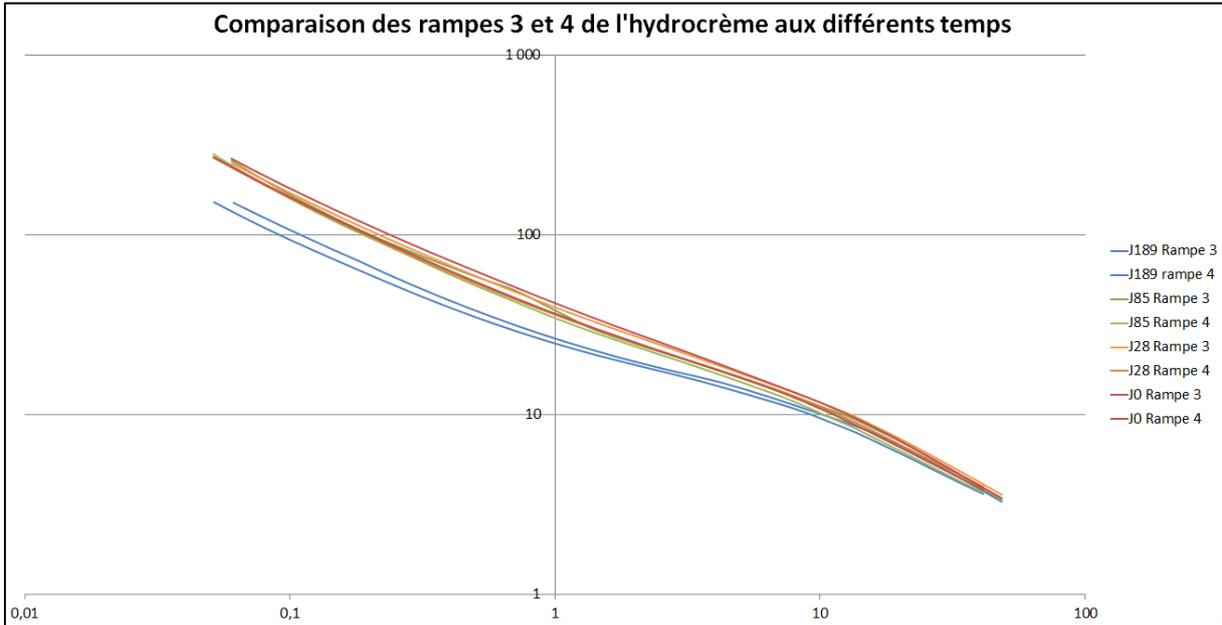


Figure 29: comparaison dans le temps de la viscosité de l'hydrocrème

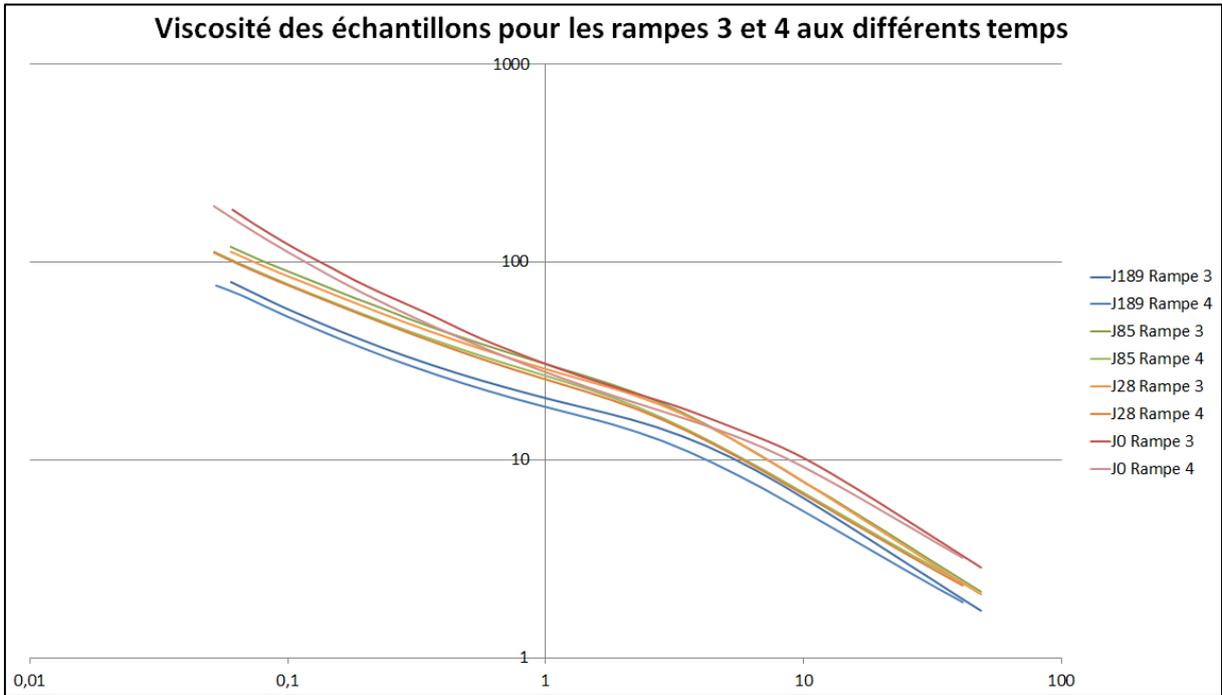


Figure 30: Comparaison dans le temps de la viscosité moyenne des échantillons

4. Appréciations organoleptiques

L'odeur légère d'huile, l'apparence homogène et la couleur blanche évaluées régulièrement de J0 à J189 ont été satisfaisants et sans évolution. Aucune anomalie n'a été remarquée tout au long de l'étude.

5. Définition d'une date limite d'utilisation de la crème

Afin de faciliter la réalisation des crèmes au sirolimus, il a été décidé de les préparer à l'avance et par lots. Le statut de préparation hospitalière impose par conséquent, selon les recommandations des BPP, de mettre en place une méthode de dosage et de réaliser une étude de stabilité afin de prolonger la date limite d'utilisation au-delà d'un mois (99).

L'étude de stabilité a été réalisée sur 6 mois. La stabilité physico-chimique a été satisfaisante en maintenant les concentrations en sirolimus dans les limites acceptables et en ne montrant pas l'apparition de produits de dégradation. Il en est de même pour l'étude de stabilité microbiologique qui a validé la simulation d'une utilisation par les patients pendant un mois après ouverture, ainsi que le stockage pendant 6 mois à température ambiante. Les propriétés organoleptiques ont également été maintenues.

En revanche, les mesures de viscosité ne nous ont pas apporté entière satisfaction au-delà de trois mois. Le laboratoire Galderma® qui commercialise la gamme Excipial® a été contacté et garantit cependant la conservation des propriétés de son produit 12 mois après son utilisation dans les préparations. L'écart de mesure de viscosité observé pourrait être dû à une erreur liée à l'analyse, ou bien serait tout simplement sans conséquences appréciables lors de l'utilisation des crèmes. Une autre mesure de viscosité à 6 mois serait envisageable pour confirmer ou infirmer ces observations. Afin de rester prudent vis-à-vis de ces résultats, il a été décidé de fixer une DLU maximale de 3 mois.

Certains tests non obligatoires n'ont pas été réalisés par manque d'équipement, mais pourraient s'avérer utiles pour caractériser notre préparation : mesure du pH, mesure de la consistance par pénétrométrie ou bien mesure de libération de la substance.

IV. Préparation et délivrance de la crème au CHU d'Angers

La préparation, la délivrance et l'utilisation de crèmes au sirolimus au sein du CHU d'Angers ont été accordées par le COMEDIMS et le comité de protection des personnes. Les crèmes au sirolimus à 0,1% sont des préparations hospitalières déclarées à l'ANSM en octobre 2015. Elles sont préparées à la pharmacie du CHU par lots de 13 unités. L'ensemble des étapes de préparation mobilise un préparateur et nécessite environ 2h30 (Annexe 4 page 107). Des contrôles sont réalisés par une technicienne de laboratoire tout au long du processus de préparation ; la concentration en sirolimus des crèmes est dosée par technique HPLC. L'ensemble de ces étapes nécessite environ 2h (Annexe 5 page 119). Le lot est ensuite libéré par le pharmacien s'il correspond aux critères d'acceptation. Le coût de revient d'un tube de 30g a été calculé à 58€ HT.



Figure 31 : tube de 30g de sirolimus à 0,1%

Cette préparation peut être prise en charge par l'assurance maladie car elle respecte les conditions définies par le code de la santé publique, à savoir :

- L'objectif thérapeutique (sous-entendu sans visée cosmétologique, diététique ou d'hygiénique).
- L'efficacité thérapeutique, appuyée notamment par la littérature
- L'absence de spécialités ou produits équivalents

La crème au sirolimus est remboursable car elle rentre dans le cadre des « préparations dermatologiques prescrites à des patients atteints de maladies spécifiques ». Cette disposition s'applique aux patients atteints de « maladies rares, maladies orphelines, maladies chroniques d'une particulière gravité et **maladies génétiques à expression cutanée** » (116).

La crème est délivrée aux patients par le biais de la rétrocession hospitalière. L'ordonnance est signée par un dermatologue et stipule la mention « **prescription à but thérapeutique en l'absence de spécialités équivalentes disponibles** » (116). Elle est facturée à l'assurance maladie sous le code PHP.

Il est délivré chaque mois au patient un tube de 30g accompagné d'une notice (Annexe 7 page 123) et de gants pour l'application. La crème est appliquée une fois par jour sur les lésions lors de l'initiation du traitement. Des conseils sont apportés au patient lors de la consultation vis-à-vis de l'exposition au soleil et de la photoprotection.

Notre coût de revient, relativement faible, est rendu notamment possible par une diminution de la concentration et la préparation en lots. Le coût des préparations topiques de sirolimus est fréquemment évoqué dans la littérature et est parfois considéré comme un frein dans certains pays où la prise en charge des soins est directement facturée au patient. La justification du coût est parfois même remise en cause vis-à-vis de l'efficacité relative du traitement chez certains patients. Malgré cela, cela ne devrait pas conduire certains patients à préparer eux-mêmes un topique à base de comprimés écrasés, comme il a pu l'être parfois observé aux Etats Unis avec l'aval de certains médecins (11). Il en est de même pour les officines, non équipées pour réaliser ce genre de préparations.

N.B. – : des tubes de 10g, plus adaptés à certains patients et à la phase d’entretien (cf V. Efficacités des premiers traitements ci-dessous) sont préparés depuis mars 2016 pour un coût de 48€ HT.

V. Efficacités des premiers traitements

Les patients ont été traités pendant trois mois à la posologie d’une application par jour. L’ensemble des résultats des scores FASI et du nombre d’AF est regroupé dans le Tableau 12.

Pour l’ensemble des patients, il a été observé une amélioration des lésions faciales comme l’illustrent les photographies des patients 1, 2 et 5 prises avant et après 3 mois de traitement par la crème au sirolimus à 0,1% (Figure 32, Figure 33 et Figure 34 respectivement). On observe nettement la diminution des érythèmes et du nombre d’angiofibromes. Les observations les plus spectaculaires ont été observées chez les patients les plus sévèrement atteints. La diminution du score FASI, pour l’ensemble des patients, était en moyenne de 2,5 unités (1-4) et celle du nombre d’AF était de 75 (50-92).

La crème a été bien tolérée (moyenne du score EVA : 9.75). Peu d’effets indésirables ont été observés. Un patient a évoqué quelques picotements sporadiques ; un autre une sensation de brûlures transitoire. Ces effets indésirables sont couramment évoqués dans la littérature (cf page 56). Le dosage du sirolimus sanguin, réalisé 1 mois après le début du traitement, était inférieur à la limite de détection pour l’ensemble des patients analysés (n=5) (un patient n’a pas souhaité réaliser la prise de sang).

Les patients étaient très satisfaits de la préparation (moyenne du score EVA : 9.5), malgré qu’un patient ait jugé la crème comme « légèrement grasse et longue à pénétrer ».

Il s’est avéré que le conditionnement en tube de 30g était largement suffisant ; les patients ayant consommé moins d’un tube par mois.

Du fait de l’efficacité du traitement, la posologie est passée à une application par semaine à partir du troisième mois de traitement. Un conditionnement plus adapté de 10g a été proposé aux patients.

Lors de la rédaction de ces travaux, les premiers patients traités ont achevé le 3^{ème} mois d’application journalière. Les résultats observés tant au niveau de l’efficacité que des effets indésirables sont similaires à ceux retrouvés dans la littérature. Les patients sont passés actuellement en schéma d’entretien avec une application hebdomadaire. L’évaluation suivante au 6^{ème} mois de traitement nous montrera si la diminution du nombre d’angiofibromes sera poursuivie, si elle aura stagnée, ou si une recrudescence aura été observée. Le recrutement de nouveaux patients se poursuit également.

Tableau 12 : résultats des scores FASI des patients traités

Patient	Patient n°1				Patient n°2				Patient n°3			
Sexe/Age	♂ 15 ans				♀ 9 ans				♂ 17 ans			
Date	J0	M1	M2	M3	J0	M1	M2	M3	J0	M1	M2	M3
Erythème /3	3	2	1	1	1	1	0	0	2	1	1	NE
Taille /3	3	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1	NE
Surface /3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	NE
Score FASI /9	9	7	6	5	4	4	3	3	5	4	3	NE
Nombre d'AF	115	87	68	57	39	12	6	3	40	10	13	NE

Patient	Patient n°4				Patient n°5				Patient n°6			
Age	♀ 5 ans				♀ 13 ans				♂ 7 ans			
Date	J0	M1	M2	M3	J0	M1	M2	M3	J0	M1	M2	M3
Erythème /3	2	1	0	0	3	2	1	1	2	1	NE	0
Taille /3	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	NE	1
Surface /3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	NE	2
Score FASI /9	6	4	3	3	8	6	5	5	5	4	NE	3
Nombre d'AF	63	24	15	12	120	64	26	28	80	21	NE	15

N.B. – : NE= non évalué, le patient ne s'est pas présenté à la consultation



Figure 32 : patient n°1 avant (gauche) puis après 3 mois de traitement (droite)



Figure 33 : patient n°2 avant (gauche) puis après 3 mois de traitement (droite)



Figure 34 : patient n°5 avant (gauche) puis après 3 mois de traitement (droite)

Conclusion

En conclusion, nous avons répondu à la demande du service de dermatologie en mettant à disposition des patients une crème au sirolimus à 0.1%. Après analyse de la littérature et étude des pratiques en France, nous avons proposé une nouvelle préparation, simple à réaliser, stable pendant 3 mois en termes de critères physico-chimiques, microbiologiques et organoleptiques et d'un coût de 58€ HT pour un tube de 30g.

Les premiers retours des patients se sont avérés satisfaisants après une application journalière d'une durée de 3 mois. La crème a été bien tolérée, a présenté peu d'effets indésirables et a satisfait l'ensemble des patients traités. Un recul sur le long terme s'avère nécessaire pour juger du maintien de l'efficacité, notamment avec le suivi d'un schéma d'entretien composé d'une application hebdomadaire.

Il serait intéressant à l'avenir que les différents centres et experts échangent et comparent leurs résultats et observations avec ceux obtenus par les autres centres Français et internationaux. Ils pourraient ainsi s'accorder sur l'utilisation d'une échelle commune pour évaluer l'atteinte des patients. Les formes galéniques, les concentrations et les molécules utilisées pourraient ainsi être confrontées de façon plus précise. Dans un second temps, il serait judicieux d'apprécier la place des préparations topiques de mTOR vis-à-vis de la chirurgie et de la laserthérapie. Le but serait à terme d'émettre des recommandations d'utilisation et des schémas thérapeutiques pour adapter les traitements à la sévérité d'atteinte et l'âge des patients. Des études à plus grande échelle devraient également être menées.

L'ensemble du travail réalisé sur la formulation et l'étude de stabilité fait l'objet d'une publication qui a été proposée au journal IJP (International Journal of Pharmaceutics) (Annexe 8 page 125).

Glossaire dermatologique

Ce glossaire regroupe quelques définitions de termes dermatologiques évoqués dans la « première partie : la sclérose tubéreuse de Bourneville ». Les termes définis ci-dessous sont suivis d'un symbole « (δ) » dans le texte.

ADENOME. Tumeur bénigne développée aux dépens d'une glande, et dont la structure rappelle plus ou moins celle de la glande dont elle provient.

ANGIOFIBROME. Angiome contenant du tissu fibreux.

ANGIOME. Tumeur caractérisée par la prolifération de tissu vasculaire sanguin (hémangiome) ou lymphatique (lymphangiome). Il s'agit d'une dysplasie vasculaire et non pas d'une tumeur au sens propre.

FIBROME. Tumeur bénigne composée entièrement de fibres de tissu conjonctif.

HAMARTOME. Tumeur constituée par un mélange anormal (de par les proportions ou la disposition) des éléments constitutifs d'un tissu.

MACULE. Tache cutanée non saillante.

NODULE. Lésion cutanée ou muqueuse bien délimitée, de forme approximativement sphérique et palpable. Les nodules peuvent être soit superficiels, situés dans l'épiderme ou dans le derme (kyste, fibrome..), soit profonds et situés dans l'hypoderme.

PAPULE. Variété de lésion cutanée sèche (sans contenu liquidien), plus ou moins saillante, de moins de 5 millimètres de diamètre et de couleur variable. Leur caractère saillant les distingue des macules.

PUSTULE. Lésion cutanée caractérisée par un soulèvement épidermique contenant un liquide purulent.

SCLEROSE. Induration pathologique d'un organe par suite d'une prolifération de son tissu conjonctif, qui s'accompagne d'une augmentation pathologique du collagène et d'une raréfaction progressive des cellules.

TUBEREUX. Qui forme des tubercules

TUBERCULES. Structure anatomique de petite taille, formant une saillie plus ou moins arrondie à la surface d'un organe ou d'un os.

Définitions issues du « Dictionnaire médical, 6^{ème} édition, 2009, Masson » et du « Larousse médical, édition 2012 ».

Bibliographie

1. **Descartes, Bibliothèque Universitaire Paris.** Désiré Magloire Bourneville. [En ligne] 2015. <http://www.biusante.parisdescartes.fr/images/banque/zoom/CIPB0452.jpg>.
2. **Bourneville, D.M.,**. Sclérose tubéreuse des circonvolutions cérébrales: idiotie et épilepsie hémiplégique. *Arch Neural (Paris)* . 1880, 1, 81-91.
3. **Bourneville, D.M., Brissaud, E.,**. Encéphalite ou sclérose tubéreuse des circonvolutions cérébrales. *Arch Neural (Paris)* 1881. 1, 390-410.
4. Timeline of Tuberous Sclerosis. *Wikiwand*. [En ligne] 12 2015. http://www.wikiwand.com/en/Timeline_of_tuberous_sclerosis.
5. **Rayer, P.F.O.,** Traité des maladies de la peau par P.Rayer, Paris, Chez J.B Baillière, 1835. *Gallica Bibliothèque Numérique, BNF*. [En ligne] <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k56121473>.
6. **Gomez, M.R.,**. History of the tuberous sclerosis complex. *Brain & Development*. 1995, 17 (suppl), 55-57.
7. **Poirier, J., Signoret, J.L.,** *De Bourneville à la Sclérose tubéreuse : une époque, un homme, une maladie*. s.l. : Médecines-Sciences, Flammarion., 1991. 2.08.202407.5..
8. **Kwiatkowski, D.J., Whittemore, V.H., Thiele, E.A.,**. *Tuberous Sclerosis Complex Genes, Clinical Features and Therapeutics*. s.l. : Wiley-Blackwell, 2010. ISBN: 978-3-527-32201-5.
9. **Serra, A., et al.** La sclérose tubéreuse de Bourneville: pathogenèse, clinique et nouvelles options thérapeutiques. *Forum Med Suisse*. 2013, Vol. 13(36), 696–702.
10. **Encyclopédie Orphanet grand public.** [En ligne] <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/ScleroseTubereuseBourneville-FRfrPub660.pdf>.
11. **Jacks, S.K., Witman, P.M.,**. Tuberous Sclerosis Complex: An update for dermatologists. *Pediatric Dermatology*. 2015, 1-8.
12. **Northrup, H., Krueger, D.A.,**. Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria Update: Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatric Neurology*. 2013, Vol. 49, 243-254.
13. Molluscum pendulum. *Vulgaris Medical* . [En ligne] 1 2016. <http://www.vulgaris-medical.com/image-medicale/molluscum-pendulum-2>.
14. TSC1/TSC2 mutation database. [En ligne] 12 2015. <http://chromium.liacs.nl/LOVD2/TSC/home.php>.
15. **Northrup, H., Koenig, M.K., Pearson, D.A., Au, K.T.,**. Tuberous Sclerosis Complex. *NCBI*. [En ligne] 12 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1220/>.
16. **Fogel, A.L., Hill,S., Teng,J.M.C.,**. Advances in the therapeutic use of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2015, 72(5), 879-89.

17. **Pópulo, H., Lopes, J.M., Soares, P.,** The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 1886-1918.
18. **Krueger, D.A., Northrup, H.,** Tuberous Sclerosis Complex Surveillance and Management: Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatric Neurology.* 2013, Vol. 49, 255-265.
19. Essais cliniques, STB . *Orpha.net.* [En ligne] 01 2013. http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/ResearchTrials_ClinicalTrials_Simple.php?lng=FR&LnkId=660&Typ=Pat&fdp=y&from=rightMenu#netclinicaltrial.
20. **Kane, Y.** The “bumps” on my face. *J AM ACAD DERMATOL.* 2004, Vol. 51, 1, 11-12.
21. **Earnest, L., Byrne, P., and Califano, J.** Massive facial angiofibroma in a patient with tuberous sclerosis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2003, 128, 151–153.
22. **Hunter, AG., Nezarati, MM., Velsher, L.,** Absence of signs of systemic involvement in four patients with bilateral multiple facial angiofibromas. *Am J Med Genet A.* 2010, 152A, 657-664.
23. **Hall, M.R., Kovach, B.T., and Miller, J.L.** Unilateral facial angiofibromas without other evidence of tuberous sclerosis: case report and review of the literature. 2007. 80, 284–288.
24. **Bordel-Gomez, M.T., Monteagudo-Sanchez, B., Alvarez-Fernandez, J.C.,** Multiple unilateral facial angiofibromas: description of a new case. *Actas Dermosifiliogr.* 2008, 99, 824-827.
25. **Salido-Vallejo, R., Garnacho-Saucedo, G., Moreno-Giménez, J.C.,** Current Options for the Treatment of Facial Angiofibromas. *Actas Dermosifiliogr.* 2014, Vol. 105, pp. 558-568.
26. **Foster, R.S., Bint, L.J, Halbert, A.R.,** Topical 0.1% rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: A pilot study of four patients. *Australasian Journal of Dermatology.* 2012, 53, 52–56.
27. **Pynn, E.V., Collins, J., Hunasehally, P.R.Y., Hughes, J.,** Successful Topical Rapamycin Treatment for Facial Angiofibromata in Two Children. *Pediatric Dermatology.* 2015, 1–4.
28. **Kaufman McMamara, E., Curtis, A.R., Fleischer JR, A.B.,** Successful treatment of angiofibromata of tuberous sclerosis complex with rapamycin. *Journal of Dermatological Treatment.* 2012; 23: 46–48.
29. **Mutizwa, M.M., Berk, D.R., Anadkat, M.J.,** Treatment of facial angiofibromas with topical application of oral rapamycin solution (1 mg/mL) in two patients with tuberous sclerosis. *BJD.* 2011, 165, 922–926.
30. **Bae-Harboe, Y.S.C., Geronemus, R.G.,** Targeted Topical and Combination Laser Surgery for the Treatment of Angiofibromas. *Lasers in Surgery and Medicine .* 2013, 45, 555–557.
31. **Lorette, G., De Muret, A., Machet, L.,** Hamartomes cutanés. *Encycl Méd Chir, Dermatologie.* 2001, 98-750-A-10,12 p.

32. Angiofibroma of nose. *Pathologyimages*. [En ligne] 01 2016.
<https://pathologyimages.wordpress.com/category/nose/>.
33. **Ruggieri, M., Pascual-Castroviejo, I., Di Rocco, C.,** *Neurocutaneous Disorders Phakomatoses and Hamartoneoplastic Syndromes*. s.l. : Springer Vienna, 2008.
34. **Jozwiak, J., Schwartz, R.A., Kryszka Janniger, C., Michalowicz, R., Chmielik, J.,** Molecular implications of skin lesions in tuberous sclerosis. *Am J Dermatopathol*. 2008, Vol. 30, 3.
35. **Li, S., Darling, T.N.,** Molecular mechanisms and therapeutics of skin hamartomas in tuberous sclerosis complex. *J Dermatolog Clin Res*. 2014, Vol. 1, 1007.
36. **Hofbauer, G.F.L., Marcollo-Pini,A., Corsenca, A., Kistler, A.D., French, L.E., Wuthrich, R.P., Serra, A.L.,** The mTOR inhibitor rapamycin significantly improves facial angiofibroma lesions in a patient with tuberous sclerosis. *Br J Dermatol*. 2008, 159.
37. **Tarasewicz, A., et al.** Rapamycin as a therapy of choice after renal transplantation in a patient with tuberous sclerosis complex. *Transplant Proc*. 2009;, Vol. 41, 3677-3682.
38. **Dabora, S.L., et al.,** Multicenter phase 2 trial of sirolimus for tuberous sclerosis: kidney angiomyolipomas and other tumors regress and VEGF- D levels decrease. *PLoS One*. 2011, 6:e23379.
39. **Kotulska, K., Borkowska, J., Jozwiak, S.,** Possible Prevention of Tuberous Sclerosis Complex Lesions. *PEDIATRICS* . 2013, Vol. 132, 1.
40. **Rauktys, A., Lee, N., Lee, L., Dabora, S.L.,** Topical rapamycin inhibits tuberous sclerosis tumour growth in a nude mouse model. *BMC Dermatol* . 2008, 8, 1–9.
41. **Haemel, A.K., O'Brian, A.L., Teng, J. M.,** Topical Rapamycin A Novel Approach to Facial Angiofibromas in Tuberous Sclerosis. *Arch Dermatol*. 2010, Vol. 146, 7.
42. ANSM Formulaire national. [En ligne]
<http://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise-Formulaire-national>.
43. **Sehgal, S.N.** Sirolimus: Its Discovery, Biological Properties, and Mechanism of action. *Transplantation Proceedings*,. 2003, Vol. 35 (Suppl 3A), 7S–14S.
44. **Paghdal, K.V., Schwartz, R.A.,** Sirolimus (rapamycin): From the soil of Easter Island to a bright future. *J AM ACAD DERMATOL*. 2007, Vol. 57, 6.
45. **Dreyer, C., Raymond, E., Faivre, S.,** La voie de signalisation PIK/AKT/mTOR. *Cancéro dig*. 2009, Vol. 1, 3: 187-189.
46. *Theriaque.org*. [En ligne] 2016.
http://www.theriaque.org/apps/recherche/rch_simple.php.
47. Coronary Drug-Eluting Stent . *Medscape*. [En ligne] 12 2015.
<http://emedicine.medscape.com/article/1970984-overview>.

48. **Zaytseva, Y.Y., Valentino, J.D., Gulhati, P., Mark Evers, B.,** mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Letters*. 2012, 1-7.
49. FDA approves Rapamune to treat LAM, a very rare lung disease. *fda.gov*. [En ligne] 12 2015. <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm448523.htm>.
50. **Ballou, L.M., Lin, R.L.,** Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol*. 2008, Vol. 1, 27–36.
51. *drugbank.ca*. [En ligne] <http://www.drugbank.ca/>.
52. **Pranitha, A., Lakshmi, P.K.,** Towards a Correlation between Polar Surface Area of Drugs with Ex-vivo Transdermal Flux Variability. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014, Vol. 10 (2), 47- 60.
53. NIOSH List of Antineoplastic and Other Hazardous Drugs in Healthcare Settings, 2014. *cdc.gov*. [En ligne] 2014. <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2014-138/pdfs/2014-138.pdf>.
54. Structure schématique de la peau. *Biafine.ch*. [En ligne] 1 2016. <http://biafine.ch/Conseils-en-cas-de-brulures.php>.
55. **Bolzinger, M.A., Briançon, S., Pelletier, J., Chevalier, Y.,** Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion In Colloid and Interface Science*. 2012, Vol. 17, 156-165.
56. **Martini, M.C.** *introduction à la dermopharmacie et à la cosmetologie 3ème édition*. s.l. : Lavoisier, 2011. ISBN 2743012706. https://books.google.fr/books?id=LiD-K319YsUC&pg=PA14&dq=dermopharmacie+pdf&hl=fr&source=gbs_selected_pages&cad=3#v=onepage&q&f=false.
57. **(CEDEF), Collège des enseignants en dermatologie de France.** Cours sémiologie. Pharmacologie des médicaments appliqués par voie topique. [En ligne] 2011. http://medecine-pharmacie.univ-roen.fr/servlet/com.univ.collaboratif.utils.LectureFichiergw?ID_FICHIER=15865.
58. **Le Hir, A., Chaumeil, J.C., Brossard, D.,** *Pharmacie galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. Abrégés de pharmacie. 9ème édition*. s.l. : Masson, 2009. 978-2-294-61204-6.
59. **Ormerod, A.D., Shah, S.A.A., Copeland, P., Omar, G., Winfield, A.,** Treatment of psoriasis with topical sirolimus: preclinical development and a randomized, double-blind trial. *British Journal of Dermatology*. 2005, 152, 758–764.
60. **Peramo, A., Marcelo, C.L.,** Visible effects of rapamycin (sirolimus) on human skin explants in vitro. *Arch Dermatol Res* . 2013, 305, 163–171.
61. **Wataya-Kaneda, M., Tanaka, M., Nakamura, A., Matsumoto, S., Katayama, I.,** A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex (TSC): a pilot study of nine Japanese patients with TSC of different disease severity. *British Journal of Dermatology*. 2011, 165, 912–916.

62. **DeKlotz, C.M.C., Ogram, A.E., Singh, S., Dronavalli, S., MacGregor, J.L.,** Dramatic Improvement of Facial Angiofibromas in Tuberous Sclerosis With Topical Rapamycin: Optimizing a Treatment Protocol. *Arch Dermatol.* 2011, Vol. 147, 9.
63. **Salido, R., Garnacho-Saucedo, G., Cuevas-Asencio, I., Ruano, J., Galan-Gutierrez, M., Velez, A., Moreno-Gimenez, J.C.,** Sustained clinical effectiveness and favorable safety profile of topical sirolimus for tuberous sclerosis - associated facial angiofibroma. *JEADV.* 2012, 26, 1315–1318.
64. **Truchuelo, T., Díaz-Ley, B., Ríos, L., Alcántara, J., Jaén, P.,** Facial angiofibromas treated with topical rapamycin: An excellent choice with fast response. *Dermatology Online Journal.* 2012, 18 (1): 15.
65. **Koenig, M.K., Hebert, A.A., Roberson, J., Samuels, J., Slopis, J., Woerner, A., Northrup, H.,** Topical Rapamycin Therapy to Alleviate the Cutaneous Manifestations of Tuberous Sclerosis Complex. *Drugs R D.* 2012, 12, (3).
66. **Valerón-Almazán, P., Vitiello, M., Abuchar, A., Kerdelb, F.A.,** Topical Rapamycin Solution to Treat Multiple Facial Angiofibromas in a Patient With Tuberous Sclerosis. *Actas Dermosifiliogr.* 2012, 103, 165-166.
67. **Cuevas Asencio, I., Albornoz López, R., Salido Vallejo, R., Reyes Maliaa, M.,** Topical sirolimus 0.4% formulation for treatment of facial angiofibromas. *Farm Hosp.* 2012, 36(5):433-4.
68. **Wheless, J.W., Almoazen, H.,** A Novel Topical Rapamycin Cream for the Treatment of Facial Angiofibromas in Tuberous Sclerosis Complex. *J Child Neurol.* 2013, 28: 933.
69. **Tanaka, M., Wataya-Kaneda, M., Nakamura, A., Matsumoto, S., Katayama, I.,** First left–right comparative study of topical rapamycin vs. vehicle for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex. *British Journal of Dermatology.* 2013, 169, 1314–1318.
70. **Svendsen, M.T., Bygum A., Hansen L.K., Broesby-Olsen S.,** Facial angiofibromas associated to tuberous sclerosis treated with topical sirolimus. *Ugeskr Laeger.* 2013, 175 (43), 2569-2570.
71. **Knöpfel, N., Martín-Santiago, A., Bauza, A., Hervásb, J.A.,** Topical 0.2% Rapamycin to Treat Facial Angiofibromas and Hypomelanotic Macules in Tuberous Sclerosis. *Actas Dermosifiliogr.* 2014, 105, 802-803.
72. **Park, J., Yun, S.K., Cho, Y.S., Song, K.H., Kim, H.U.,** Treatment of Angiofibromas in Tuberous Sclerosis Complex: The Effect of Topical Rapamycin and Concomitant Laser Therapy. *Dermatology.* 2014, 228, 37–41.
73. **Tu, J., Foster, R.S., Bint, L.J., Halbert, A.R.,** Topical rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: Follow up of a pilot study and promising future directions. *Australasian Journal of Dermatology.* 2014, 55, 63–69.

74. **Rodrigo-Nicolás, B., Armengot-Carbó, M., Molés-Poveda, P., Millán-Parrilla, F., Pont-Sanjuán, V., Quecedo-Estébanez, E., SorianoClemente,A., Gimeno-Carpio, E.,** Topical rapamycin in facial angiofibromas: patients satisfaction versus objective response, and a literature review. *Clinical dermatology*. 2014, 2(2), 93–98.
75. **Vasani, R.J.** Facial Angiofibromas of Tuberous Sclerosis Treated with Topical Sirolimus in an Indian Patient. *Indian J Dermatol*. 2015, 60(2), 165–169.
76. **Dill, P.E., De Bernardis, G., Weber, P., Lösch, U.,** Topical Everolimus for Facial Angiofibromas in the Tuberous Sclerosis Complex. A First Case Report. *Pediatric Neurology*. 2014, 51, 109-113.
77. **Madke, B.,** Topical rapamycin (sirolimus) for facial angiofibromas. *Indian Dermatology Online Journal*. 2013, Vol. 4, 1.
78. **Balestri, R., Neri, I., Patrizi, A., Angileri, L., Ricci, L., Magnano, M.,** Analysis of current data on the use of topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in Tuberous Sclerosis Complex. *JEADV*. 2015, Vol. 29, 14-20.
79. **Salido-Vallejo, R., Ruano, J., Garnacho-Saucedo, G., Godoy-Gijon, E., Llorca, D., Gomez-Fernandez, C., Moreno-Gimenez, J.C.,** Facial Angiofibroma Severity Index (FASI): reliability assessment of a new tool developed to measure severity and responsiveness to therapy in tuberous sclerosis-associated facial angiofibroma. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2014, Vol. 39, 888–893.
80. **Díaz-Ley, B., et al.** Classic Kaposi’s sarcoma treated with topical rapamycin. *Dermatologic Therapy*. 2015, Vol. 28, 40-43.
81. **Wataya-Kaneda, M., Tanaka, M., Nakamura, A., Matsumoto, S., Katayama, I.,** A Novel Application of Topical Rapamycin Formulation, an Inhibitor of mTOR, for Patients With Hypomelanotic Macules in Tuberous Sclerosis Complex. *ARCH DERMATOL*. 2012, Vol. 148, 1.
82. **Wataya-Kaneda, M., Tanaka, M., Yang, L., et al.** Clinical and Histologic Analysis of the Efficacy of Topical Rapamycin Therapy Against Hypomelanotic Macules in Tuberous Sclerosis Complex. *JAMA Dermatology*. 2015.
83. **Marques, L., et al.** Topical rapamycin combined with pulsed dye laser in the treatment of capillary vascular malformations in Sturge-Weber syndrome: Phase II, randomized, double-blind, intraindividual placebo-controlled clinical trial. *J AM ACAD DERMATOL*. 2015, Vol. 72, 1; 151-158.
84. Long-term Trial of Topical Sirolimus to Angiofibroma in Patient With Tuberous Sclerosis Complex. *Clinicaltrials.gov*. [En ligne]
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02634931?term=topical+sirolimus&rank=7>.
85. Topical Rapamycin to Erase Angiofibromas in TSC (Treatment). *clinicaltrials.gov*. [En ligne] 12 2015.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01526356?term=topical+sirolimus&rank=9>.

86. Topical Rapamycin Therapy to Alleviate Cutaneous Manifestations of Tuberous Sclerosis Complex (TSC) and Neurofibromatosis I (NF1). *clinicaltrials.gov*. [En ligne] 12 2015.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01031901?term=topical+sirolimus&rank=10>.
87. Phase II clinical trial, to study the efficacy and safety of topical rapamycin in reducing facial angiofibromas. *Clinicaltrialsregister.eu*. [En ligne] 12 2015.
<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2011-006308-12/ES>.
88. Le programme hospitalier de recherche clinique (PHRC). *Sante.gouv*. [En ligne]
<http://www.sante.gouv.fr/le-programme-hospitalier-de-recherche-clinique-phrc.html>.
89. **Ahumada, A.F.,** *Topical preparation containing sirolimus for treating inflammatory skin diseases dermatitis, including psoriasis and lichen ruber planus*. WO 2008015539 A2 2008.
90. **Angi, E.R., et al.** *Complexes of sirolimus and its derivatives, process for the preparation thereof and pharmaceutical compositions containing them*. WO 2015121836 A1 2015.
91. **Kaspar, R.L, Speaker, T.,** *COMPOSITIONS FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF mTOR INHIBITORS*. WO 2014117035 A1 2014.
92. **Kaneda, M., Katayama, I.,** *Externally-used drug for treating skin disorder and method for producing same*. US 20130317053 A1
93. **Sugarman, J.,** *Methods of treating skin conditions exhibiting telangiectasia*. WO 2012142145 A1 2012.
94. **Teng, J.M.C., Haemel, A.K., Ahlgrim, M.J.,** *Topical rapamycin for treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis*. US 20120022095 A1 2012.
95. **Fischell, R.E., et al.** *Compositions and methods for reducing scar tissue formation*. WO 2004110347 A2 2004.
96. **Ormerod, A.D., Winfield, A.,** *Skin penetration enhancing components*. US6958153B1 2005.
97. SphinxOnline. [En ligne] <http://www.lesphinx-developpement.fr/>.
98. Réseau CHU. [En ligne] <http://www.reseau-chu.org/32-chru/>.
99. Bonnes pratiques de préparation. ANSM. [En ligne]
http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/a5d6ae4b3d5fdee013ca463462b7b296.pdf.
100. **Bouguéon, G., Vrignaus, S., Martin, L., Lagarce, F.,** *Traitement des angiofibromes de la sclérose tubéreuse de Bourneville par des préparations topiques à base de sirolimus : état des lieux de la préparation en France et revue de la littérature*. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie Volume 142, n° 125 pages 668-669 (décembre 2015)*. [En ligne]
<http://www.em-consulte.com/en/article/1018967>.

101. Code de la Santé Publique article L5121-1. [En ligne]
<http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI000026499732&cidTexte=LEGITEXT000006072665>.
102. ANSM Les préparations hospitalières. [En ligne]
<http://ansm.sante.fr/Activites/Preparations-hospitalieres/Preparations-hospitalieres/%28offset%29/0>.
103. Préparations semi-solides pour application cutanée. . *Pharmacopée Européenne 8ème édition* . P 870-872 : s.n., 01/2014.
104. **Harmonisation, International Conference on. Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.** 2015, 6-12. .
105. **Ricciutelli, M., Di Martino, P., Barboni, L., Martelli, S.,.** Evaluation of rapamycin chemical stability in volatile-organic solvents by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, Vol. 41, 1070–1074.
106. **SFPC, GERPAC.** *Guide méthodologique des études de stabilité des préparations.* 2013.
107. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques, chapitre 5.1.4; 2.6.12 et 2.6.13. *Pharmacopée Européenne V8.0.* 01.2014.
108. *Pharmacopée Européenne, 8ème édition. Diéthylèneglycol (éther monoéthylique de).* 01/2008 :1198. 2201-2202.
109. **Mura, P.,Faucci, M. T., Bramanti G., Corti, P.,.** Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000, Vol. 9, 365–372.
110. **Tashtoush, B.M., Jacobson, E.L., Jacobson, M.K.,.** A rapid HPLC method for simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, Vol. 43, 859–864.
111. **De Zana, M.M., Cámaraa, M.S., Roblesa, J.C., Kergaravat, S.V., Goicoecheab, H.C.,.** Development and validation of a simple stability-indicating high performance liquid chromatographic method for the determination of miconazole nitrate in bulk and cream formulations. *Talanta*. 2009, Vol. 79, 762–767.
112. **Shabir, G.H., Bradshaw, T.K.,.** Development and validation of a liquid chromatography method for the determination of methyl salicylate in a medicated cream formulation. *Turk J. Pharm. Sci.* 2011, Vol. 8 (2), 117-126.
113. **Camargo de Andrade, M.C., et al.** Sirolimus quantification by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Transplant International*. 2005, Vol. 18, 354–359.
114. **Oyler, A.R., Armstrong, B.L., Dunphy, R., Alquier, L., Maryanoff, C.A., Cohen, J.H., Merciadéz, M., Khublaj, I A., Mehta, R., Patel, A., Il'ichev, Y.V.,.** Mass balance in rapamycin autoxidation. *J Pharm Biomed Anal*. 2008, Vol. 15, 48 (5):1368-74.

115. Oyler, A.R., Segmuller, B.E., Sun, Y., Polshyna, A., Dunphy, R., Armstrong, B.L., Achord, P., Maryanoff, C.A., Alquier, L., Il'ichev, Y.V.,. Forced degradation studies of rapamycin: identification of autoxidation products. *J Pharm Biomed Anal.* 2012, 5(59): 194-200.

116. Ameli Les préparations magistrales et hospitalières . [En ligne]
http://www.ameli.fr/professionnels-de-sante/pharmaciens/exercer-au-quotidien/preparations-magistrales-et-officinales/les-nouvelles-regles-de-prise-en-charge_maine-et-loire.php.

Annexes

P343

Traitement des angiofibromes de la sclérose tubéreuse de Bourneville par des préparations topiques à base de sirolimus :  tat des lieux de la préparation en France et revue de la littérature.

Guillaume Bougu on¹, Sandy Vrignaud¹, Ludovic Martin², Frédéric Lagarce¹

¹Pharmacie, ²Dermatologie Vénéréologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France.

Introduction

Parmi les différentes affections dermatologiques associées à la Sclérose Tubéreuse de Bourneville (STB), les angiofibromes faciaux sont les plus défigurants. Présents chez 85% des patients, leurs répercussions sont autant physiques que psychologiques. Les moyens utilisés pour les traiter tels la chirurgie, la cryothérapie, l'électrocoagulation, la dermabrasion ou le laser ont montré leur efficacité dans certains cas. Mais ceux-ci présentent des aspects contraignants pour leur mise en œuvre, notamment chez les plus jeunes, et peuvent se compliquer ou engendrer des séquelles permanentes. Depuis la démonstration de l'efficacité du sirolimus par voie systémique sur les angiofibromes, des formes topiques de ce médicament ont été développées.



Photo 1: Angiofibromes chez un adolescent atteint de la Sclérose tubéreuse de Bourneville. CHU d'Angers.

Le but de l'étude qui a été menée est de faire le point sur l'état de la préparation topique de sirolimus en France et de comparer ces données à celles trouvées dans la littérature.

Matériel et Méthodes

Un questionnaire en ligne a été envoyé aux pharmaciens de 30 Centres Hospitaliers Universitaires (CHU) de France et de 20 Centres Hospitaliers membres de l'Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP) en  le de France, les interrogeant sur la réalisation de la forme topique, les modalités de préparation, de délivrance au patient, les études menées ainsi que celles à venir. Une revue de la littérature scientifique et médicale, des essais cliniques ainsi que des brevets déposés a également été menée.



Figure 1: PUI des CHU réalisant des préparations topiques à base de sirolimus (villes indiquées en rouge).

Résultats

Audit en France

- ✓ 10 PUI (Pharmacies à usage intérieur) de CHU réalisent régulièrement cette préparation (taux de réponse de 78%), la majorité depuis un an en moyenne (4 ans pour les plus précoces).
- ✓ 2 types de formulations majeures sont préparées: pommade à base de vaseline et crème à base de Dexeryl[®].
- ✓ 4 concentrations différentes sont réalisées: 0,1%, 0,2%, 0,33% et 1%.
- ✓ Stabilité allant de 1   3 mois, la majorité établie sans étude de stabilité physico-chimique.
- ✓ Equipements nécessaires pour garantir la sécurité du personnel à la PUI: hottes, isolateurs, zone à atmosphère contrôlée et habillage adéquat. Préparation non réalisable en pharmacie d'officine.
- ✓ Délivrance aux patients ambulatoires par le biais de la rétrocession hospitalière. (coût d'environ 110  pour un pot de 25g de crème à 0,1%).
- ✓ Principales causes de non réalisation: coût élevé de la préparation, manque de données de sécurité et d'efficacité à long terme ou absence de demande de la part des services.

Revue de la littérature

- ✓ 21 publications originales et 2 revues depuis 2010 (1^{re} publication sur le sujet). Petites séries de cas, peu d'effets indésirables observés. Une dizaine de formulations existantes dont plus de la moitié sont des pommades à base de vaseline.
- ✓ 3 essais cliniques menés sont enregistrés dont un est toujours ouvert depuis 2013.
- ✓ 2 brevets déposés.

Discussion

Les formes galéniques, les dosages et modalités de préparation varient d'un établissement à l'autre. Cette diversité est expliquée par le fait qu'à ce jour, très peu de données croisant doses/degrés d'étendue des lésions/formes galéniques utilisées et efficacité du traitement sont disponibles.

Conclusion

L'émergence d'un consensus en ce qui concerne la formulation (crème ou pommade, concentration en sirolimus...) serait une avancée pour la prise en charge des patients atteints de STB.

Mots-clés Sclérose tubéreuse de Bourneville, sirolimus, topique

**Evaluation de l'évolution des angiofibromes traités
par sirolimus topique 0,1% crème**

Nom : ___ Prénom : __

Age : __

Date de naissance :

Traitement par évérolimus (Votubia®) : O N

Date de début du traitement :

Date de la visite :

Angiofibromes	J0	M1	M3	M6	M12
Erythème	/3				
Taille	/3				
Surface	/3				
Sévérité FASI	/9				
Nombre d'AF					

Score FASI (Salido-Vallero et al. *Clin Exp Dermatol* 2014)

Consignes d'utilisation du FASI (Facial Angiofibroma Severity Index) :

L'évaluation des trois paramètres suivants ne portera que sur les joues.

Dans l'hypothèse selon laquelle le patient présente des lésions de grades de sévérité différents, le grade le plus élevé sera retenu.

Réaliser des photographies à chaque (ré)évaluation.

La sévérité des angiofibromes sera évaluée comme suit :

Score inférieur ou égale à 5 >> léger

Score entre 6 et 7 >> modéré

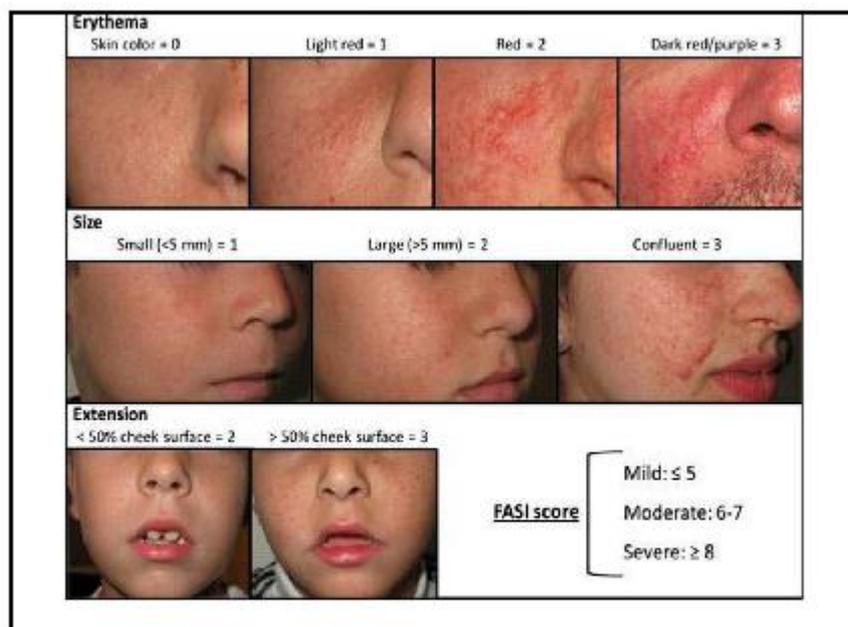
Score supérieur à 7 >> sévère

Les trois paramètres à évaluer seront :

L'érythème (couleur normale de la peau=0, rouge clair=1, rouge foncé=2, pourpre=3)

La taille des lésions (moins de 5 mm=1, plus de 5 mm=2 ou confluentes=3)

Le pourcentage de surface des joues atteintes (moins de 50%=2, plus=3)



Validation de la gamme étalon :

	Gamme n°			Moyenne	Ecart Type	CV %
	1	2	3			
Concentrations (%)	Aire moyenne	Aire moyenne	Aire moyenne			
0,06	2290929,76	2387320,24	2435625,35	2371291,78	73667,41	3,11
0,08	2950316,37	3232305,85	3188021,49	3123547,90	151648,11	4,85
0,1	4037216,79	3842637,20	4148888,11	4009580,70	154984,58	3,87
0,12	4757792,34	4801171,94	4864152,05	4807705,44	53480,01	1,11
0,14	5339341,19	5052537,66	5666156,67	5352678,51	307026,85	5,74

Gamme n°1					
Concentration	Echantillon	Aire du pic	Aire Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation %
0,06%	1	2349922,84	2290929,76	59301,12	2,59
	2	2291541,10			
	3	2231325,33			
0,08%	1	2884223,22	2950316,37	93469,49	3,17
	2	2909468,98			
	3	3057256,91			
0,10%	1	4024205,97	4037216,79	23461,02	0,58
	2	4023144,10			
	3	4064300,31			
0,12%	1	4722858,35	4757792,34	43374,28	0,91
	2	4744178,13			
	3	4806340,53			
0,14%	1	5343711,84	5339341,19	16144,73	0,30
	2	5352850,62			
	3	5321461,10			
Equation de la droite: $y = 4E+09x - 77030$					
Coefficient de corrélation $R^2 = 0,9895$					

Annexe 3 : résultats de la validation de la méthode de dosage HPLC

Gamme n°2					
Concentration	Echantillon	Aire du pic	Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation %
0,06%	1	2436017,92	2387320,24	45242,17	1,90
	2	2379349,93			
	3	2346592,87			
0,08%	1	3220467,13	3232305,85	16455,42	0,51
	2	3251096,28			
	3	3225354,13			
0,10%	1	3909952,30	3842637,20	129620,23	3,37
	2	3924750,60			
	3	3693208,70			
0,12%	1	4804819,98	4801171,94	47645,72	0,99
	2	4751807,06			
	3	4846888,78			
0,14%	1	5025898,52	5052537,66	24122,73	0,48
	2	5058809,32			
	3	5072905,14			
Equation de la droite: $y = 3E+09x + 413544$					
Coefficient de corrélation $R^2 = 0,9772$					

Gamme n°3					
Concentration	Echantillon	Aire du pic	Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation %
0,06%	1	2470633,96	2435625,35	30390,93	1,25
	2	2416021,90			
	3	2420220,20			
0,08%	1	3184918,12	3188021,49	2864,07	0,09
	2	3188583,39			
	3	3190562,97			
0,10%	1	4170105,69	4148888,11	38862,49	0,94
	2	4172523,36			
	3	4104035,29			
0,12%	1	4920056,28	4864152,05	104469,74	2,15
	2	4743625,83			
	3	4928774,03			
0,14%	1	5662628,50	5666156,67	9424,35	0,17
	2	5659005,47			
	3	5676836,05			
Equation de la droite: $y = 4E+09x - 8027,9$					
Coefficient de corrélation $R^2 = 0,9982$					

Validation de la fidélité ou précision :

Fidélité du	Moyenne	Ecart type	CV %
29 06	3303183,24	299294,7528	4,69
30 06	3403827,62	376363,7578	6,227821063
02 07	3769857,94	183805,0035	4,875648007

Fidélité n°1					
Concentration 0,10 %	Echantillon	Area	Moyenne échantillon Area	Ecart type échantillon Area	CV échantillon Area %
Echantillon 1	1	2781444,16	2766478,08	15008,28149	0,542504985
	2	2766562,12			
	3	2751427,95			
Echantillon 2	1	3473439,25	3465129,86	16380,75679	0,472731396
	2	3446259,71			
	3	3475690,63			
Echantillon 3	1	3607365,32	3604734,83	2871,858818	0,079669073
	2	3601670,88			
	3	3605168,28			
Echantillon 4	1	3383005,56	3394317,42	13791,95323	0,406324793
	2	3409681,56			
	3	3390265,14			
Echantillon 5	1	3186299,94	3163437,15	34126,1534	1,078768181
	2	3124210,72			
	3	3179800,79			
Echantillon 6	1	3490578,87	3425002,11	100290,6091	2,928191165
	2	3474875,52			
	3	3309551,93			

Fidélité n°2					
Concentration 0,10 %	Echantillon	Area	Moyenne échantillon Area	Ecart type échantillon Area	CV échantillon Area %
Echantillon 1	1	2867985,83	2749099,27	103676,43	3,771287235
	2	2701833,52			
	3	2677478,47			
Echantillon 2	1	3770319,15	3807879,32	51449,07574	1,351121489
	2	3866520,82			
	3	3786797,98			
Echantillon 3	1	3731171,79	3711656,28	22517,30584	0,606664631
	2	3687019,42			
	3	3716777,62			

Annexe 3 : résultats de la validation de la méthode de dosage HPLC

Echantillon 4	1	3466751,79	3466909,21	6651,227317	0,191848904
	2	3473637,75			
	3	3460338,09			
Echantillon 5	1	3284238,60	3271753,95	11615,47749	0,355022953
	2	3269756,57			
	3	3261266,69			
Echantillon 6	1	3460477,85	3415667,68	58544,17589	1,71398922
	2	3437097,03			
	3	3349428,17			

Fidélité n°3					
Concentration 0,10 %	Echantillon	Area	Moyenne échantillon Area	Ecart type échantillon Area	CV échantillon Area %
Echantillon 1	1	3474476,18	3483331,24	7762,949775	0,222859936
	2	3488964,71			
	3	3486552,84			
Echantillon 2	1	3723434,14	3731825,03	8580,507455	0,229927914
	2	3740583,35			
	3	3731457,59			
Echantillon 3	1	3760359,70	3671689,20	76961,81788	2,096087487
	2	3622227,72			
	3	3632480,18			
Echantillon 4	1	3901238,67	3844581,59	68988,22872	1,794427485
	2	3767757,10			
	3	3864749,00			
Echantillon 5	1	3903137,74	3874567,49	28052,62869	0,724019617
	2	3873501,87			
	3	3847062,85			
Echantillon 6	1	3994357,19	4013153,09	16464,81661	0,410271331
	2	4020076,03			
	3	4025026,06			

Validation de l'exactitude ou justesse

Aire mesurée	Concentration théorique
2371291,783	0,06
3123547,903	0,08
4009580,702	0,1
4807705,441	0,12
5352678,507	0,14

	Aire mesurée	Moyenne Aire	Concentration mesurée	Moyenne	Ecart %
0,08	Jour 1				
Echantillon 1	3215959,41	3210130,27	8,12E-02	0,085	5,835
	3176861,37				
	3237570,04				
Echantillon 2	3336142,15	3345070,6	8,47E-02		
	3360603,07				
	3338466,58				
Echantillon 3	3330734,22	3475246,01	8,81E-02		
	3310565,64				
	3784438,16				
0,1	Jour 1				
Echantillon 1	3783172,97	3759475,3	9,55E-02	0,100	0,137
	3728825,88				
	3766427,05				
Echantillon 2	4304361,56	4304552,76	1,10E-01		
	4309269,47				
	4300027,25				
Echantillon 3	3761462,57	3750838,16	9,53E-02		
	3742191,84				
	3748860,07				
0,12	Jour 1				
Echantillon 1	4341131,12	4392315,12	1,12E-01	0,121	0,923
	4438901,11				
	4396913,14				
Echantillon 2	5179354,94	5234551,17	1,34E-01		
	5289370,59				
	5234927,97				
Echantillon 3	4591105,59	4606959,16	1,18E-01		
	4636862,43				
	4592909,45				

Annexe 3 : résultats de la validation de la méthode de dosage HPLC

	Aire mesurée	Moyenne Aire	Concentration mesurée	Moyenne	Ecart %
0,08	Jour 2				
Echantillon 1	3251426,34	3250049,7	8,22E-02	0,079	-1,630
	3258098,02				
	3240624,74				
Echantillon 2	2893831,61	2909255,49	7,34E-02		
	2882630,57				
	2951304,3				
Echantillon 3	3214894,11	3182197,71	8,05E-02		
	3160788,7				
	3170910,32				
0,1	Jour 2				
Echantillon 1	4258545,67	4232730,32	1,08E-01		
	4189986,77				
	4249658,52				
Echantillon 2	3765360,87	3797779,88	9,65E-02		
	3802784,1				
	3825194,66				
Echantillon 3	3985033,52	3925160,39	9,98E-02		
	3880513,28				
	3909934,38				
0,12	Jour 2				
Echantillon 1	4854625,51	4894995,09	1,25E-01		
	4919524,9				
	4910834,85				
Echantillon 2	4409542,54	4415083,06	1,13E-01		
	4396508,24				
	4439198,41				
Echantillon 3	4380160,49	4416508,82	1,13E-01		
	4467991,49				
	4401374,48				

Annexe 3 : résultats de la validation de la méthode de dosage HPLC

	Aire mesurée	Moyenne Aire	Concentration mesurée	Moyenne	Ecart %
0,08	Jour 3				
Echantillon 1	2920653,94	2913441,38	7,35E-02	0,080338527	0,423
	2941514,87				
	2878155,33				
Echantillon 2	3288270,91	3284394,19	8,31E-02		
	3273388,3				
	3291523,35				
Echantillon 3	3353169,79	3333151,52	8,44E-02		
	3314028,77				
	3332255,99				
0,1	Jour 3				
Echantillon 1	3782433,23	3646299,54	9,25E-02	0,100572886	0,573
	3593662,08				
	3562803,3				
Echantillon 2	4012625,78	3922049,34	9,97E-02		
	3765179,04				
	3988343,2				
Echantillon 3	4296542,73	4296743,56	1,09E-01		
	4294036,1				
	4299651,86				
0,12	Jour 3				
Echantillon 1	4457738,62	4406623,82	1,12E-01	0,120358532	0,299
	4259839,92				
	4502292,91				
Echantillon 2	4635345,14	4667395,48	1,19E-01		
	4700044,08				
	4666797,21				
Echantillon 3	5044532,86	5073417,81	1,30E-01		
	5098691,63				
	5077028,95				

Annexe 4 : protocole de préparation PH n°177

	Signet_entite		
	<P_REF> Doc. lié en amont : PR, DO, DI ou FO	Version <P_REVISION >	<P_APPLICATION_DA TE>
	Sirolimus crème dosée à 0.1 % m/m		

Référence PH TNS N° : 177
Edition N° 1: 11/09/2015
Mise à jour : 26/11/2015

DÉNOMINATION : Sirolimus crème dosée à 0.1 % m/m							
INDICATION / PROPRIETES : traitement des manifestations cutanées de la sclérose tubéreuse de Bourneville							
SERVICE UTILISATEUR : dermatologie/ rétrocession							
LEGISLATION : liste I		DATE DE PRÉPARATION :		LIEU :		 - Habillage de protection - Manipulation sous isolateur	
FORMULE POUR : 13 tubes + 1.5 % pour dosage et pertes		N° ORDONNANCIER :		Salle préparations toxiques non stériles N° 1037			
Formule Unitaire 30 g	Matières premières ou spécialités (Fournisseur)	Qtés à mettre en oeuvre	N° lot	DLU	N° contrôle du labo	Qtés mises en oeuvre	Nombre théorique d'unités : 13
0.03 g	Sirolimus poudre (Fournisseur :	0.3959 g	DLU : 3 mois ou selon la DLU de(s) matière(s) première(s) ou de la spécialité CONSERVATION : Température ambiante
1.5 g	Transcutol P (Fournisseur :	19.7925 g	
QSP 30 g soit 28.47g	Excipient hydrocrème (Fournisseur :	QSP 395.85 g Soit 375.66 g	
TECHNIQUE PRÉPARATION ET CONDITIONNEMENT : Voir page suivante				PRÉPARATION EFFECTUÉE PAR :			
CONDITIONNEMENT : -tube aluminium 30 g Lot : DLU : -sachet zip liste I -notice				Nombre d'unités conditionnées :		CONDITIONNEMENT EFFECTUÉ PAR :	
				DLU :		Signature :	
Pharmacie CHU ANGERS Sirolimus crème dosée à 0.1 % m/m Voie cutanée Tube de 30g Réf. PH TNS N° : 177 N° Ord. : Date limite d'utilisation: Posologie : Se conformer à la prescription médicale A conserver à température ambiante A MANIPULER AVEC DES GANTS NE PAS AVALER RESPECTER LES DOSES PRESCRITES				ÉTIQUETTE			
				Coller l'étiquette complète de la préparation			
CONTRÔLES							
N° ordonnancier conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Pesées conformes : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Dosage conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Libération du lot <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Matières 1^{ère} conformes : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non				Conditionnement conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Visa du pharmacien responsable du laboratoire :	
DLU conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non				Étiquetage conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non			
N° lot conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non				Nombre de produits finis conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non			
N° contrôle du laboratoire conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
Date :		Date :		Date :		Date :	
Signature :		Signature :		Signature :		Signature :	

<P_REF>, version <P_REVISION> Error! Reference source not found. <P_APPLICATION_DATE>

1. OBJECTIFS ET DOMAINES D'APPLICATION

Ce document a pour but de décrire les modalités de préparation, de conditionnement et de contrôle de la préparation hospitalière toxique non stérile : Sirolimus crème dosée à 0.1% m/m

2. DESTINATAIRES

Secteur Préparatoire :

- Pharmacien responsable du préparatoire
- Préparateur du préparatoire

Secteur Laboratoire de contrôle :

- Pharmacien responsable du laboratoire
- Technicien du laboratoire
- Interne du laboratoire

3. DOCUMENTS LIES

- Elaboration d'une préparation (PHAR-91500-PR-0013)

4. REFERENCES : Bonnes Pratiques de Préparation 2007.

Mémoire de DES de Guillaume Bouguéon, 2015 et étude de stabilité réalisée par le labo de contrôle en 2015

5. ABREVIATIONS

DLU	Date Limite d'utilisation	PA	Principe Actif
MP	Matières Premières	PH	Préparation Hospitalière
TNS	Toxique Non Stérile	Réf.	Référence
N°	Numéro	SPTNS	Salle Préparation Toxique Non Stérile

6. MATÉRIEL

- Papier de pesée
- Mortier grande taille + pilon
- Fut jaune
- Champ stérile * 2
- 2 cupules plastique
- spatule
- flacon 30 ml VJ + bouchon
- mange-aiguille

7. DESCRIPTION DE L'ÉLABORATION DE LA PRÉPARATION, DU CONDITIONNEMENT ET DU CONTRÔLE

7.1. Création de dossier de lot par le préparateur du préparatoire

7.2. Nombre d'unités supplémentaires pour le contrôle

1 tube pour l'échantillonnage + 2 grammes de crème pour dosage

7.3. Préparation et conditionnement par le préparateur du préparatoire

7.3.1. Avant l'entrée en SPTNS N° 1039

Réunir tout le matériel nécessaire
Lavage hygiénique des mains
Habillage
Antiseptie des mains
Mettre une paire de gants non stériles

7.3.2. Dans la salle préparation N° 1039

- Poser la capsule porcelaine sur la balance. Faire la tare et imprimer le ticket de pesée.
- Peser l'hydrocrème dans une capsule porcelaine. Editer le ticket de pesée.
- Poser le flacon VJ sur la balance. Faire la tare et imprimer le ticket de pesée.
- Peser le transcutool dans le flacon VJ. Editer le ticket de pesée. Fermer le flacon avec le bouchon

<P_REF>, version <P_REVISION> Error! Reference source not found. <P_APPLICATION_DATE>

7.3.3. Mode opératoire dans l'isolateur poudre toxique non stérile – Salle N° 1037

- Mettre une paire de gants stériles sur les gants de l'isolateur
- Nettoyer le plan de travail de la hotte, les balances avec l'alcool isopropylique
- Changer de paire de gants stériles

- Faire la tare de la balance avec le papier de pesée. Imprimer le ticket
- Peser le sirolimus. Imprimer le ticket de pesée

- Introduire le sirolimus dans le transcutool. Agiter lentement. La solubilisation doit être totale.

- Introduire tout l'hydrocrème dans le mortier, puis procéder au mélange : ajouter progressivement à l'aide d'une pipette plastique à usage unique, et en mélangeant, le mélange sirolimus + transcutool dans le mortier.

- Après homogénéisation, peser 2 g de crème pour le contrôle (papier de pesée, cupule, papier aluminium) ; Recouvrir le mortier d'un papier d'aluminium et le sortir par le sas produit.

- Après utilisation, penser à inerte le flacon de transcutool avec de l'azote (bouteille).

7.3.4. Conditionnement dans la boîte « plexiglass » dédiée au toxique – Salle N° 1039

- Ménage selon DO
- Déployer un champ vert sous la boîte en plexiglass. Mettre 2 paires de gants nitriles, une combinaison, un masque FFP2 et des lunettes (habillage de la procédure dégradée pour produire du toxique).
- Poser le mortier emballé sur le champ.
- Poser le papier de pesée Cristal sur la balance, faire la tare, imprimer le ticket de pesée
- Peser 30 g de crème, faire valider par le contrôle, imprimer le ticket de pesée.
- Procéder à la mise en tube. Fermer le tube à l'aide de la pince à tube
- Répéter l'opération autant de fois que nécessaire pour conditionner toute la crème
- Lorsque les tubes sont terminés, emballer le mortier vide dans l'aluminium. Son nettoyage se fera dans l'isolateur toxique

7.3.5. Rangement et nettoyage dans l'isolateur

- Nettoyage du matériel avec éthanol.
- Elimination du matériel par le sas de sortie
- Soudage des MP ou du matériel sortant dans une gaine plastique avant rangement dans les stocks des MP
- Soudage des ustensiles nettoyés dans une gaine plastique avant rangement dans le meuble de la SPTNS
- Nettoyage de l'isolateur
- Rangement des matériels dans l'isolateur

7.3.6. Nettoyage de la SPTNS N° 1037

- selon DO

7.3.7. Elimination des déchets

Elimination des déchets par le sas de sortie dans la gaine plastique
Souder la gaine plastique : à déposer dans le seau jaune

<P_REF>, version <P_REVISION> Error! Reference source not found. <P_APPLICATION_DATE>

7.3.8. *Etiquetage*

- Voir modèle (page 1) :
 - 1 étiquette pour la fiche de fabrication
 - 1 étiquette par conditionnement pour les produits finis
 - 1 étiquette pour identifier la préparation en attente de la libération avec la pastille rouge

7.3.9. *Mise en quarantaine*

- Salle "Mise en quarantaine" N° 1038
- Identifier la préparation avec une étiquette type munie d'une pastille ROUGE

7.3.10. *Autres informations*

- Temps de fabrication :2h
- Temps de conditionnement :1h30

7.4. Contrôles par le laboratoire de contrôle

7.4.1. *Contrôles effectués avant la préparation*

- Contrôle de la conformité du N° ordonnancier
- Contrôle de la conformité des matières premières:
 - Libellé
 - N° de lot
 - DLU
 - N° de contrôle du laboratoire

7.4.2. *Contrôle pendant la préparation*

- Contrôle de la conformité de la pesée

7.4.3. *Contrôles effectués après la préparation*

- Contrôle de la conformité du dosage (teneur en sirolimus)
- Contrôle de la conformité du conditionnement et de l'étiquetage final
- Contrôle de la conformité du nombre de produits finis.

Tous les contrôles se rapportant aux vérifications doivent impérativement être cochés

7.5. *Mise en échantillothèque par le laboratoire de contrôle : 1 tube*

7.6. *Libération du lot de préparation par le laboratoire de contrôle*

- Après visa du pharmacien responsable du laboratoire de contrôle
 - + Les pastilles vertes apposées sur la fiche de fabrication

7.7. *Enregistrement informatique*

- Enregistrement de cette préparation dans le tableau Suivi de préparations (g/ pharmac/ production/ Suivi des préparations/ année en cours/ enregistrement.xls)

Si oui, cocher la case : Enregistrement par : Date :

8. DESCRIPTION DU PROCESSUS EN MODE DÉGRADÉ : néant

9. ÉVALUATION :

- Nombre de non-conformités
- Nombre de préparations enregistrées dans le tableau Suivi des préparations
- Fréquence de la préparation :

<P_REF>, version <P_REVISION> Error! Reference source not found. <P_APPLICATION_DATE>

10. COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

NOM Prénom	Fonction	Secteur d'activité	Rôle
BOUGUEON Guillaume	Interne	Labo contrôle	relecteur
LETOURNEUX Séverine	Préparateur	production	relecteur
BALDUINI Eulalie	Préparateur	production	relecteur
LAGARCE Frédéric	Pharmacien	Labo contrôle	relecteur
VRIGNAUD Sandy	Pharmacien	production	rédateur

Validation (Expertise)	Approbation (Responsabilité)
Nom : VRIGNAUD Sandy Fonction : pharmacien Secteur d'activité : production Visa :	Nom : LAGARCE Frédéric Fonction : pharmacien Secteur d'activité : Labo Contrôle Visa :
Vérification (Normes documentaires)	
Nom : ACT_PARTICIPANTS_NAME_SIGNI	Secteur d'activité : Cellule qualité Visa :

	PHARMACIE	
	Version n°1	Date d'application 29/10/2015

CONTROLES D'UNE PREPARATION HOSPITALIERE

PREPARATION HOSPITALIERE N°177

Crème au sirolimus 0.1%

(1mg de sirolimus/g de crème)

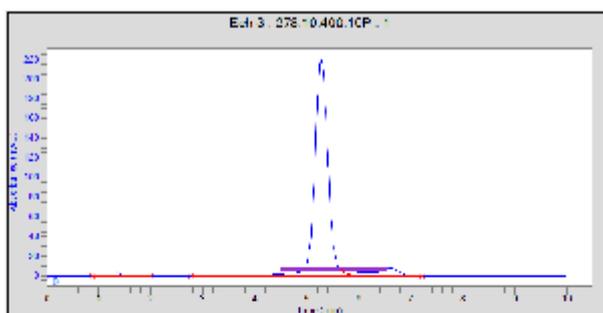
Dosage de la crème au sirolimus par HPLC

La crème au sirolimus 0.1% doit contenir entre 0.085%(0.85mg/g) et 0.115 % (1.15mg/g) de sirolimus.

Conditions chromatographiques :

- Colonne : SUPELCOSIL (LC-18), 15cm x 4.6mm, 5µm
- Phase mobile : Mélange Méthanol (80%)/Eau osmosée (20%) Voie A uniquement
- Température four : 50°C
- Débit : 1 ml/min
- Détection UV : 278nm
- Tr : 5 à 7 min. Runs de 10min.
- Volume injection : 20µl
- Pression : 1500-1700 psi environ

Exemple de Chromatogramme



Phase Mobile :

Sous la hotte, mesurer le volume de Méthanol nécessaire à l'éprouvette graduée. En faire de même pour l'eau osmosée. Transvaser le tout dans un flacon en verre d'un litre.

Equilibration de la colonne :

La colonne doit être équilibrée avec le mélange MeOH/H2O (voie A 100%) avec un débit de 1ml/min. La méthode peut ensuite être lancée

Solution de rinçage :

La colonne peut être rincée avec la phase mobile pendant 20 à 30min.

G:/pharmaci/assurance qualité/gestion documentaire/2 doc qual de travail/contrôle/document d'information PHDI/ Crème au sirolimus 0.1% (PH n°177).doc

Préparation de l'échantillon :

- Dans l'isolateur, tarer un bécher de 50 ml et peser à la balance un échantillon de 2g de crème (éviter d'en mettre sur les bords). Recouvrir le bécher d'un film de paraffine.
- Sous hotte, mesurer à l'éprouvette graduée 10ml de Méthanol. Verser le Méthanol dans le bécher et ajouter un petit barreau aimanté. Recouvrir le bécher d'un film de paraffine.
- Sous hotte, mettre le bécher sous agitation magnétique modérée (ex : puissance 3 à 4 /9 sur la plaque STUART ou 3 à 3.5/6 sur la plaque IKA) pendant 10min.
- Dans un tube à hémolyse, disposer 2ml de la solution à l'aide de la pipette à déplacement positif de 1000µl. Eviter autant que faire se peut de prélever les résidus de crème. Réaliser cette opération deux autres fois(*). Préparer un tube à hémolyse rempli avec 2ml d'eau. Mettre les 4 tubes à centrifuger pendant 10 min à 4000rpm/min.
- Retirer délicatement les tubes de la centrifugeuse, prélever 1ml du surnageant et le disposer dans un vial pour HPLC. Réaliser cette opération pour les 3 échantillons. Doser par HPLC en utilisant la méthode « Dosage préparation hospitalière ».

Préparation de la gamme d'étalonnage :

Principe : On prépare une crème à une certaine concentration. On prélève un échantillon puis on dilue cette crème pour obtenir la concentration suivante. L'opération est répétée pour obtenir un échantillon de chaque concentration de la gamme.

Mode opératoire :

- Dans l'isolateur des cytostatiques, faire la tare d'un flacon en verre de 10ml et y déposer 500mg de Transcutol à l'aide d'une pipette pasteur en plastique. Sur un papier de pesée, peser 14mg de poudre de sirolimus. Incorporer délicatement la poudre dans le flacon de Transcutol. La solubilisation du sirolimus dans le Transcutol est rapide et ne nécessite peu d'agitation.
- Toujours dans l'isolateur, peser sur un papier de pesée 9.5g d'Excipial Hydrocrème.
- Disposer dans un mortier les 9,5g d'Excipial Hydrocrème. Verser le flacon contenant le sirolimus solubilisé dans l'Excipial sur la crème. A l'aide d'un pilon, incorporer délicatement le sirolimus à la crème. S'aider d'une carte si besoin. On obtient ainsi les 10g de crème à 0.14%. Peser un échantillon de 2g de cette crème dans un bécher de 50ml. Sortir le mortier et l'échantillon.
- La suite de la préparation peut être réalisée sur paillasse. Dans la salle de préparation 1040, peser les 4 quantités de crème nécessaires pour la préparation de la gamme (cf tableau ci-dessous, ligne n°4).
- Ajouter dans le mortier la quantité d'Excipial nécessaire pour réaliser la dilution (ajouter les 1,33g d'Excipial pour diluer la crème de 0,14 à 0,12%). Répéter les opérations successives d'échantillonnage et de dilution pour obtenir les 5 échantillons de crème de la gamme.

G:/pharmaci/assurance qualité/gestion documentaire/2 doc qual de travail/contrôle/document d'information PHDI/ Crème au sirolimus 0.1% (PH n°177).doc

Annexe 5 : protocole de contrôle PH n°177

Tableau récapitulatif :

(Le tableau se lit par colonne, de la ligne 1 à la ligne 4, puis repart à la ligne 1 pour la colonne adjacente).

Etapes à réaliser dans l'ordre	0.14%	0.12%	0.1%	0.08%	0.06%
1 : Poids de la crème	10g	9.33g	8.80 g	8.25g	8.35g
2 : Echantillon à prélever pour dosage	2g	2g	2g	2g	2g
3 : (Poids-Aliquote) = Poids restant (PR)	8g	7.33g	6.6g	6.25g	6.35g
4 : Quantité d'Excipient à ajouter (x) pour diluer la crème. Ex : $1.33 = (8 * (0.14/0.12)) - 8$	1.33g	1.466g	1.65g	2.10	

Réaliser sur chaque échantillon la manipulation d'extraction et de dosage décrite plus haut, soit :

- Mesurer à l'éprouvette graduée 10ml de Méthanol. Verser le Méthanol dans le bécher et ajouter un petit barreau aimanté. Recouvrir le bécher d'un film de paraffine. Sous hotte, mettre le bécher sous agitation magnétique modérée (ex : puissance 3-4 /9 sur la plaque STUART ou 3-3.5/6 sur la plaque IKA) pendant 10min.
- Dans un tube à hémolyse, disposer 2ml de la solution à l'aide la pipette à déplacement positif de 1000µl. Eviter autant que faire se peut de prélever les résidus de crème. Préparer un tube à hémolyse rempli avec 2ml d'eau distillée. Mettre les 2 tubes à centrifuger pendant 10 min à 4000rpm/min.
- Retirer délicatement les tubes de la centrifugeuse, prélever 1ml du surnageant et le disposer dans un vial pour HPLC. Doser par HPLC en utilisant la méthode « Gamme étalon préparation hospitalière ».

Vérification du conditionnement, du nombre conditionné et de l'étiquetage.

Références bibliographiques: Thèse et article en cours de publication au moment de la rédaction du présent protocole.

- Thèse de Guillaume Bouguéon. Mise au point d'une formulation topique de sirolimus pour le traitement des angiofibromes de la sclérose tubéreuse de Bourneville. 2016.
- G.Bouguéon et al. Formulation and characterization of a 0.1 % rapamycin cream for the treatment of Tuberous Sclerosis Complex cutaneous injuries. IJP 2016.

Document réalisé par G. BOUGUEON, interne en pharmacie

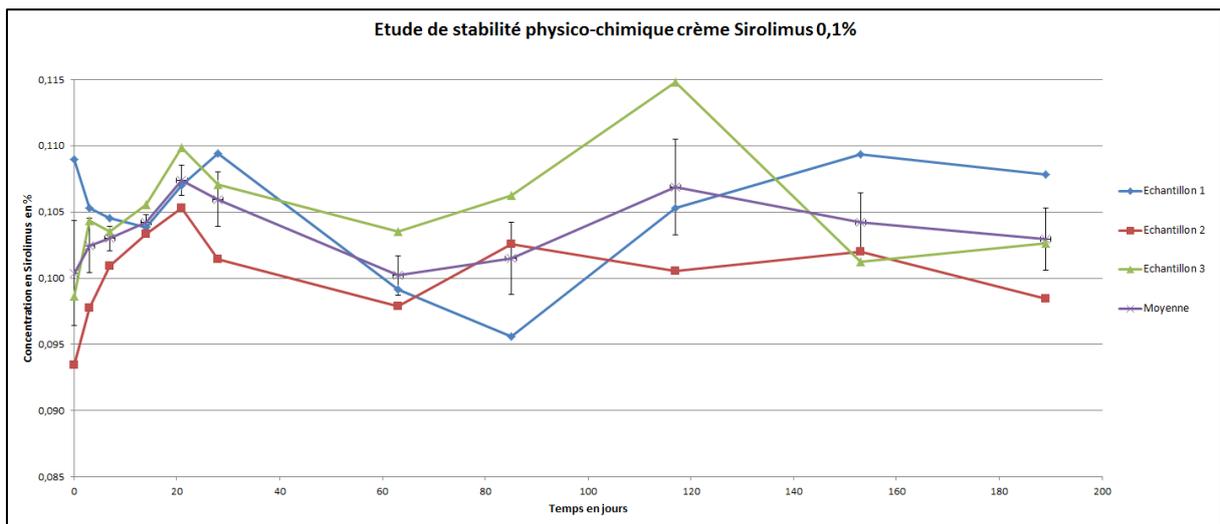
Validation (Expertise)	Approbation (Responsabilité)
Nom :	Nom :
Fonction :	Fonction :
Secteur d'activité	Secteur d'activité
Visa	Visa

G:/pharmaci/assurance qualité/gestion documentaire/2 doc qual de travail/contrôle/document d'information PHDI/ Crème au sirolimus 0.1% (PH n°177).doc

Annexe 6 : résultats de l'étude de stabilité physico-chimique

$y = (2,6007E-08)*x - 0,0022856$

Jour		Concentration moyenne des échantillons			Moyenne	Ecart type	Pourcentage par rapport à la concentration initiale	IC 95% basse	IC 95% haute
		Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3					
13/07/2015	0	0,109	0,093	0,099	0,100	0,791	100,0	99,1	100,9
16/07/2015	3	0,105	0,098	0,104	0,102	0,411	102,1	101,6	102,6
20/07/2015	7	0,105	0,101	0,104	0,103	0,187	102,6	102,4	102,8
27/07/2015	14	0,104	0,103	0,106	0,104	0,117	103,8	103,7	104,0
03/08/2015	21	0,107	0,105	0,110	0,107	0,229	107,0	106,7	107,3
10/08/2015	28	0,109	0,101	0,107	0,106	0,411	105,6	105,1	106,0
14/09/2015	63	0,099	0,098	0,104	0,100	0,297	99,8	99,5	100,2
06/10/2015	85	0,096	0,103	0,106	0,101	0,542	101,1	100,5	101,7
07/11/2015	117	0,105	0,101	0,115	0,107	0,726	106,5	105,6	107,3
13/12/2015	153	0,109	0,102	0,101	0,104	0,450	103,8	103,3	104,3
18/01/2016	189	0,108	0,098	0,103	0,103	0,470	102,6	102,1	103,1





SIROLIMUS 0.1% crème

Veuillez lire attentivement l'intégralité de cette notice avant de prendre ce médicament.

- Gardez cette notice, vous pourriez avoir besoin de la relire.
- Si vous avez toute autre question, si vous avez un doute, demandez plus d'informations à votre médecin ou à votre pharmacien.
- Ce médicament vous a été personnellement prescrit. Ne le donnez jamais à quelqu'un d'autre, même en cas de symptômes identiques, cela pourrait lui être nocif.
- Si l'un des effets indésirables devient grave ou si vous remarquez un effet indésirable non mentionné dans cette notice, parlez-en à votre médecin ou à votre pharmacien.

1. QU'EST-CE QUE SIROLIMUS 0.1% crème ET DANS QUELS CAS EST-IL UTILISÉ ?

Inhibiteur de mTOR (mammalian target of rapamycin) ANTINEOPLASIQUE ET IMMUNOSUPPRESSEUR.

Ce médicament est indiqué dans le traitement des angiofibromes faciaux de la sclérose tubéreuse de Bourneville.

2. QUELLES SONT LES INFORMATIONS A CONNAITRE AVANT DE PRENDRE SIROLIMUS 0.1% crème ?

Contre-indications

Ne prenez jamais SIROLIMUS 0.1% crème dans les cas suivants:

- en cas d'allaitement,
- en cas d'allergie à l'un des constituants du médicament,

Ce médicament NE DOIT GÉNÉRALEMENT PAS ÊTRE UTILISÉ, sauf avis contraire de votre médecin:

- en cas de grossesse,
- en cas de déficit immunitaire

EN CAS DE DOUTE, IL EST INDISPENSABLE DE DEMANDER L'AVIS DE VOTRE MÉDECIN OU DE VOTRE PHARMACIEN

Précautions d'emploi : mises en garde spéciales

Mises en garde

La sécurité d'utilisation de **SIROLIMUS 0.1% crème** pendant une longue période n'est pas connue.

Précautions d'emploi

Le port de gants est fortement recommandé. **Les femmes enceintes ne doivent pas manipuler ce médicament.**

Se laver les mains au savon et à l'eau claire en cas de contact.

Il convient de réduire l'exposition de la peau au soleil et d'utiliser un écran solaire.

Éviter tout contact avec les yeux et les muqueuses. En cas de contact accidentel, essuyer et soigneusement rincer la zone à l'eau.

EN CAS DE DOUTE NE PAS HESITER A DEMANDER L'AVIS DE VOTRE MÉDECIN OU DE VOTRE PHARMACIEN.

Interactions avec d'autres médicaments

Prise ou utilisation d'autres médicaments: AFIN D'ÉVITER D'ÉVENTUELLES INTERACTIONS ENTRE PLUSIEURS MÉDICAMENTS, IL FAUT SIGNALER SYSTÉMATIQUEMENT TOUT AUTRE TRAITEMENT EN COURS À VOTRE MÉDECIN OU À VOTRE PHARMACIEN, Y COMPRIS UN MÉDICAMENT OBTENU SANS ORDONNANCE

Vous pouvez utiliser des crèmes et des lotions hydratantes sur le visage pendant votre traitement par **SIROLIMUS 0.1% crème** mais vous ne devez pas utiliser ces produits dans les 2 heures qui suivent ou qui précèdent l'application de **SIROLIMUS 0.1% crème**.

Utilisation pendant la grossesse et l'allaitement
Ce médicament est déconseillé pendant la grossesse.

En cas de grossesse ou de désir de grossesse, prévenez votre médecin.

Ce médicament est contre-indiqué pendant l'allaitement.

Demandez conseil à votre médecin ou à votre pharmacien avant de prendre tout médicament.

Consommation d'alcool

Au cours de l'utilisation de **SIROLIMUS 0.1% crème**, la consommation d'alcool peut provoquer des rougeurs et des sensations de chaleur au niveau de la peau et du visage

Liste des excipients à effet notoire : aucun des excipients de cette crème n'entre dans cette catégorie.

3. COMMENT PRENDRE SIROLIMUS 0.1% crème ?

Posologie, Mode et/ou voie(s) d'administration, Fréquence d'administration et Durée du traitement

Respectez toujours la posologie indiquée par votre médecin. En cas d'incertitude, consultez votre médecin ou votre pharmacien.

Posologie

Ce médicament doit être utilisé en suivant rigoureusement les indications de votre dermatologue. Si vous avez l'impression que l'effet de **SIROLIMUS 0.1% crème** est trop fort ou trop faible, consultez votre médecin ou votre pharmacien.

Mode et voie d'administration

Voie cutanée.

- Appliquer la crème sur les angiofibromes faciaux après lavage et séchage de la peau.
- Faire suivre l'application d'un massage doux et régulier jusqu'à pénétration complète.
- Eviter les yeux, les paupières, les lèvres, les narines. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement à l'eau claire.

Ne pas appliquer sur une peau lésée ou infectée.

Ne pas couvrir la zone traitée avec des bandages ou des pansements.

Réserver à l'usage externe uniquement, ne pas avaler.
Après application, lavez-vous soigneusement les mains.

Fréquence d'administration : Se conformer à la prescription de votre dermatologue.

Durée du traitement

Se conformer aux indications du dermatologue.

Symptômes et instructions en cas de surdosage

Si vous avez pris plus de SIROLIMUS 0.1%, crème que vous n'auriez dû: prévenez immédiatement votre dermatologue.

Instructions en cas d'omission d'une ou de plusieurs doses

Si vous oubliez de prendre SIROLIMUS 0.1%, crème:

N'appliquez pas de dose double pour compenser la dose que vous avez oubliée de prendre. Informez votre dermatologue.

4. QUELS SONT LES EFFETS INDESIRABLES EVENTUELS ?**Description des effets indésirables**

Comme tous les médicaments, SIROLIMUS 0.1% crème est susceptible de provoquer des effets indésirables, mais ils ne surviennent pas systématiquement chez tous les patients traités.

Les effets indésirables de SIROLIMUS 0.1% crème ne sont pas connus à ce jour.

Sont susceptibles de survenir (cf notice protopiq® tacrolimus) :

- Une rougeur de la peau
- Une sensation de chaleur au point d'application
- Des irritations et démangeaisons
- Une infection cutanée locale
- Un œdème au site d'application

Si vous remarquez des effets indésirables non mentionnés dans cette notice, veuillez en informer votre dermatologue ou votre pharmacien.

5. COMMENT CONSERVER SIROLIMUS 0.1% crème ?

Tenir hors de la portée et de la vue des enfants.

Ne pas utiliser SIROLIMUS 0.1% crème après la date de péremption mentionnée sur le tube.

Conditions de conservation

Fermer le tube après utilisation. Conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Les médicaments ne doivent pas être jetés au tout à l'égout ou avec les ordures ménagères. Demandez à votre pharmacien ce qu'il faut faire des médicaments inutilisés. Ces mesures permettront de protéger l'environnement.

6. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES**Que contient SIROLIMUS 0.1%, crème ?****La substance active est :**

Sirolimus30 mg

Pour un tube de 30g

Les autres composants sont :

Transcutol®1.5 g

Excipient Hydrocrème®28.5 g

Excipient Hydrocrème® contient les excipients suivants :

Aqua, Paraffinum Liquidum, Isopropyl Myristate, Cetearyl Alcohol, Glyceryl Stearate, Pentylene Glycol, Polysorbate 20.

Ce médicament se présente sous la forme d'une crème en tube de 30g.

Document élaboré à partir de la notice de la spécialité RAPAMUNE 1mg comprimé et PROTOPIC 0.1% pommade.

La dernière date à laquelle cette notice a été approuvée est :

28/10/2015 G. Bougignon et S. Vignaud, service pharmacie et L. Martin, service dermatologie, CHU Angers

Formulation and characterization of a 0.1% rapamycin cream for the treatment of Tuberous Sclerosis Complex-related angiofibromas

Guillaume Bouguéon (1), Frédéric Lagarce (1,2), Ludovic Martin (3), Hélène Pailhoriès (4), Guillaume Bastiat (2), Sandy Vrignaud (1)*

(1) Pharmacie Centrale, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers cedex, France

(2) L'Université Nantes Angers Le Mans, INSERM U1066, Micro et nanomédecines biomimétiques, Angers, France

(3) Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers cedex, France

(4) Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé – PBH, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers cedex, France

*Corresponding Author: Sandy Vrignaud

CHU Angers - Service Pharmacie

4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9

Phone number : +33 2 41 35 35 44

Fax number : +33 2 41 35 40 84

savrignaud@chu-angers.fr; sandy-vrignaud@hotmail.fr

Article category : research report

The authors confirm they have no conflicts of interest with regard to the content of this article.

Abstract

Medicines for the treatment of rare diseases frequently do not attract the interest of the pharmaceutical industry and hospital pharmacists are thus often requested by physicians to prepare personalized medicines. Tuberous Sclerosis Complex (TSC) is a rare disease that causes disfiguring lesions named facial angiofibromas. Various topical formulations of rapamycin (= sirolimus) have been proved effective in treating these changes in small case series. The present study provides for the first time characterization of a 0.1% rapamycin cream formulation presenting satisfactory rapamycin solubilisation. The first step of the formulation is solubilisation of rapamycin in Transcutol®, and the second step is the incorporation of the mixture in an oil-in-water cream.

A HPLC stability-indicating method was developed. Rapamycin concentration in the cream was tested by HPLC and confirmed that it remained above 95% of the initial concentration for at least 85 days, without characteristic degradation peaks. The preparation met European Pharmacopeia microbial specifications throughout storage in aluminum tubes, including when patient use was simulated. Odour, appearance and colour of the preparation were assessed and no change was evidenced during storage. The rheological properties of the cream also remained stable throughout storage.

To conclude, we report preparation of a novel cream formulation presenting satisfactory rapamycin solubilisation for the treatment of TSC cutaneous manifestations, with stability data. The cream is currently being used by our patients. Efficacy and tolerance will be reported later.

Keywords: rapamycin, sirolimus, tuberous sclerosis, m-Tor inhibitor, topic formulation, stability study

1. Introduction

Tuberous sclerosis complex (TSC), also known as Bourneville's disease, is a rare genetic autosomal dominant disorder with an estimated frequency of between 1/6000 and 1/10,000 live births (Northrup et al., 2013). TSC is the result of mutations occurring on tumour-suppressor genes leading to a loss of inhibition of mTOR complex. Angiofibromas, one of the skin manifestations of TSC, affect about 75% of children with TSC at the age of 10 years (Jacks et al., 2015). Angiofibromas develop over time, are very disfiguring, affecting the patient both physically and psychologically.

After observation of systemic rapamycin effects on angiofibromas (Bissler et al., 2008; Hofbauer et al., 2008), topical sirolimus was tested on mouse models (Rauktys et al., 2008) and rapidly formulated for humans (Haemel et al., 2010). From then on, several topical forms have been developed using mTOR inhibitors, namely rapamycin and everolimus (Madke et al., 2013; Balestri et al., 2015).

For the last five years, more than ten formulations have been reported in different pharmaceutical forms (ointment, creams, solutions, etc) at different concentrations (0.003% -1%) from crushed tablets to oral solution, which are not optimal for their tolerance and efficacy. However, all authors described patient improvement, with minimal side effects (except with the solutions), inconsistent percutaneous absorption and systemic diffusion, but recorded a recurrence shortly after stopping treatment (Madke et al., 2013; Balestri et al., 2015; Bouguéon et al., 2015).

We therefore decided to develop a topical treatment and focused our researches on three aspects. First, we wanted to offer a formulation containing rapamycin in its solubilized form, in order to obtain immediate bioavailability of the active molecule and thus allowing dose optimization and avoid the risk of bleeding attributed to crushed tablets (Tu et al., 2014). Secondly, we wanted to offer the patient a appealing topical treatment to apply of good appearance in order to improve patient observance and compliance with treatment. Indeed, some patients had reported that ointment was difficult to apply or rough (Park et al., 2014) and sometimes parents decided to reduce the frequency to avoid sending children to school with an oily skin. Thirdly, we wanted to characterize our formulation and assess its stability over time to ensure its efficacy in use by the patients.

Then a cream formulation was therefore developed. A stability indicating method was designed and a stability study was performed.

2. Materials and methods

Materials

Rapamycin powder, polysorbate 80, and sorbitan trioleate were provided by Inresa, (Bartenheim, France). Transcutol® P, olive oil, castor oil, liquid paraffin and sweet almond oil were provided by COOPER (Melun, France). Excipial hydrocreme® was provided by Galderma (laboratoires Spirig SAS, Toulouse, France). All excipients were of Pharmacopeia grade.

Methanol (Hipersolv Chromanorm, VWR, Fontenay sous Bois France), was used for HPLC. Water was obtained from a Prima reverse osmosis system (Elga Labwater, Antony, France). All reagents and solvents were of analytical grade.

Rapamycin solubilisation in various oils and surfactants

Rapamycin powder (10mg) was incubated with QS 500mg of oils, solvents or surfactants ([Table 1](#)). Mixing was performed under stirring for 60 minutes at room temperature.

Cream storage

The cream was packaged in 30ml aluminum tubes (COOPER, Melun, France) and stored in climatic chamber qualified according to ICH (International Consensus on Harmonization, 2015) at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under $60 \pm 5\%$ relative humidity.

Sample preparation: rapamycin extraction and recovery

An aliquot of cream (2g) was introduced in an Erlenmeyer flask with 10ml of methanol and maintained under stirring for 10 minutes. All experiments were performed in triplicate. The resulting solution was centrifuged at 900xg for 10 minutes and the supernatant was removed and analyzed for rapamycin content compared to rapamycin in methanol.

Chromatographic conditions

A high pressure liquid chromatography (HPLC) method was developed, based on Ricciutelli's publication (Ricciutelli et al., 2006). The system was characterized by a Perkin Elmer Series 200 pump, injector and oven. The detector was a diode array detector (Flexar PDA detector, Perkin Elmer, Waltham, USA) operating between 190 to 700nm. Chromera software (v4.1.0) (Perkin Elmer, Waltham, USA) was used to quantify the peaks of the

chromatograms. The mobile phase consisted of a mixture of methanol and water (80:20 v:v). The flow rate was set at 1ml/minute. A C18 Supelcosil column (150mm x 4.6mm, 5µm) (Supelco® Analytical, Sigma-Aldrich®, Bellefonte, USA) was used and maintained at 50°C. The sample injection volume was 0.01ml and the analysis time was 10 minutes. Rapamycin detection and quantification were processed at 278nm.

Method validation

The method was validated according to ICHQ2R1 (International Consensus on Harmonization, 2015).

A standard curve was established with five different rapamycin concentrations in cream: 0.06%, 0.08%, 0.1%, 0.12% and 0.14%. Extraction followed by rapamycin determination was then performed. The linearity of the method was evaluated on three different standard curves.

The repeatability of the method was evaluated by preparing six cream samples concentrated at 0.1% rapamycin on three different days. Each sample underwent rapamycin extraction and determination.

The accuracy of the method was established using three concentration levels (0.08, 0.1 and 0.12%) in triplicate on three different days. Each sample underwent rapamycin extraction and determination.

Forced degradation

Sensitivity to heat: a 2g sample of cream was heated at 90°C for 60 minutes (n=3). Then the sample was subjected to the same extraction method as for rapamycin determination in cream.

Sensitivity to oxidation: A 1g sample of cream was mixed with 1ml of H₂O₂ for one minute (n=3). Sample was then subjected to the same extraction method as for rapamycin determination in cream, showing that rapamycin is likely to autoxidate as previously published by Oyler et al. (Oyler et al., 2012).

Physico chemical stability

Rapamycin determination in the cream was assessed at day 0, 3, 7, 14, 21, 28, 63 and 85 (n=3 for each day) and mean concentration was expressed with as 95% confidence interval

of the mean. The mean and confidence interval were considered acceptable if greater than 95% of the initial concentration, without the existence of characteristic degradation peaks.

Organoleptic appreciation

Odour, appearance and colour of the preparation were assessed at days 0, 3, 7, 14, 21, 28, 63 and 85 (n=3 for each day). Odour was measured as described in the European Pharmacopeia, i.e. by spreading 1.5g of cream on a 6cm watch glass and smelling the cream after 15 minutes.

Rheological measurements

The non-steady flow property of the creams were studied using a Kinexus® rheometer (Malvern Instruments S.A., United Kingdom), with a cone plate geometry (diameter 50 mm, angle: 2°) and with controlled shear rates ranging from 0.5 to 50 s⁻¹ at room temperature. Two cycles of increasing and decreasing shear rate were performed.

The evolution of viscosity profiles were studied directly after the formulation process and after 28 and 84 days incubation at room temperature in triplicate, and then compared to the cream used as the main ingredient: Excipial Hydrocrème®. Viscosity results were expressed as mean and standard deviation.

Microbiological study

Three conditions were studied (each in triplicate):

- Sample days the same as those for a patient using a medication at home, i.e. opened and removed each day then tested at days 7, 14, 21 and 28.
- Analysis after 28 and 85 days (85 days corresponding to the physicochemical stability of the cream).
- Positive control: cream either containing rapamycin or not was artificially infected with *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* at day 0 and analyzed after 7 days. Infected rapamycin formulations were used as controls to ensure rapamycin did not inhibit microbiological growth.

To perform analysis, 1g of cream was diluted in 5ml of injectable water. Then 0.4ml was plated on sheep's blood agar plate (n=5) (Thermo Fisher Scientific, United Kingdom), and incubated at 37°C.

According to the European Pharmacopoeia monograph for non-sterile products, the formulation meets microbial requirements if the total aerobic microbial counts are less than 10^2 cfu/ml or cfu/g, the total combined yeast/mould counts are less than 10^2 cfu/ml or cfu/g and there is no *Staphylococcus aureus* and no *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Results and discussion

The absence of commercially available medicines for the treatment of main rare disease is likely to lead the development of a preparation in a hospital pharmacy. Designing a suitable cream for patients includes the choice of an appealing formulation, study of the drug's physicochemical stability in the cream, and the ensuring satisfactory microbial quality.

Solubility of rapamycin in various oils, solvents and surfactants

Facial angiofibromas appear during infancy, between 2 and 5 years of age, and grow up progressively to teenage years. In view of children's and adolescent's acne-prone skin, an oil-in-water emulsion basis appeared to be the best compromise for TSC patient treatment. However rapamycin is poorly soluble in water. Therefore that the first step in making a compound was the solubilization of rapamycin in appropriate solvent prior to topic formulation. Solubilization of the drug in the formulation is important both to allow its diffusion through the skin and also for ease of application of the cream. Different ingredients were selected to prepare a safe formulation for topical application (listed in [Table 1](#)).

Different reports indicate that rapamycin is easily incorporated in liquid paraffin prior to topical formulation (Madke et al., 2013; Balestri et al., 2015). We therefore first tested rapamycin solubility in liquid paraffin, and observed less than 2mg/ml solubility.

We then assessed different safe ingredients usable for topical application. [Table 1](#) shows rapamycin solubility in three ingredients. The best candidate was Transcutol® that solubilizes rapamycin extemporaneously, whereas the drug was only slightly soluble in other ingredients. Transcutol®, i.e. diethylene glycol monoethyl ether, is already used in marketed medicines. Furthermore Transcutol® has been shown to be a drug penetration enhancer in the skin (Mura et al., 2000). This property appeared very interesting to exploit, as it could improve treatment of angiofibromas. The rest of the study was therefore performed with Transcutol®.

Because Rapamycin is solubilized in a solvent which is then incorporated in an emulsion (the cream excipient), its level of solubility should be higher than 1% (i.e 10mg/ml) in order to obtain a final concentration of 0.1% active drug while adding less than 10% of solvent in the cream, which is important to maintain the stability of a cream which is an emulsion. The solubility of rapamycin in Transcutol® allowed use of only 5% of this excipient in the final formulation as explained below.

oil / surfactant / solvent tested	Rapamycin solubility
Virgin olive oil	< 2mg/ml
Castor oil	< 2mg/ml
Sweet almond oil	< 2mg/ml
Liquid paraffin	< 2mg/ml
Sorbitan trioleate (Span® 85)	< 2mg/ml
Polysorbate 80 (Tween® 80)	< 2mg/ml
Diethylene glycol monoethyl ether P (Transcutol®)	Fully soluble (20.2mg/ml)

Table 1: Rapamycin solubility in different solvents, oils and surfactants.

Formulation of rapamycin cream

The cream was compounded by first solubilizing rapamycin in Transcutol®. This mixture was then progressively added to Excipial Hydrocreme® under manual stirring for several minutes. The formulation is presented in [Table 2](#). The rapamycin dosage in the cream was 0.1% (w/w), which is in the low range of the previously published formulations but here the active drug was solubilized and a much higher level of activity was therefore expected. As explained above, the high level of solubility of rapamycin in Transcutol® would allow a dosage of 0.4% if needed without affecting the appearance of the cream aspects or physical stability.

Because of rapamycin toxicity, preparation was performed in a low pressurized glove-box to protect the pharmacy technician. Excipial hydrocreme® was selected from various commercially available formulations as it is an oil-in-water emulsion composed of safe ingredients is non-comedogenic, and not unpleasant to use. The final cream has a slight oil

odour, a homogeneous appearance and is white in colour. These characteristics remained constant throughout the study.

Component	Quantity
Rapamycin	0.03g
Transcutol®	1.5g
Excipial Hydrocreme®	QS 30g

Table 2 : Composition of rapamycin cream

Stability study

Once the cream had been prepared, a stability study was performed. The physico-chemical stability study of rapamycin requires drug extraction and HPLC method validation to determine rapamycin concentration. Drug recovery after rapamycin extraction by methanol from the cream was $64.2\% \pm 1.2\%$. This method did not detect the totality of rapamycin in the cream. Nevertheless, such extraction was repeatable and allowed detection of degradation products, as shown in [fig. 1b](#) and [fig. 1c](#).

Figures 1(a), 1(b) and 1(c) about there

A well-defined and symmetric peak of rapamycin was obtained using the HPLC method ([Fig. 1 a](#)). The correlation coefficient, ($r^2=0.994$) indicated the linearity in the interval range of [0.06% - 0.14%]. Forced degradation was obtained by heating ([Fig. 1b](#)) and oxidation ([Fig. 1c](#)) methods, and permitted validation of the method as indicating stability, as it allowed detection of degradation products at retention times between 1 and 2 minutes. Heat was chosen as a non-specific degradation process as many degradation pathways follow Arrhenius' law and are thus governed by temperature. Oxidation was chosen because autoxidation of rapamycin has already been described (Oyler et al., 2008).

Repeatability, assessed at 18 determinations of the test concentration (0.1%) (6 replicates/3 different days), was systematically lower than a coefficient of variation of 7%. Accuracy, assessed at three concentrations (0.08-0.1 and 0.12 %), on three days (9 determinations), was systematically higher than 95% of the expected value. Rapamycin was eluted in 6 minutes, as shown in [Fig.1a](#).

Table 3: Sirolimus concentration in the cream expressed as 95% confidence interval (n=3) relative to concentration on day 0.

Time (days)	3	7	14	21	28	63	85
IC95 (% compared to day 0)	101.5-102.5	102.8-103.2	103.9-104.1	106.7-107.3	105.5-106.5	99.7-100.3	100.4-101.6

The evolution of the rapamycin concentration in the preparation is indicated in [Table 3](#). The mean percentage and the 95% confidence interval around the mean were systematically higher than 95% of the initial concentration, indicating that rapamycin was stable in the cream. Furthermore, no degradation products were detected on chromatograms throughout the study.

Rheological properties of the cream

Viscosity of initial and formulated creams decreased when shear rate increased and vice versa, showing the rheofluidifiant properties for the formulations. Similar flow profiles were observed for the creams, without thixotropic behaviour ([Fig. 2](#)). In addition, the low standard deviations for the 3 independent formulated creams proved the repeatability of the formulation process. Finally, the flow profiles over the time for the 3 independent formulated creams remained unchanged, showing the time stability of the formulated creams ([Fig. 3](#)). Wilcoxon (for figure 2 data) and Kruskal-Wallis (for figure 3 data) statistical tests did not show any significant difference regarding the formulation nature, the time and shear rate ramp. Such properties are satisfactory for patient use.

Figure 2 about there

Figure 3 about there

Microbial stability study

Table 4: Microbial contamination of cream during storage. UFC/g= unity forming colony/gram of cream. Expressed as average of 3 replicates for each day.

Day	0	28	85
Number of UFC/g	16.7 ± 11.8	1 ± 1.4	0 ± 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	none	none	none

<i>Staphylococcus aureus</i>	none	none	none
------------------------------	------	------	------

Table 5: Microbial contamination of cream in patient use condition. UFC/g= unity forming colony/gram of cream. Expressed as average of 3 replicates for each day.

Day	7	14	21	28
Number of UFC/g	4.2 ± 3.1	1 ± 1.4	0 ± 0	1 ± 1.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	none	none	none	none
<i>Staphylococcus aureus</i>	none	none	none	none

The rapamycin cream remained within European Pharmacopeia specifications for contamination throughout study after 28 and 85 days when stored at 30°C ([table 4](#)). In any case, no *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* were detected. A positive control was performed with artificially *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus* contaminated cream. Microbial growth was observed, demonstrating that rapamycin did not inhibit the growth.

We also tested conservation mimicking patient use, i.e. the tube opened every day for one month. Microbial contamination assessed at days 7-14-21 and 28 was also satisfactory (below European Pharmacopeia limits, [Table 5](#)). This result was attributed to (i) triclosan, disodium EDTA and chlorhexidine dihydrochloride, which are preservatives present in Excipial Hydrocrème® and (ii) an appropriate packaging in aluminum tubes, limiting contact with contamination.

Conclusion

We present for the first time a formulation with solubilized rapamycin. To date, publications have only reported formulations made from crushed tablets or oral solutions of rapamycin, which have presented major drawbacks: (i) when using tablets the drug is partially or even not solubilized in the topical formulation, and it is thus less (or even not) bioavailable to exert its effect. Furthermore, skin damage has been reported due to inadequate crushing of tablets. (ii) When using oral formulations, oral ingredients are present into the topical composition and are likely to cause side-effects.

Incorporation of rapamycin and homogeneous distribution in the topical formulation are more effective if the rapamycin is previously solubilized in a solvent. Moreover, skin diffusion and drug bioavailability will be enhanced. Our best results were obtained with Transcutol® (highly purified diethylene glycol monoethyl ether) commonly used as an ingredient in topical formulations. Transcutol® is also an excellent permeation agent that enhances drug diffusion through the skin (Mura et al., 2000). Absolute galenic control of our preparation will permit the best drug distribution, will increase bioavailability and efficiency, and will reduce the rapamycin's concentration necessary and costs.

We propose here for the first time a stability study of a topical formulation containing rapamycin. The physico-chemical stability of the cream is 85 days. No degradation products were detected during this time. Microbiological stability studies showed that patients can use the cream without risk of infection. Viscosity measurements are recommended in European pharmacopeia. The experiments revealed that incorporating rapamycin and Transcutol® in the cream did not change its rheological properties. Furthermore, the organoleptic characteristics (odour, appearance and colour) were unaffected.

Such a preparation warrants clinical evaluation, with the aims of optimizing dosage and proposing a long term maintenance scheme to avoid recurrence cutaneous manifestations of TSC. The 0.1% rapamycin cream has been used for several months by TSC patients in our hospital. The efficacy and tolerance will be reported later.

Acknowledgment

The authors would like to thank Christine Truffaut for her help.

References

- Balestri, R., Neri, I., Patrizi, A., Angileri, L., Ricci, L., Magnano, M., 2015. Analysis of current data on the use of topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in Tuberous Sclerosis Complex. *J Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 29(1):14-20.
- Bissler, J.J., McCormack, F.X., Young, L.R., Elwing, J.M., Chuck, G., Leonard, J.M., et al., 2008. Sirolimus for Angiomyolipoma in Tuberous Sclerosis Complex or Lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med* 358:140-151.
- Bouguéon, G., Vrignaud, S., Martin, L., Lagarce, F., 2015. Traitement des angiofibromes de la sclérose tubéreuse de Bourneville par des préparations topiques à base de sirolimus : état

des lieux de la préparation en France et revue de la littérature. *Ann dermatol venereol* 142 (12) S668–S66

Haemel, A.K., O'Brian, A.L., Teng, J. M., 2010. Topical Rapamycin A Novel Approach to Facial Angiofibromas in Tuberous Sclerosis. *Arch Dermatol.* 146(7):715-718

Hofbauer, G.F.L., Marcollo-Pini, A., Corsenca, A., Kistler, A.D., French, L.E., Wuthrich, R.P., Serra, A.L., 2008. The mTOR inhibitor rapamycin significantly improves facial angiofibroma lesions in a patient with tuberous sclerosis. *Br J Dermatol.* 159 (2), 473–475

International Conference on Harmonisation. Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2015, 6-12.

Jacks, S.K., Witman, P.M., 2015. Tuberous Sclerosis Complex: An Update for Dermatologists. *Pediatr Dermatol.*, 17. doi: 10.1111/pde.12567

Krueger, D.A., Northrup, H., 2013. Tuberous Sclerosis Complex Surveillance and Management: Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr. Neurol.* 49, 255-265.

Madke, B., 2013. Topical rapamycin (sirolimus) for facial angiofibromas. *Indian Dermatol Online J.* 4(1): 54–57.

Mura, P., Faucci, M. T., Bramanti G., Corti, P., 2000. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations, *Eur. J. Pharm. Sci.* 9, 365–372.

Northrup, H., Krueger, D.A., 2013. Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria Update: Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr. Neurol.* 49, 243-254.

Oyler, A.R., Armstrong, B.L., Dunphy, R., Alquier, L., Maryanoff, C.A., Cohen, J.H., Merciadez, M., Khublal, A., Mehta, R., Patel, A., Il'ichev, Y.V., 2008. Mass balance in rapamycin autoxidation, *J Pharm Biomed Anal.* 15;48(5):1368-74.

Oyler, A.R., Segmuller, B.E., Sun, Y., Polshyna, A., Dunphy, R., Armstrong, B.L., Achord, P., Maryanoff, C.A., Alquier, L., Il'ichev, Y.V., 2012. Forced degradation studies of rapamycin: identification of autoxidation products, *J Pharm Biomed Anal.*, 5(59): 194-200.

Park, J., Yun, S.K., Cho, Y.S., Song, K.H., Kim, H.U., 2014. Treatment of Angiofibromas in Tuberous Sclerosis Complex: The Effect of Topical Rapamycin and Concomitant Laser Therapy. *Dermatology.*, 228, 37–41.

Rauktys, A., Lee, N., Lee, L., Dabora, S.L., 2008. Topical rapamycin inhibits tuberous sclerosis tumor growth in a nude mouse model. *BMC Dermatol.*, 8:1, 1-9.

Ricciutelli, M., Di Martino, P., Barboni, L., Martelli, S., 2006. Evaluation of rapamycin chemical stability in volatile-organic solvents by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7:41 (3): 1070-1074.

Salido-Vallejo, R., Garnacho-Saucedo, G., Moreno-Giménez, J.C., 2014,. Current Options for the Treatment of Facial Angiofibromas. *Actas Dermosifiliogr.*, 105 (6), 558-568.

Tu, J., Foster, R.S., Bint, L.J., Halbert, A.R., 2014. Topical rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: Follow up of a pilot study and promising future directions. *Australas. J. Dermatol.*, 55, 63–69.

Wataya-Kaneda, M., Tanaka, M., Nakamura, A., Matsumoto, S., Katayama, I., 2011. A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex (TSC): a pilot study of nine Japanese patients with TSC of different disease severity. *Br. J. Dermatol.*, 165, 912–916.

Figure captions

Table 1: Rapamycin solubility in various oils, solvents and surfactants

Table 2 : Composition of rapamycin cream

Table 3 : Evolution of composition of rapamycin cream

Table 4: Microbial contamination of cream in storage conditions. UFC= unity forming colony.

Table 5: Microbial contamination of cream in patient use conditions. UFC= unity forming colony.

Figure 1: Examples of rapamycin chromatogram : (a) reference cream 0.1%, (b) forced degradation by heat, forced degradation by oxidation

Figure 2: Rheological comparison between Excipial Hydrocreme® and cream containing rapamycin, at day 0.

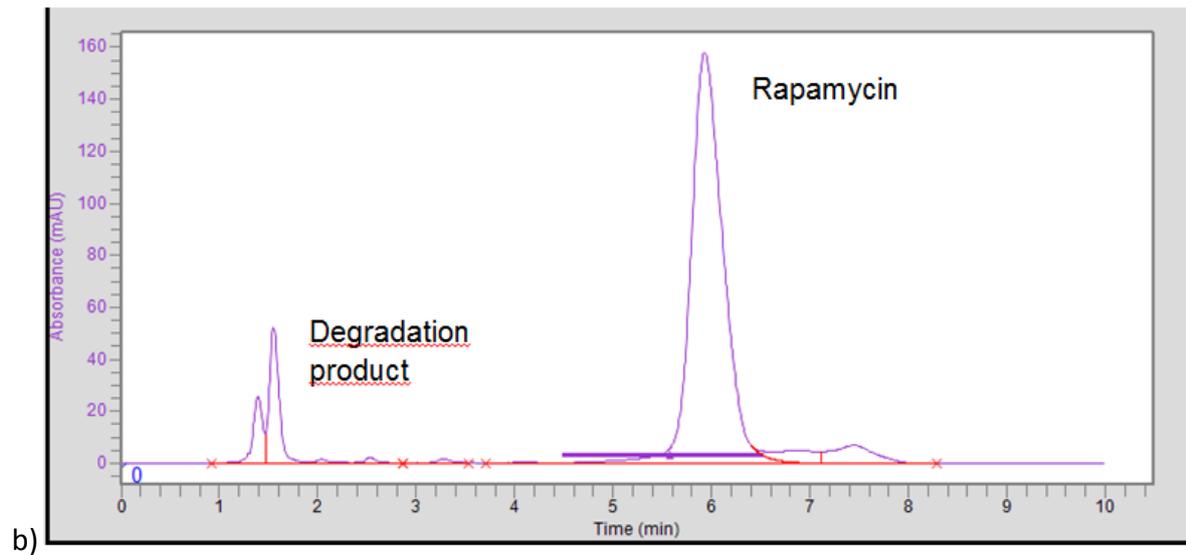
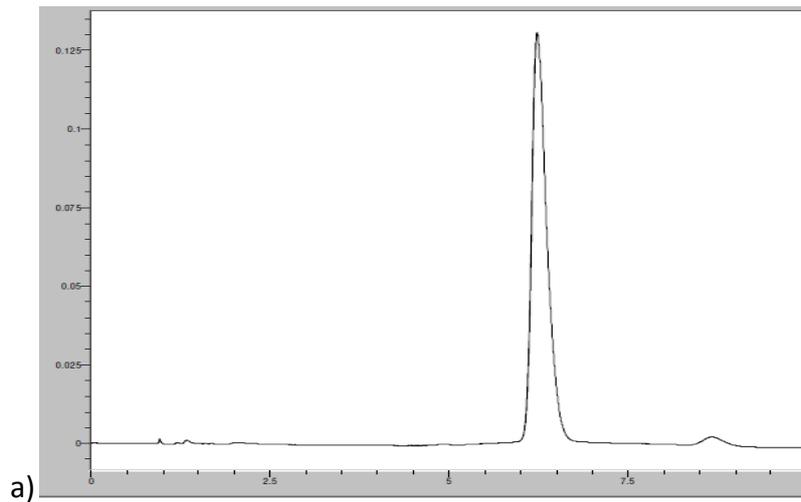
Legend: Blue line: Excipial Hydrocreme® shear rate increase, red line: Excipial Hydrocreme® shear rate decrease, green line: rapamycin cream shear rate increase, purple line: rapamycin cream shear rate decrease.

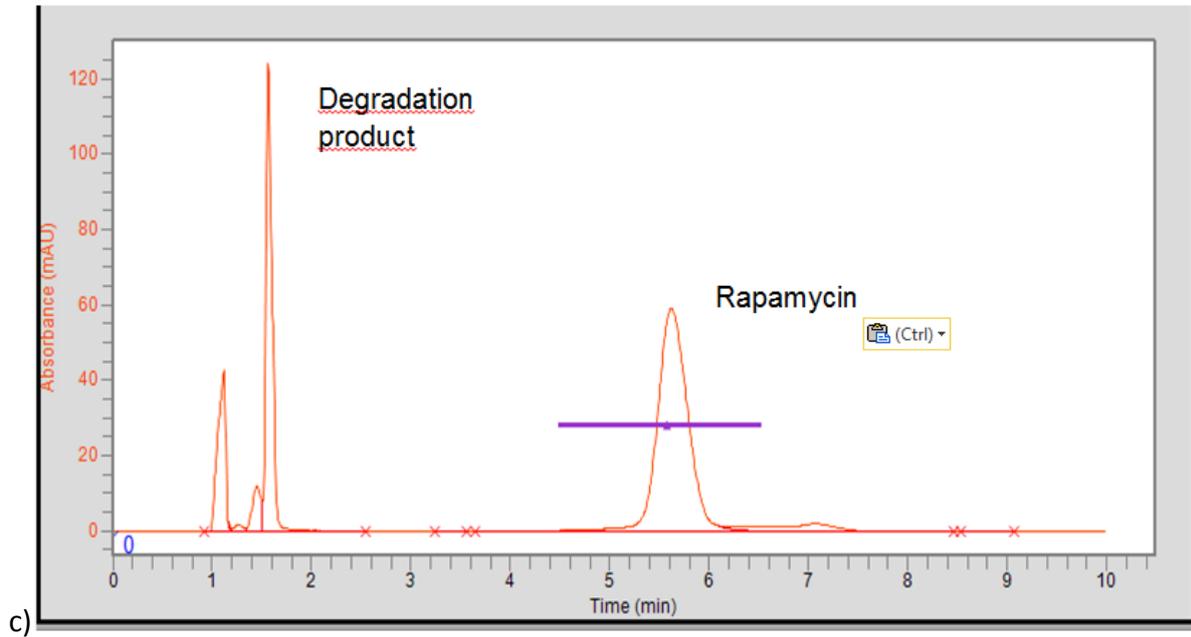
Figure 3: Rheological properties of cream containing rapamycin throughout time.

Legend:

- Day 0: Dark purple line: shear rate increase. Light purple line: shear rate decrease
- Day 28: Dark orange line: shear rate increase. Light orange line: shear rate decrease
- Day 85: Dark blue line: shear rate increase. Light blue line: shear rate decrease

Figure 1: Examples of rapamycin chromatogram : (a) reference cream 0.1%, (b) forced degradation by heat, forced degradation by oxidation





c)

Figure 2: Rheological comparison between Excipial Hydrocreme® and cream containing rapamycin, at day 0.

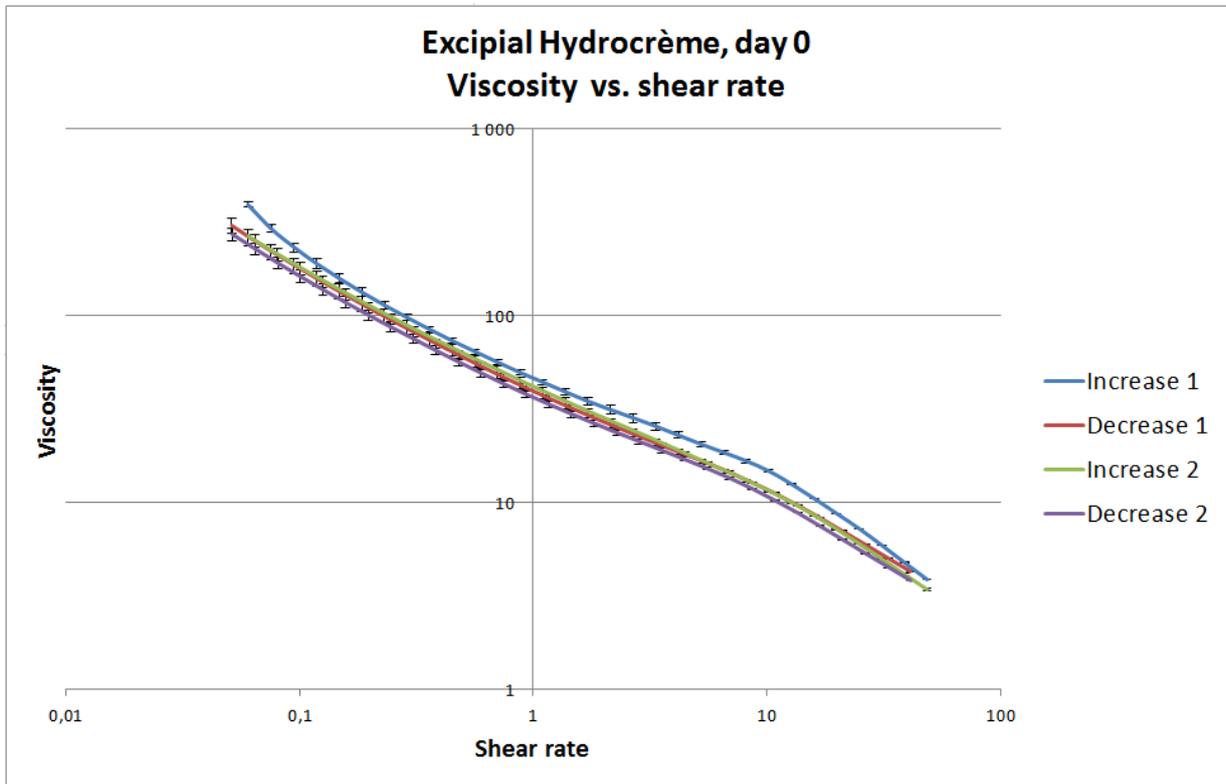
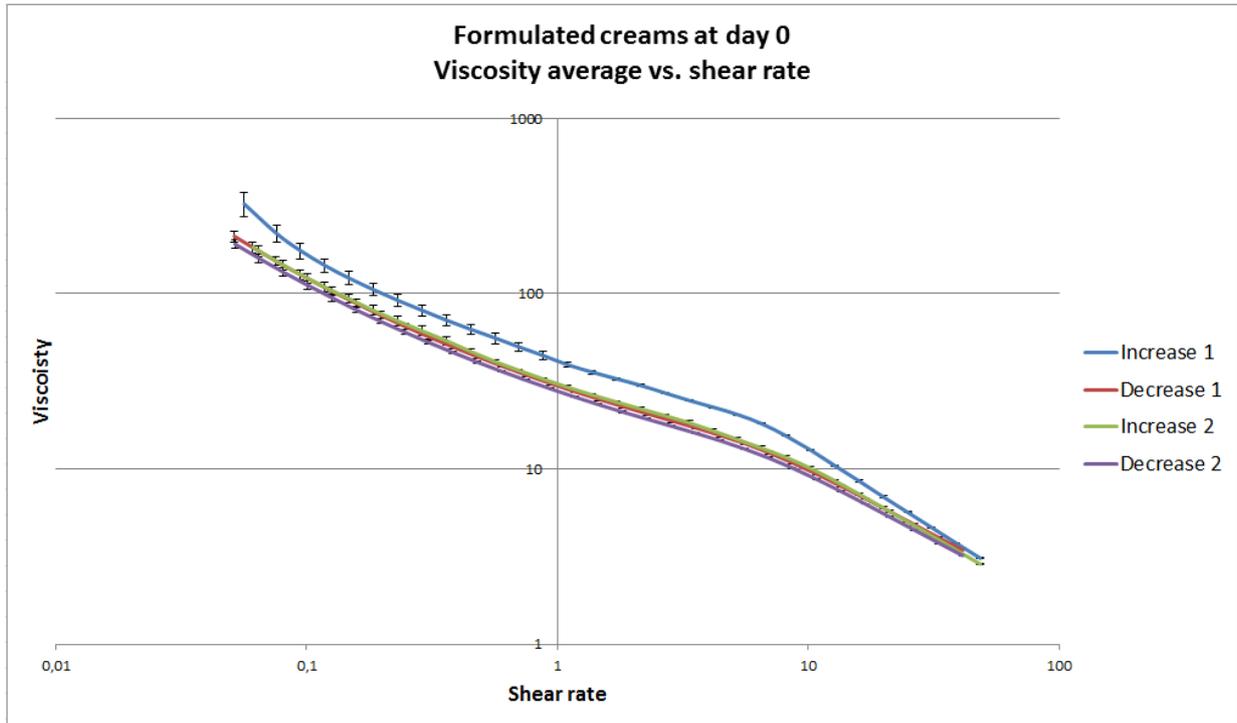


Figure 3: Rheological properties of cream containing rapamycin throughout time.

Legend:



SERMENT DE GALIEN

~~~~

Je jure, en présence des 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 des 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.



## Résumé

Les formulations topiques à base d'inhibiteurs de mTOR, et notamment de sirolimus, ont fait leur apparition il y a une dizaine d'années. Principalement utilisées pour traiter les angiofibromes faciaux de la sclérose tubéreuse de Bourneville, elles ont prouvé leur efficacité sur la diminution des érythèmes et du nombre d'angiofibromes faciaux. Ne possédant que peu d'effets indésirables, elles représentent ainsi un nouvel espoir pour les patients dont les affections sont parfois défigurantes. Malheureusement, aucune forme n'est pour le moment commercialisée et les pharmaciens hospitaliers sont sollicités afin de réaliser des préparations pharmaceutiques.

Le premier objectif de cette thèse est de mettre en lumière l'ensemble des connaissances et des moyens nécessaires à la mise en œuvre d'une préparation topique de sirolimus. Elle rapporte une analyse approfondie de la littérature sur le sujet, ainsi qu'un audit sur l'état des lieux de la préparation en France (sélectionné sous forme de poster aux Journées Dermatologiques de Paris 2015). Nous proposons également pour la première fois une étude de stabilité physico-chimique et microbiologique de notre formulation réalisée sur 6 mois (proposée pour publication à l'International Journal of Pharmaceutics). Enfin, nous rapportons l'efficacité des premiers patients traités après trois mois d'application.

Mots clefs : sclérose tubéreuse de Bourneville, inhibiteurs de mTOR, sirolimus topique, préparation pharmaceutique.

## Abstract

mTOR topical formulations, especially sirolimus, appeared about ten years ago. Mainly used to treat tuberous sclerosis facial angiofibromas, they have proven their effectiveness on reducing erythema and the number of angiofibromas. With only few side effects, they represent a new hope for patients whose affliction are sometimes disfiguring. Unfortunately, for the moment, no forms are marketed and hospital pharmacists are requested to make pharmaceutical preparations.

The first objective of this thesis is to highlight all the knowledge and resources necessary for the implementation of a topical formulation of sirolimus. It reports a detailed analysis of the literature on the subject, and an audit of the preparation in France (selected as a poster on Journées Dermatologiques de Paris 2015). We also offer for the first time a physicochemical and microbiological stability study of our formulation conducted over 6 months (proposed for publication in the International Journal of Pharmaceutics). Finally, we report the effectiveness on first patients after three months of application.

Keywords: tuberous sclerosis, mTOR inhibitors, topical sirolimus, pharmaceutical preparation