



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

Année 2018

Thèse n° 239-2018

**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES**  
**DE PHARMACIE HOSPITALIÈRE – PRATIQUE ET RECHERCHE**

Soutenu devant le jury interrégional le 19 octobre 2018, à Lyon

Par **Lucile BOURGUE**

Née le 18/12/1990 à Annemasse (74)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN**  
**PHARMACIE**

---

**Développement et étude d'efficacité *ex-vivo***  
**d'une préparation antimicrobienne cicatrisante**  
**pour le traitement des brûlures**

---

**JURY**

**Président** : Pr. Fabrice PIROT – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

**Directeur** : Pr. Fabrice PIROT – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

**Membres** : Dr. Damien SALMON – Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier

Dr. Céline AUXENFANS – Praticien Hospitalier

Dr. Hristo SHIPKOV - Praticien Hospitalier

Dr Christine PIVOT – Praticien Hospitalier

Pr. Yoghesvar N. KALIA – Professeur des Universités

Pr. Valérie SAUTOU – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

• Président de l'Université	Frédéric FLEURY
• Présidence du Conseil Académique	Hamda BEN HADID
• Vice-Président du Conseil d'Administration	Didier REVEL
• Vice-Président de la Commission Recherche	Fabrice VALLEE
• Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire	Philippe CHEVALIER

## Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

### SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directrice : Anne-Marie SCHOTT

### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE
Observatoire des Sciences de l'Univers	Directrice : Mme Isabelle DANIEL

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

## ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

### LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

#### DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)

Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)

Madame Anne DENUZIERE (MCU)

Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)

Madame Christelle MACHON (MCU-PH)

Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)

Madame Françoise FALSON (Pr)

Monsieur Hatem FESSI (Pr)

Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)

Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)

Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)

Madame Giovanna LOLLO (MCU)

Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)

Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)

- **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)

Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)

Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)

Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (Pr)

Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)

Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)

Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)

Madame Claire GAILLARD (MCU)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)

Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)

Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)

Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Florence RANCHON (MCU-PH)

Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)

Madame Léa PAYEN (PU-PH)

Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH-HDR)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)

Madame Kiao Ling LIU (MCU)

Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Michel TOD (PU – PH)

Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)

Monsieur Roger BESANCON (MCU)

Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)

Madame Evelyne CHANUT (MCU)

Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)

Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**

Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)

Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)

Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)

Madame Morgane GOSSEZ (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)

Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)

Madame Sarah HUET (AHU)

Monsieur Yohann JOURDY (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)

Madame Florence MORFIN (PU – PH)

Monsieur Didier BLAHA (MCU)

Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)

Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)

Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)

Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)

Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)

Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)  
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)  
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)  
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)  
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)  
Madame Alexandra MONTEMBAULT (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-PAST)  
Madame Valérie VOIRON (MCU-PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques (AHU)**

Monsieur Alexandre JANIN

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Camille ROZIER

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

## Remerciements

---

Aux membres du Jury,

Professeur Valérie SAUTOU, je vous remercie vivement d'avoir accepté de juger ce travail dans ces conditions particulières. Soyez assurée de ma sincère gratitude.

Professeur Yoghesvar N. KALIA, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et du temps que vous avez accepté d'y consacrer.

Docteur Christine PIVOT, je vous remercie d'avoir soutenu ce projet et accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Docteur Hristo SHIPKOV, vous êtes à l'initiative de ce travail, je vous remercie d'accepter d'en juger les premiers résultats mais également du temps que vous m'avez consacré.

Docteur Céline AUXENFANS, je vous remercie pour votre implication et votre bienveillance dans vos relectures.

Docteur Damien SALMON, merci pour ton aide et de ta bonne humeur.

Professeur Fabrice PIROT, je vous remercie pour le temps que vous m'avez accordé, d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci également de m'avoir confié ce projet.

A toute l'équipe de l'Unité de Préparation et Contrôle du Médicament et plus particulièrement aux techniciens du labo et au grand Docteur Merienne, pour avoir tenté de me transmettre leur maîtrise de ce bel appareillage qu'est la chromatographie liquide, et ce dans la bonne humeur, dans les limites du raisonnable !

A l'ensemble de l'équipe pharmaceutique de l'Hôpital Edouard Herriot.

A mes co-internes, responsables du caractère savoureux de cet internat!  
Chloé, Louise, Annabelle, Marianne, Mathieu, Alban et les autres!  
Merci Chloé pour tes incapacités d'intervention en réunion.  
Merci Louise pour tes excès d'intervention !

A la coloc, pour tous ces bons moments passés,  
James, pour être si intelligent au travail et l'être tellement moins dans la vie.  
Teva, pour être si bien. Que dire de plus ?  
Thibaud, pour être un bébé caractériel de bientôt de 30 ans.  
Sabrina, pour tout ce temps passé ensemble, ton soutien, ton amitié, ces grosses rigolades.  
Merci également d'avoir essayé de me transmettre un peu de ta capacité à se gérer dans la vie!

Aux copines de pharma citées mais aussi les autres,  
A Dodo, ahahah, je ne sais pas trop dans quelle catégorie te mettre dans ce texte ! Je t'adore et tu le sais !  
Dani, tout ce temps passé ensemble, merci de m'avoir tant fait rigoler, merci aussi à ta famille !  
Edwige, pour ces grosses marades et ces nombreuses et encore nombreuses je l'espère conversations intelligentes, positives et constructives!

A Jean, car nous ne sommes pas des chats mais des lions, à ces grosses rigolades, à ton accueil et au fait que je suis impressionnée de ton déplacement!

Aux copains de Haute-Savoie pour tous ces beaux et intelligents moments partagés,  
A ma Valent que j'adore!  
A Momo et Mary pour ces bonnes rigolades, pour votre tentative de transmission de l'esprit du sport et ces débuts sur Lyon !  
A Clem et Adri pour vos explosions d'idées toujours plus brillantes les une que les autres, vous êtes très forts! A Rom! A Elli. Nico, à l'amour de la culture et aux quennelles! A Toto pour ses idées lumineuses là encore mais aussi un grand merci pour ton soutien.  
A Lolo, Deydey, Vanou, Lili, Cynthia, Marine. Que de bon temps passé ensemble! Vivement le prochain regroupement!  
Vb, à ton rire inimitable, à Ménérbes et à tous ces bons moments !  
Doudou, pour avoir grandi ensembles, et par la même un peu pareil! A toutes ces bonnes idées!

A ma famille, merci d'être présents.

---

# Table des matières

---

Abréviations .....	14
Index des figures .....	18
Index des tableaux .....	22
Index des annexes .....	24
<b>Introduction .....</b>	<b>25</b>
<b>Chapitre 1 : la brûlure, contextualisation et prise en charge .....</b>	<b>30</b>
1.1.  Physiologie cutanée.....	29
1.1.1.  Fonctions cutanées.....	29
1.1.2.  Histologie cutanée.....	29
1.2.  La brûlure .....	37
1.2.1.  Etiologies.....	37
1.2.2.  Epidémiologie.....	39
1.2.3.  Coûts.....	41
1.2.4.  Physiopathologie de la brûlure .....	41
1.3.  Cicatrisation cutanée.....	49
1.3.1.  Phase d'hémostase et de coagulation.....	50
1.3.2.  Phase inflammatoire .....	51
1.3.3.  Phase proliférative.....	53
1.3.4.  Phase de remodelage .....	55
1.3.5.  Profondeur et étendue de la brûlure conditionnent sa cicatrisation .....	56
1.3.6.  Facteurs systémiques et locaux modifiant la cicatrisation.....	57
1.3.7.  Interactions flore-plaies .....	57
1.3.8.  Séquelles cicatricielles.....	57
1.4.  Diagnostic de la brûlure.....	59
1.4.1.  Surface cutanée atteinte .....	59
1.4.2.  Profondeur des lésions.....	61
1.4.3.  Terrains à risque .....	61
1.4.4.  Lésions associées.....	62
1.4.5.  Pronostic.....	62
1.5.  Prise en charge des brûlures .....	63
1.5.1.  Conseils de premier secours.....	63
1.5.2.  Prise en charge préhospitalière.....	64
1.5.3.  Brûlures bénignes : prise en charge en milieu ambulatoire.....	65
1.5.4.  Brûlures graves : prise en charge hospitalière .....	69

## **Chapitre 2 : développement et étude d'efficacité ex-vivo d'une préparation topique anti-infectieuse et cicatrisante à 1% de sulfadiazine argentique pour le traitement des brûlures ..... 83**

2.1. Parties prenantes.....	84
2.1.1. Demandeur .....	84
2.1.2. Exécutants.....	85
2.2. Aspects réglementaires .....	86
2.2.1. Généralités .....	86
2.2.2. Faisabilité.....	87
2.2.3. Matières premières à usage pharmaceutique .....	87
2.2.4. Stabilité.....	89
2.3. Intérêt pharmacothérapeutique .....	90
2.3.1. Flammazine®, crème à 1% de sulfadiazine argentique.....	90
2.3.2. Vitamines A, C et E .....	102
2.4. Préformulation : choix de dérivés vitaminiques estérifiés.....	120
2.4.1. Palmitate de rétinyle .....	121
2.4.2. Acétate de tocophérol.....	127
2.4.3. Palmitate d'ascorbyle .....	133
2.4.4. Effets synergiques d'une supplémentation vitaminique combinée.....	138
2.4.5. Conclusion .....	139
2.5. Partie expérimentale.....	140
2.5.1. Matériel et Méthodes .....	140
2.5.2. Résultats .....	159
2.5.3. Discussion .....	186
2.5.4. Conclusion .....	192
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>194</b>

---

## Abréviations

---

5 hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

A-9-cis-R: Acide 9-cis-Rétinoïque

A/L: Air/Liquide

AA-PAL: *Ascorbyl 6-PALmitate*, palmitate d'ascorbyle

ABSI: *Abbreviated Burn Severity Index*, indice abrégé de gravité des brûlures

ADN: Acide DéoxyriboNucléique

ALA: Acide-L-Ascorbique

ANOVA: *ANalysis Of VAriance*, analyse de la variance

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé

ARTT : Acide Rétinoïque Tout-Trans

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

AUC : Areas under curve

BPF: Bonnes Pratiques de Fabrication

BPP: Bonnes Pratiques de Préparation

CDB : Centre Des Brûlés

CDBL-PC: Centre Des Brûlés de Lyon Pierre Colson

CIR: *Cosmetic Ingredient Review*, revue des ingrédients cosmétiques

CMV : CytoMégaVirus

DAD: *Diode-Array Detector*, détecteur à barrettes de diodes

DD: *Deep Dermal*, brûlure du deuxième degré profond

DLU: Date Limite d'Utilisation

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, milieu Eagle modifié de Dulbecco

DMS : Durée Moyenne de Séjour

EBA: *European Burn Association*, association européenne de la brûlure

E/H : Eau dans Huile

EGF : *Epidermal Growth Factor*, facteur de croissance épidermique

FDA : *Food et Drug Administration*, agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FGF: *Fibroblast Growth Factor*, facteur de croissance des fibroblastes

FT: *Full Thickness*, brûlure du troisième degré

GH-Centre: Groupement Hospitalier Centre

GPx : Gluthation peroxydase

HCL: Hospices Civils de Lyon

HEH: Hôpital Edouard Herriot

Huile dans Eau: H/E

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*, chromatographie liquide haute performance

HPS : Hématoxyline Phloxine Safran

ICH : *International Conference on Harmonisation*, Conférence internationale d'harmonisation

ILC: Infections Liées aux Cathéters

IL: InterLeukine

IPAA : *tetra-isopalmitoyl ascorbic acid*, acide tétra-isopalmitoyl-ascorbique

ISBI: *International Society for Burn Injuries*, société international pour les brûlés

JDE: Jonction Dermo-Epidermique

LD: Limite de Détection

LQ: Limite de Quantification

MAP: *Magnesium Ascorbyl Phosphate*, phosphate d'ascorbyle de magnésium

MP: Matière Première

MPUP: Matière Première à Usage Pharmaceutique

MTT: 3- (4,5-diMéthylThiazol-2-yl) -2,5-diphénylTétrazolium

NO : *Nitric Oxyd*, monoxyde d'azote

PA : Principe actif

PAVM: Pneumopathies Acquisées sous Ventilation Mécanique

PBS: *Phosphate Buffered Saline*, tampon phosphate salin

PD: Produits de Dégradation

PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*, facteur de croissance dérivé des plaquettes

PMSI: Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information

PPI: Pour Préparations Injectables

PTFE: PolyTétraFluoroEthylène

PUI: Pharmacie à Usage Intérieur

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

RE : Rétinol Equivalent

ROL : Rétinol

ROS : *Reactive Oxygen Species*, espèces réactives oxygénées

RP: *Retinyl Palmitate*, palmitate de rétinyle

SAP: *Sodium Ascorbyl Phosphate*, phosphate d'ascorbyle de sodium

SCB: Surface Corporelle Brulée

SCCS: *Scientific Committee on Consumer Safety*, Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs

SD: *Superficial Dermal*, brûlure du deuxième degré superficiel

SSD: *Silver SulfaDiazine*, sulfadiazine argentique

SVF: Sérum de Veau Foetal

TA: *Tocopheryl Acetate*, acétate de tocophérol

TGF-  $\beta$ : *Transforming Growth Factor- $\beta$* , facteur de croissance transformant  $\beta$

UE: Union Européenne

UI : Unités Internationales

US\$ : *United States Dollar*, dollar américain

UVA : UltraViolets A

UVB: UltraViolets B

VCRP : *Voluntary Cosmetic Registration Program*, programme d'inscription volontaire des cosmétiques

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VS: *Validation Standard*, standard de validation

ZAC: Zone à Atmosphère Contrôlée

---

## Index des figures

---

<b>Figure 1</b> : Vue schématique d'une coupe de peau humaine d'après <i>Hoel et al</i> .....	30
<b>Figure 2</b> : Structure schématique de l'épiderme d'après <i>Peyrot et al</i> .....	30
<b>Figure 3</b> : Brûlures thermiques d'après <i>Hettiaratchy et al</i> .....	38
<b>Figure 4</b> : Brûlure suite à une projection d'acide sulfurique d'après <i>Hettiaratchy et al</i> .....	38
<b>Figure 5</b> : Brûlure électrique de la pulpe des doigts d'après <i>Hettiaratchy et al</i> .....	39
<b>Figure 6</b> : Causes de brûlures par classes d'âge d'après <i>Pasquereau et al</i> .....	41
<b>Figure 7</b> : Zones distinctes de la brûlure selon Jackson d'après <i>Hettiaratchy et al</i> .....	42
<b>Figure 8</b> : Degrés de brûlures et structures cutanées atteintes d'après <i>Tran et al</i> .....	44
<b>Figure 9</b> : Brûlures polymorphes du premier et deuxième degrés d'après <i>Hettiaratchy et al</i> .....	44
<b>Figure 10</b> : Brûlure polymorphe de premier, deuxième et troisième degrés d'après <i>Hettiaratchy et al</i> .....	44
<b>Figure 11</b> : Phase d'hémostase et phase inflammatoire au cours de la cicatrisation d'après <i>Démarchez et al</i> .....	50
<b>Figure 12</b> : Le remodelage cicatriciel, un processus évolutif, d'après <i>Dupre</i> .....	55
<b>Figure 13</b> : Influence de la profondeur de la brûlure sur la cicatrisation d'après <i>Dupre</i> .....	56
<b>Figure 14</b> : Profils évolutifs des cicatrices pathologiques d'après <i>Dupre</i> .....	58
<b>Figure 15</b> : Pourcentage de surface corporelle par face selon Wallace d'après <i>Chagvardieff et al</i> .....	60
<b>Figure 16</b> : Incision de décharge sur main brûlée au troisième degré d'après <i>Conti et al</i> .....	73

<b>Figure 17</b> : Variabilité des greffes de peau en fonction de l'épaisseur du site donneur d'après <i>Revol et al</i> .....	79
<b>Figure 18</b> : Dissociation de la sulfadiazine argentique dans l'exsudat .....	93
<b>Figure 19</b> : Mécanismes d'actions anti-microbiens de l'argent topique sur les brûlures d'après <i>Dai et al</i> .....	94
<b>Figure 20</b> : Viabilité cellulaire à 24, 48 et 72 heures de cellules HEK exposées à différents traitements anti-infectieux d'après <i>Boonkaew et al</i> .....	97
<b>Figure 21</b> : Viabilité cellulaire à 24, 48 et 72 heures de cellules NHF exposées à différents traitements anti-infectieux d'après <i>Boonkaew et al</i> .....	98
<b>Figure 22</b> : Le traitement topique par crème à 1 % de sulfadiazine argentique induit un retard de cicatrisation sur des plaies excisionnelles d'oreilles de lapin d'après <i>Qian et al</i> .....	99
<b>Figure 23</b> : Fermeture des plaies après 7 jours de traitement par (i) EGF + SSD et (ii) SSD seule, sur une souris brûlée .....	100
<b>Figure 24</b> : Structures des rétinoïdes .....	104
<b>Figure 25</b> : Métabolisme intracellulaire des rétinoïdes d'après <i>P.Brebis</i> .....	106
<b>Figure 26</b> : Structures de la vitamine E .....	110
<b>Figure 27</b> : Réactions radicalaires et vitamine E .....	111
<b>Figure 28</b> : Structures de l'acide ascorbique et de ses produits d'oxydation .....	114
<b>Figure 29</b> : Interdépendance des vitamines C, E et du glutathion dans leur régénération et la capture des radicaux libres d'après <i>Pullar et al</i> .....	116
<b>Figure 30</b> : Photodégradation du palmitate de rétinyle d'après <i>Fu et al</i> .....	125
<b>Figure 31</b> : Quantification du RP contenu dans des gels-crèmes à 1% de RP au cours du temps conservés à 75% d'humidité relative et (i) à température ambiante (25 °C), (ii) à 37°C ou (iii) 45 °C d'après <i>Guaratini et al</i> .....	127
<b>Figure 32</b> : Quantification du TA contenu dans un gel-crème à 1% (m/m) de RP au cours du temps conservé à température ambiante (25 °C), 37 ou 45 °C et 75% d'humidité relative d'après <i>Guaratini et al</i> .....	132

<b>Figure 33</b> : Quantification de l'AA-PAL au cours du temps en fonction de sa concentration initiale et du type de véhicule, d'après <i>Spiclin et al</i> .....	138
<b>Figure 34</b> : Algorithme de sélection d'un protocole de validation selon <i>Hubert et al</i> .....	153
<b>Figure 35</b> : Observation au microscope de la Flammazine® à t = 0 .....	160
<b>Figure 36</b> : Présence de cristaux au sein de la formulation Fd .....	161
<b>Figure 37</b> : Présence de cristaux au sein de la formulation F2 à t = 72 heures .....	161
<b>Figure 38</b> : Absence de cristaux au sein de la formulation Fc à t = + 72 heures .....	162
<b>Figure 39</b> : Aspect macroscopique d'explants de peau humaine brûlés et maintenus en survie en interface air/liquide (a) au premier, (b) cinquième, (c) onzième et (d) quinzième jour de l'expérimentation .....	163
<b>Figure 40</b> : (a) Défaut de coloration par HPS des kératinocytes supra basaux sur coupes histologiques d'une brûlure traitée par la formulation F1 en comparaison (b) d'une brûlure groupe contrôle cicatrisation spontanée au 11 <sup>ème</sup> jour d'expérimentation .....	167
<b>Figure 41</b> : (α) Présence d'une pigmentation brune cytoplasmique au niveau des couches basales et épineuses du groupe Flammazine® en comparaison (β) du groupe contrôle cicatrisation spontanée au 15 <sup>ème</sup> jour d'expérimentation .....	167
<b>Figure 42</b> : Epaisseur épidermique des brûlures, stratum corneum exclu, au cours de l'expérimentation en fonction du groupe de traitement .....	170
<b>Figure 43</b> : Epaisseur épidermique des brûlures, stratum corneum et strates kératinocytaires présentant un cytoplasme non coloré exclus, au cours de l'expérimentation et en fonction du groupe de traitement .....	171
<b>Figure 44</b> : Effet du groupe de traitement sur la réépithétisation cutanée, aux différents temps d'analyse et selon la modalité de mesure <i>stratum corneum exclu</i> .....	173
<b>Figure 45</b> : Effet du groupe de traitement sur la réépithétisation cutanée, aux différents temps d'analyse et selon la modalité de mesure <i>stratum corneum et kératinocytes non colorés par HPS exclus</i> .....	174
<b>Figure 46</b> : Chromatogrammes (a) d'une solution d'acétate de tocophéryl pure et (b) d'une suspension de formulation F2 (1 % acétate de tocophéryl m/m) filtrée .....	176
<b>Figure 47</b> : Profil d'exactitude de la méthode de dosage de l'acétate de tocophéryl .....	177

<b>Figure 48</b> : Chromatogrammes (a) d'une solution de rétinyle palmitate pure et (b) d'une suspension de formulation F2 (0,2745 % rétinyle palmitate m/m) filtrée .....	180
<b>Figure 49</b> : Courbes d'étallonnage divergeantes d'une gamme issue de solutions de rétinyle palmitate pures versus d'une suspension de formulation F2 filtrée (rétinyle palmitate 0,2745 %) .....	181
<b>Figure 50</b> : Chromatogrammes (a) d'une solution de sulfadiazine pure et (b) d'une suspension de Flammazine® (1 % sulfadiazine argentique) filtrée .....	183
<b>Figure 51</b> : Courbes d'étallonnage divergeantes d'une gamme issue de solutions de sulfadiazine argentique pure versus issue de suspensions de Flammazine® filtrées (sulfadiazine argentique 1,00 %) .....	184
<b>Figure 52</b> : Coupes histologiques de peau de souris (a) contrôle, traitées par (b) véhicule seul et (c) traitées par IPAA d'après <i>Campos et al</i> .....	186

---

## Index des tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : Taux d'hospitalisations pour motif de brûlures (pour 1000 personnes) selon l'âge, PMSI, France métropolitaine, 2011 .....	40
<b>Tableau 2</b> : Etiologies des brûlures ayant conduit à une hospitalisation sur le territoire français en 2011 d'après <i>Pasquereau et al</i> .....	40
<b>Tableau 3</b> : Table de <i>Lund et Browder</i> d'après <i>Chadgvardieff et al</i> .....	60
<b>Tableau 4</b> : Profondeur de la brûlure et signes associés d'après <i>Carsin et al</i> .....	61
<b>Tableau 5</b> : Composition qualitative de la Flammazine® .....	91
<b>Tableau 6</b> : Propriétés physico-chimiques de la sulfadiazine argentique .....	92
<b>Tableau 7</b> : pourcentages de fermeture des plaies par groupes de traitement d'après <i>Cho Lee et al</i> .....	100
<b>Tableau 8</b> : Composition qualitative de la spécialité Vitamine A Nepalm® 100 000 UI/2 mL .....	122
<b>Tableau 9</b> : Propriétés physico-chimiques du palmitate de rétinyle .....	123
<b>Tableau 10</b> : Composition qualitative de la spécialité Vitamine E Nepalm® 100 mg/2 mL .....	128
<b>Tableau 11</b> : Propriétés physico-chimiques de l'acétate de tocophérol .....	129
<b>Tableau 12</b> : Recouvrement du TA et du tocopherol au cours de l'essai de perméation et bioconversion du TA en tocophérol d'après <i>Baschong et al</i> .....	130
<b>Tableau 13</b> : Propriétés physico-chimiques du palmitate d'ascorbyle .....	134
<b>Tableau 14</b> : Concentrations en principes actifs des formulations F1, F2, F3 et de la Flammazine® .....	142
<b>Tableau 15</b> : Composition des formulations F1, F2 et F3 .....	143
<b>Tableau 16</b> : Composition des formulations Fa, Fb, Fc et Fd .....	146

<b>Tableau 17</b> : Protocole expérimental d'évaluation d'efficacité <i>ex-vivo</i> des formulations F1, F2 et F3 versus Flammazine® .....	148
<b>Tableau 18</b> : Design des protocoles de validation V1 à V5 selon <i>Hubert et al</i> .....	154
<b>Tableau 19</b> : Concentrations des standards pour la validation de la méthode de dosage du acétate de tocophérol .....	156
<b>Tableau 20</b> : Evaluation macroscopique et microscopique des formulations .....	162
<b>Tableau 21</b> : Photographies des coupes histologiques des brûlures d'explants de peau humaine, par groupes de traitement et en fonction du nombre de jours de l'expérimentation, coloration HPS (grossissement x20) .....	166
<b>Tableau 22</b> : Epaisseur épidermique maximale des brûlures au cours de l'expérimentation selon la modalité de mesure <i>stratum corneum exclu</i> .....	168
<b>Tableau 23</b> : Epaisseur épidermique maximale des brûlures au cours de l'expérimentation selon la modalité de mesure <i>stratum corneum exclu</i> et kératinocytes non colorés par HPS exclus .....	169
<b>Tableau 24</b> : Aires des pics des standards de calibration de l'acétate de tocophérol .....	175
<b>Tableau 25</b> : Aires des pics des standards de validation de l'acétate de tocophérol .....	175
<b>Tableau 26</b> : Paramètres de validation pour le dosage de l'acétate de tocophérol .....	177
<b>Tableau 27</b> : Essais de dégradations forcées pour le développement d'une méthode de dosage de l'acétate de tocophérol indicatrice de stabilité .....	179
<b>Tableau 28</b> : Essais de dégradations forcées pour le développement d'une méthode de dosage du pamitate de rétinyle indicatrice de stabilité .....	182
<b>Tableau 29</b> : Essais de dégradation forcée pour le développement d'une méthode de dosage de la sulfadiazine argentine indicatrice de stabilité .....	185

---

## Index des annexes

---

<b>Annexe 1</b> : Formulaire d'analyse de faisabilité de l'Unité de Préparation et Contrôle du Médicament, Hôpital Edouard Herriot .....	216
<b>Annexe 2</b> : Protocole pansement du Centre des Brûlés de Lyon Pierre Colson .....	224
<b>Annexe 3</b> : Spectre d'absorption de l'acétate de tocophérol .....	228
<b>Annexe 4</b> : Spectre d'absorption du rétinyl palmitate .....	229
<b>Annexe 5</b> : Spectre d'absorption de la sulfadiazine argentique .....	230

---

## Introduction

---

La brûlure correspond à une destruction de la peau, organe hétérogène composé de trois couches superposées qui constituent la principale barrière de protection de notre organisme vis-à-vis du milieu extérieur. La brûlure s'accompagne d'un état de stress oxydatif local, amplifié secondairement par la phase inflammatoire de la cicatrisation. Cet état est associé à une production excessive de radicaux libres, responsables d'effets physiopathologiques locaux et à distance de la zone brûlée. Débutant de façon concomitante à la brûlure, la cicatrisation est un processus dynamique qui implique des événements coordonnés selon des modalités variables en fonction de la présence ou non de facteurs de gravité, incluant la profondeur et l'étendue des tissus brûlés.

En France, on décompte chaque année 12 000 hospitalisations pour brûlure, provoquant 450 décès, dans la majorité des cas causés par une infection bactérienne secondaire, de porte d'entrée cutanée (1). Les soins prodigués aux brûlés graves doivent répondre aux principaux risques encourus par ces patients, incluant l'infection. Le traitement local des brûlures joue un rôle fondamental dans leur prise en charge puisque les lésions cutanées provoquent et entretiennent d'une part la maladie générale du brûlé et sont d'autre part à l'origine de séquelles. La prévention du risque infectieux constitue donc un pilier de la prise en charge de ces patients.

La spécialité pharmaceutique Flammazine<sup>®</sup>, préparation topique de type crème huile dans eau à 1 % de sulfadiazine argentique, fut introduite par Fox dans les années 1970. Au contact de la plaie, le sel de sulfadiazine argentique se dissocie, libérant dans l'exsudat des ions argent qui interagissent avec les structures cellulaires et le métabolisme des éventuels microorganismes. Les nombreuses cibles d'action de la sulfadiazine argentique permettent de couvrir un large spectre, tout en présentant un faible taux de résistances.

Cette molécule s'avère toutefois également toxique pour les structures cutanées. En effet, la cytotoxicité kératinocytaire, fibroblastique et leucocytaire démontrée *in vitro* de la sulfadiazine argentique est corrélée *in vivo* à un retard de cicatrisation et au développement de cicatrices pathologiques (i.e. cicatrices hypertrophiques).

Les alternatives thérapeutiques apparues à la suite de cette spécialité (e.g. pansements à l'argent) ne présentent pas un bénéfice coût-efficacité net, conduisant à l'absence de consensus à l'échelon international sur les pansements à utiliser chez le brûlé grave. En dépit de son impact délétère sur la cicatrisation, la Flammazine® reste à ce jour en France le traitement de première intention dans la prévention et le traitement local de l'infection chez les brûlés présentant des brûlures des deuxième ou troisième degrés, et ce dans des centres de référence comme le Centre des Brûlés Pierre Colson des Hospices Civils de Lyon, en accord avec les sociétés savantes nationales.

Dans ce mémoire, nous présenterons les premières phases de développement pharmaceutique d'une préparation topique anti-infectieuse et cicatrisante à 1 % de sulfadiazine argentique, supplémentée en vitamines et destinée au traitement des brûlures actuellement prises en charges par Flammazine®. Ce travail repose sur l'hypothèse que l'application sur les brûlures d'une telle préparation optimiserait leur cicatrisation en inhibant le retard de cicatrisation induit par la sulfadiazine argentique.

Afin d'évaluer l'intérêt pharmacothérapeutique du développement d'une telle préparation, une revue de la littérature a été menée dans le but (i) d'évaluer la balance bénéfices-risques de la Flammazine® ainsi que (ii) de sélectionner des vitamines pro-cicatrisantes. Cette évaluation a conduit à la supplémentation en vitamines A, C et E d'une préparation topique à 1 % de sulfadiazine argentique, en raison des propriétés antioxydantes et pharmacodynamiques sur les fibroblastes et les kératinocytes de ces vitamines.

Un travail de préformulation a été conduit afin (i) de choisir des dérivés vitaminiques adaptés à une incorporation au sein de préparations topiques et (ii) de déterminer leurs concentrations au sein de telles formulations.

Trois types de formulations à 1% de sulfadiazine argentique composées de suppléments vitaminiques qualitativement fixes (dérivés esterifiés des vitamines A, C et E, correspondant respectivement au palmitate de rétinyle, au palmitate d'ascorbyle et à l'acétate d'alpha-tocophérol) mais quantitativement variables (gammes de concentrations vitaminiques basse F1, moyenne F2 ou haute F3) ont été mises au point, puis ont fait l'objet d'une première série d'essais d'efficacité *ex-vivo*.

Des explants de peau humaine, issus d'un donneur unique, ont été (i) brûlés, (ii) répartis en 5 groupes de traitement (F1, F2, F3, contrôle Flammazine® et contrôle cicatrisation spontanée) et (iii) maintenus en survie en interface air/liquide pendant une durée de quinze jours. La cicatrisation des brûlures a été étudiée aux cinquième, onzième et quinzième jours de l'expérimentation par mesure de la réépithélialisation cicatricielle sur coupes histologiques colorées par Hématoxyline Phloxine Safran.

Par ailleurs, des méthodes de dosage par chromatographie liquide haute performance ont en parallèle été développées pour permettre l'étude de la stabilité de la préparation pharmaceutique finale selon les recommandations en vigueur.

Ce mémoire présente les premiers résultats du développement pharmaceutique d'une préparation topique à 1 % de sulfadiazine argentique supplémentée en vitamines A, C et E. Il souligne le potentiel thérapeutique d'une telle préparation et discute en dernier lieu des axes de développement pré-clinique nécessaires pour mener à bien ce projet.

---

# Chapitre 1 : la brûlure, contextualisation et prise en charge

---

## 1.1. Physiologie cutanée

- 1.1.1. Fonctions cutanées
- 1.1.2. Histologie cutanée

## 1.2. La brûlure

- 1.2.1. Etiologies
- 1.2.1. Epidémiologie
- 1.2.2. Coûts
- 1.2.3. Prévention
- 1.2.4. Physiopathologie de la brûlure

## 1.3. Cicatrisation cutanée

- 1.3.1. Phase d'hémostase et de coagulation
- 1.3.2. Phase inflammatoire
- 1.3.3. Phase proliférative
- 1.3.4. Phase de remodelage
- 1.3.5. La profondeur et l'étendue de la brûlure conditionnent sa cicatrisation
- 1.3.6. Facteurs systémiques et locaux modifiant la cicatrisation
- 1.3.7. Interactions flore-plaies
- 1.3.8. Séquelles cicatricielles

## 1.4. Diagnostic de la brûlure

- 1.4.1. Surface cutanée atteinte
- 1.4.2. Profondeur des lésions
- 1.4.3. Terrains à risque
- 1.4.4. Lésions associées
- 1.4.5. Pronostic

## 1.5. Prise en charge des brûlures

- 1.5.1. Conseils de premier secours
- 1.5.2. Prise en charge préhospitalière
- 1.5.3. Brûlures bénignes : prise en charge en milieu ambulatoire
- 1.5.4. Brûlures graves : prise en charge hospitalière

## 1.1. Physiologie cutanée

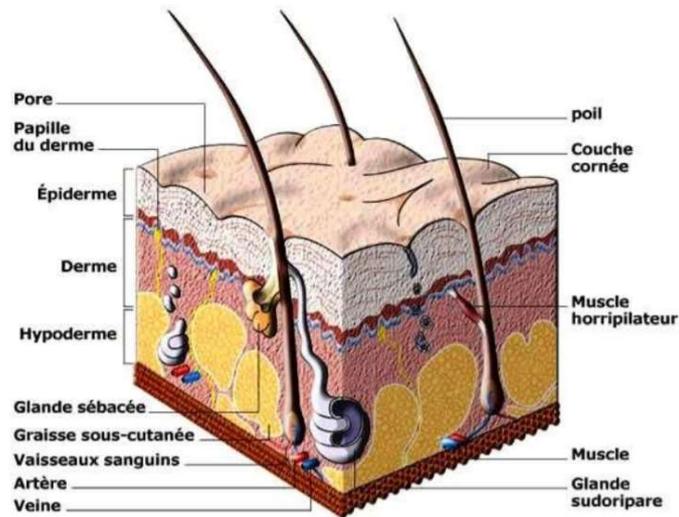
La peau est à la fois l'organe le plus étendu et le plus lourd du corps humain : d'une surface d'environ 2 m<sup>2</sup>, sa masse correspond à environ 15% du poids total d'un adulte (2). Nous détaillons en premier lieu ses différentes fonctions puis en second lieu son histologie.

### 1.1.1. Fonctions cutanées

La peau permet le **maintien de la température corporelle** par régulation de la sudation. La sécrétion de la sueur augmente avec la température, elle diminue lorsque la température s'affaiblit (3). La peau est la principale **barrière de protection** vis-à-vis du milieu extérieur. Elle constitue une membrane semi-perméable, protège notre organisme des traumatismes mécaniques, des toxines chimiques, des UV et des agents infectieux (3). La peau est également un **organe sensoriel** doté d'une sensibilité à la pression, à la chaleur et à la douleur (4). La peau est un **organe immunitaire** à part entière. Les cellules de Langerhans sont des cellules présentatrices d'antigènes localisées dans l'épiderme. Les kératinocytes sont en capacité de présenter des antigènes extérieurs et produisent par ailleurs de nombreuses cytokines (3). Au niveau dermique, l'activation des mastocytes conduit à la libération de substances vaso-actives, à la synthèse des médiateurs lipidiques mais aussi de cytokines et chimiokines. Des lymphocytes T sont également présents dans le derme, autour des veinules post-capillaires. Enfin, la peau exerce des **fonctions hormonales**, en intervenant dans le métabolisme de la vitamine D (5). Par ailleurs, les kératinocytes sous l'action des UVB (UltraViolet B) produisent des endorphines qui interviennent dans la régulation thymique de l'individu (6).

### 1.1.2. Histologie cutanée

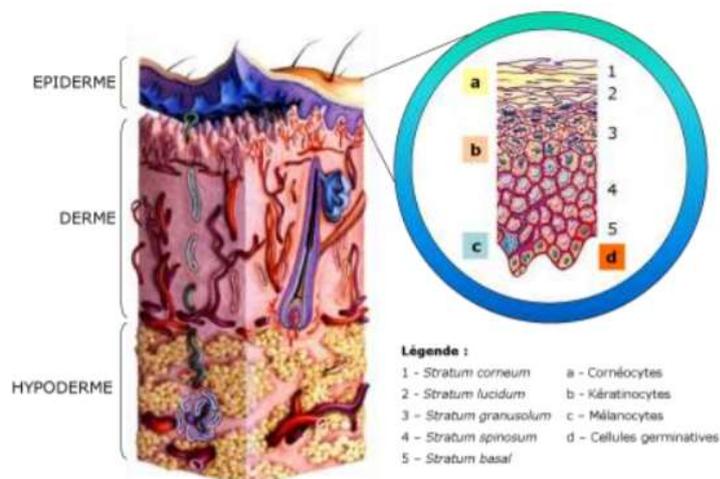
La peau est une structure **hétérogène** constituée de trois couches superposées de la surface vers la profondeur : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. S'insèrent au sein de cette superposition tissulaire des structures annexes que sont les follicules pilo-sébacés et les glandes sudoripares (2). L'ensemble peau et phanères (ongles et poils) constitue le tégument (6).



**Figure 1 :** *Vue schématisique d'une coupe de peau humaine d'après Hoel et al*

### i. Epiderme

L'épiderme mesure, suivant les zones de l'organisme, de 1 à 4mm. C'est un **épithélium pavimenteux**, c'est-à-dire un tissu qui repose sur une lame basale et dont les cellules majoritairement polyédriques et jointives suggèrent à la lecture au microscope un pavage. Ce tissu est en permanent renouvellement.



**Figure 2 :** *Structure schématisique de l'épiderme d'après Peyrot et al*

L'épiderme est composé de plusieurs types de **cellules résidentes**, (i) les kératinocytes, dans une proportion de 80 %, les 20% restants se subdivisant en (ii) mélanocytes, (iii) cellules de Langerhans et (iv) cellules de Merkel.

Les kératinocytes doivent leur nom à la **kératine**, protéine fibreuse et insoluble à l'eau, qu'elles produisent abondamment et qui confère à la peau ses propriétés d'imperméabilité et de résistance mécanique (8). Le kératinocyte est une cellule épithéliale, c'est à dire une cellule comportant un cytosquelette, des tonofilaments, mais également un système de cohésion inter cellulaire indispensable : les desmosomes.

Les **kératinocytes** subissent au sein de l'épiderme un **processus de maturation** d'environ 3 semaines. Lors de celui-ci, ils migrent des couches basales vers les couches cornées (9). Lors de leur montée dans l'épiderme, les kératinocytes vont subir des modifications morphologiques et biochimiques : ils perdent alors leur fonction de prolifération au profit de leur capacité à se différencier, pour, en définitive, constituer la couche cornée qui assure la fonction de barrière cutanée (10). Ces modifications structurelles permettent de diviser les kératinocytes épidermiques en 4 strates que nous détaillerons de la profondeur vers la superficie.

La **couche basale**, ou *stratum germinativum*, présente des kératinocytes à l'activité proliférative maximale, celle-ci se traduit par l'existence de mitoses continues. Ils sont cubiques, liés entre eux par des desmosomes et reposent sur une lame basale à laquelle ils sont reliés par des hémidesmosomes (systèmes de jonction), qui contribuent à la solidité mécanique du tissu. La couche basale remplit un rôle de nutrition de l'épiderme (12).

La **couche épineuse**, aussi appelée *stratum spinosum*, est constituée de kératinocytes polyédriques de grande taille, liés entre eux par des desmosomes sur lesquels s'insèrent des tonofibrilles, agrégats de cytokératine (4).

La **couche granuleuse**, ou *stratum granulosum*, présente des kératinocytes plus aplatis qui ont perdu leurs organites. Le noyau apparaît fragmenté et on observe dans le cytoplasme des granulations basophiles, appelées granules de kératohyaline. Elles sont constituées de profilagrine, qui se transformeront en filagrine dans la couche cornée et formeront la matrice cytoplasmique des cornéocytes (11).

Enfin, la **couche cornée**, aussi appelée *stratum corneum*, est un assemblage cohésif constitué de cellules anucléées très aplaties composées presque exclusivement de kératine.

Ces cellules nommées **cornéocytes** sont d'anciens kératinocytes ayant achevé leur processus de maturation. Ils sont reliés entre eux par des cornéodesmosomes (3). Ces cellules sont riches d'un mélange de substances plus ou moins hygroscopiques qui assurent la fixation de l'eau. La couche cornée assure la fonction de barrière cutanée. Le phénomène de desquamation qui s'observe au niveau de la couche cornée est régulé par la cohésion entre les cornéocytes, assurée par les liaisons cornéocytes-cornéodesmosomes. Ainsi, la desquamation des cornéocytes est corrélée à la dégradation des cornéodesmosomes (8).

Les **mélanocytes** représentent 5 à 10 % de la population cellulaire épidermique. Les mélanocytes insinuent leurs dendrites entre les kératinocytes et leur transmettent des organites spécifiques (mélanosomes), où s'effectue la synthèse des mélanines (12). Ces dernières ont pour rôle de donner à la peau sa couleur. La répartition entre phéomélanines et eumélanines est à l'origine du phototype cutané (3). On compte généralement 1 mélanocyte pour 36 kératinocytes et cet ensemble constitue une unité mélanocytaire.

Les **cellules de Langerhans**, ou cellules dendritiques, sont visibles à la surface de l'épiderme, elles représentent environ 3 à 8% des cellules épidermiques. Produites au niveau des organes hématopoïétiques, elles migrent vers l'épiderme où elles joueront le rôle de cellules présentatrices d'antigènes. Elles assurent la défense immunologique de la peau via une réponse immunitaire de type cellulaire. Cette présentation antigénique induira soit une réaction de tolérance, soit une situation d'hypersensibilité (3).

Les **cellules de Merkel** constituent la quatrième population cellulaire de l'épiderme et ne représentent que 1% des cellules épidermiques (3). Ces cellules neuroépithéliales sont dispersées dans la couche basale et leurs prolongements cytoplasmiques s'infiltrant entre les kératinocytes. Elles sont productrices de neuromédiateurs et d'hormones ; ce sont par ailleurs des mécanorécepteurs qui enregistrent les stimuli vibratoires (13).

## ii. Jonction dermo-épidermique

La Jonction Dermo-Epidermique (JDE) est une région acellulaire située à la frontière entre le derme et l'épiderme. Elle sert de **moyen d'ancrage** aux cellules épithéliales ; elle intervient comme filtre pour leur nutrition et elle est indispensable pour leur survie et leur cicatrisation. La membrane basale est formée par l'union de deux feuilletts : la lame basale (lamina basalis) et la lame réticulaire (lamina reticularis ou fibroreticularis). La lame basale est un mince feuillet de glycoprotéines sécrété par les cellules épithéliales et la lame réticulaire est un feuillet de matériel extracellulaire sécrété par les cellules du tissu conjonctif sous-jacent. La lame basale est composée essentiellement par des protéoglycanes, de collagène de type IV, de molécules de fibronectine et laminine. La lame réticulaire contient des fibres de collagène de type III (aussi appelées fibres réticulaires) (14).

La JDE apparaît en microscopie comme une ligne ondulée où alternent les saillies de l'épiderme dans le derme, dites « crêtes épidermiques », et celles du derme dans l'épiderme, dites « papilles dermiques », la partie dermique de cette zone est appelée derme papillaire.

## iii. Derme

Le derme présente une épaisseur très variable selon les localisations, allant de 0,3 mm au niveau des paupières à 3 mm au niveau du dos (12). Véritable charpente de la peau, ce **tissu conjonctif** est constitué de cellules fixes (fibroblastes et mastocytes) ainsi que de cellules mobiles (cellules sanguines). À ces cellules s'associent des protéines fibreuses. La cohésion de l'ensemble est assurée par la matrice extracellulaire.

On trouve au niveau du derme des vaisseaux lymphatiques ou sanguins, des nerfs et des terminaisons nerveuses spécialisées qui comprennent les récepteurs nerveux sensitifs de Merkel et les corpuscules de Meissner (pour le toucher), les corpuscules de Pacini (pour la pression) ainsi que les corpuscules de Ruffini (récepteurs mécaniques). Le derme abrite également les annexes épidermiques incluant les glandes sudorales eccrines et apocrines ainsi que les follicules pilo-sébacés.

Ses fonctions principales sont d'assurer le maintien des propriétés mécaniques de la peau et de servir de réservoir d'eau.

Le derme est classiquement divisé en deux zones qui diffèrent par la composition et l'organisation de leur matrice extracellulaire respective (3).

Le **derme papillaire**, plus superficiel, est un tissu conjonctif lâche constitué de fines fibrilles de collagène de types I et III, isolées et orientées le plus souvent perpendiculairement ou obliquement par rapport à la JDE. Des fibres élastiques oxytalanées également orientées perpendiculairement à l'épiderme forment des structures en forme de chandelles.

Le **derme réticulaire**, plus profond, représente 80% de l'épaisseur du derme. C'est un tissu conjonctif plus dense composé d'un entrecroisement de faisceaux de grosses fibres de collagène et de fibres élastiques présentant une orientation préférentiellement parallèle à la surface de la peau. La transition entre un tissu fibreux et un tissu adipeux marque la limite inférieure du derme réticulaire.

Du derme papillaire au derme réticulaire, la cellularité diminue progressivement, laissant place à des structures fibreuses de taille de plus en plus importante (15).

Le derme est composé de nombreux types cellulaires.

Les **fibroblastes** ont pour fonction principale de produire ou de dégrader, et donc d'organiser les composants de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes ont une forte activité synthétique, ils sécrètent le collagène, l'élastine, la fibrilline, les composants de la matrice extrafibrillaire, des facteurs de croissance et des enzymes (dont des collagénases et des inhibiteurs de protéases matricielles pour dégrader, renouveler, réorganiser la matrice extracellulaire). Un même fibroblaste est capable de sécréter plus d'un type de collagène et de l'élastine simultanément. Il intervient également dans la régulation physiologique de la peau en sécrétant des cytokines et en jouant un rôle majeur dans les interactions dermo-épidermiques (15).

Les **mastocytes** sont des cellules mononucléées contenant des granules incluant des médiateurs chimiques comme l'histamine, la sérotonine, l'héparine et les prostaglandines. Ces cellules jouent un rôle dans des processus variés comme l'hypersensibilité immédiate, la réaction inflammatoire, les processus de défense parasitaire et la cicatrisation.

Les cellules migrantes retrouvées dans le derme sont des cellules sanguines : macrophages, lymphocytes et polynucléaires éosinophiles (16).

Le derme est composé d'une **matrice extracellulaire fibreuse**, plus de 90 % de ces fibres sont en réalité des molécules de **collagène**, principalement de types I et III. C'est le collagène qui confère la propriété de **résistance mécanique** à la peau. Ces fibres sont arrangées en faisceaux lâches au niveau du derme papillaire et resserrées au niveau du derme profond. On retrouve dans des proportions moins importantes des fibres de collagène de types IV ou VII, mais également des macromolécules d'élastine, fibres responsables des propriétés rétractiles de la peau (2).

Également nommée matrice extra-fibrillaire, la **substance fondamentale** est composée d'un mélange complexe d'eau, de protéoglycanes et de glycoprotéines. Cet ensemble comble l'espace présent entre la matrice extracellulaire fibreuse et les différentes populations cellulaires du derme. Les macromolécules de la substance fondamentale interagissent avec les différents éléments du derme (2). Les protéoglycanes (tels que l'acide hyaluronique, le dermatane sulfate, le chondroïtine sulfate ou la fibronectine) ont la capacité de capter les molécules d'eau, formant un réservoir aqueux sous forme de gel (4).

#### iv. Hypoderme

L'hypoderme ou **tissu adipeux blanc sous cutané** est un tissu adipeux lâche plus ou moins volumineux selon les régions de la peau et la nutrition de l'individu. Il n'existe pas de limite franche entre le derme et l'hypoderme ; on observe par rapport au derme un changement progressif dans la nature du tissu conjonctif. Comme le derme, il possède du collagène et un gel de protéoglycanes, mais il est de plus progressivement chargé d'adipocytes sous forme d'amas qui stockent les triglycérides. L'hypoderme est constitué de lobes eux-mêmes subdivisés en petits lobules graisseux séparés par des septums interlobulaires conjonctivo-élastiques servant de passage aux vaisseaux et nerfs destinés au derme (4).

L'**adipocyte** est constitué d'un espace intracellulaire comblé d'une grande vacuole remplie de triglycérides. Ces cellules de grande taille sont jusqu'à 8 fois plus grosses qu'une cellule classique (3).

## v. Annexes cutanées

Les ongles, l'appareil pilo-sébacé ainsi que les glandes constituent les annexes cutanées.

Les **ongles** sont formés de trois zones distinctes : la matrice, le corps et le lit. La croissance de l'ongle s'effectue à partir de la matrice. Le corps de l'ongle possède 3 couches suivant la rigidité de la kératine : profonde et molle, moyenne et dure, et enfin dorsale et semi-dure. Le lit de l'ongle est la couche épidermique sur laquelle repose l'ongle et à laquelle il adhère ; il présente des arêtes de rétention parallèles (12).

Les **follicules pilo-sébacés** comprennent le poil et ses gaines, le muscle arrecteur du poil et la glande sébacée. Au sein du bulbe pileux, au niveau de la partie inférieure du follicule, vont prendre naissance les kératinocytes. Ils génèrent la kératine constitutive du poil. La zone kératinocytaire est surmontée par la zone mélanocytaire responsable de la pigmentation (11).

On distingue deux types de **glandes sudoripares** (encore appelées sudorales) chez l'homme, en fonction de la composition de la sueur qu'elles secrètent. Les glandes sudorales **écrines** se répartissent sur la quasi-totalité du corps. Elles jouent un rôle important dans l'abaissement de la température corporelle. La sueur est composée d'eau ou d'électrolytes (principalement NaCl), elle contient par ailleurs de l'acide lactique, de l'ammoniaque et diverses protéines. Les glandes sudorales **apocrines** sont localisées principalement au niveau des zones génitales et axillaires. La sueur qui s'en dégage est composée de lactates et d'ions ; elle est le vecteur de phéromones (17).

## vi. Vascularisation cutanée

La vascularisation, lymphatique et artérioveineuse, parcourt l'hypoderme, le derme et s'arrête en dessous de la jonction dermoépidermique. L'épiderme n'est donc pas irrigué directement mais reçoit ses nutriments par diffusion à partir du derme.

En parallèle des voies veineuses se situent des voies lymphatiques au rôle considérable dans l'évacuation des déchets macromoléculaires qui ne peuvent être éliminés par la voie de la circulation sanguine (4).

## vii. Innervation cutanée

Elle concerne le derme et l'épiderme bien que l'épiderme ne renferme que des terminaisons nerveuses et non un réseau de nerfs comme le derme. On distingue au sein du derme différents types d'innervations.

L'innervation **végétative** provient des chaînes sympathiques paravertébrales. Ses fibres amyéliniques innervent principalement les vaisseaux sanguins et les annexes cutanées.

L'innervation **sensorielle** est quant à elle responsable de la sensation du toucher. Cette innervation parcourt l'hypoderme et se ramifie dans le derme pour aller innervier les follicules pileux. Ses axones sont issus des ganglions sensitifs crâniens ou rachidiens.

D'autres innervations rejoignent les corpuscules de Meissner (responsables de la perception tactile) et les corpuscules de Pacini (responsables de la perception de la pression et des vibrations). Par ailleurs, il existe dans l'épiderme des terminaisons libres qui ne sont pas reliées à des mécanorécepteurs et qui sont à l'origine de la perception de la douleur et de la chaleur (3).

## 1.2. La brûlure

L'Académie de Médecine définit la brûlure comme étant la **destruction** des téguments, voir des tissus sous-jacents, sous l'action d'un agent thermique (flammes, contacts liquides solides ou gazeux), chimique, électrique, ou de radiations ionisantes. La brûlure constitue un type de **plaie**, une plaie étant une solution de continuité au niveau du tégument cutané ou d'un épithélium de recouvrement, avec ou sans perte de substance, causée par un agent mécanique (18).

### 1.2.1. Etiologies

*Shehan Hettiaratchy et al.* dans l'article « Pathophysiology and types of burns » paru en 2014 dans le *British Medical Journal*, détaillent les différentes causes de brûlures (19).

### **i. Brûlures thermiques**

Elles peuvent résulter de toute exposition à une source de chaleur externe (flammes, liquides chauds, objets solides brûlants ou parfois vapeur). Les incendies peuvent également entraîner des inhalations de fumée toxique.



*Figure 3 : Brûlures thermiques d'après Hettiaratchy et al*

### **ii. Brûlures par rayonnement**

Elles sont le plus souvent dues à une exposition prolongée aux radiations solaires ultraviolettes (coup de soleil), mais peuvent être provoquées par une exposition prolongée ou intense à d'autres sources de radiations telles que les ultraviolets artificiels (e.g. séances de bronzage), les rayons X et d'autres radiations non solaires.

### **iii. Brûlures chimiques**

Elles peuvent être provoquées par des bases ou des acides forts (e.g. ciment), des phénols, des crésols, le gaz moutarde ou le phosphore et certains produits pétroliers (e.g. essence, solvant de peinture). Les nécroses de la peau et des tissus profonds, dues à ces agents peuvent évoluer sur plusieurs heures.



*Figure 4 : Brûlure suite à une projection d'acide sulfurique d'après Hettiaratchy et al*

#### iv. Brûlures électriques

Les brûlures électriques résultent de la libération de **chaleur** et de l'**électroporation** des membranes cellulaires associée à un courant massif d'électrons. Elles peuvent provoquer des lésions tissulaires importantes des tissus conducteurs de l'électricité, comme les muscles et les nerfs, alors que les lésions cutanées sont minimales.



*Figure 5 : Brûlure électrique de la pulpe des doigts d'après Hettiaratchy et al*

#### 1.2.2. Epidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2004, près de 11 millions de personnes dans le monde ont été victimes de brûlures graves nécessitant des soins médicaux. Par ailleurs, elle estime que chaque année, 265 000 décès sont provoqués par des brûlures, dont la grande majorité dans les pays à revenu faible ou moyen. Quelles que soient les régions du monde concernées, ce phénomène sanitaire est fréquent. Quand les brûlures s'avèrent non mortelles, elles sont l'une des principales causes de morbidité, d'hospitalisation prolongée, de défigurement et d'incapacités qui entraînent souvent ostracisme et exclusion. Le statut socio-économique de la victime s'avère être un facteur déterminant du risque de brûlure, que la comparaison s'effectue entre pays de niveaux de revenus différents ou au sein d'un même pays entre différentes classes sociales (21).

A l'échelle nationale, on décompte chaque année en France 200 000 cas de brûlures (22) conduisant à 12 000 hospitalisations et provoquant 450 décès (1).

L'incidence de ces accidents de la vie courante nécessitant des soins est d'environ 280 cas pour 100 000 habitants (23).

Le taux de survie des patients admis pour brûlures a constamment augmenté au cours des 40 dernières années. Il est actuellement de 97% chez les patients admis en centre des brûlés (24).

Lors du congrès Emois de mars 2016, *Pasquereau et al.* analysaient les étiologies des brûlures ayant conduit à des hospitalisations sur le territoire français et leur fréquence à partir des données issues du Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information (PMSI) de l'année 2011. 89 % des brûlures ressenties étaient accidentelles et 60 % s'étaient produites à domicile (26).

**Tableau 1 :** Taux d'hospitalisations pour motif de brûlures (pour 1000 personnes) selon l'âge, PMSI, France métropolitaine, 2011

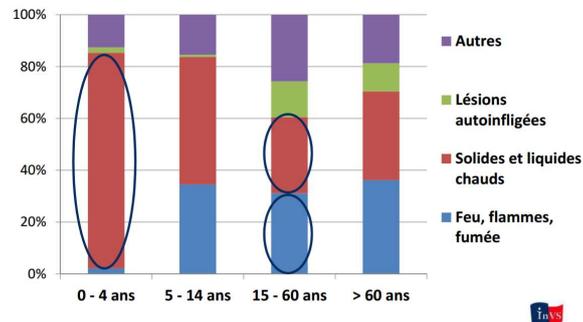
Tranche d'âge (ans)	Ensemble des brûlures			Brûlures graves		
	Total	Hommes	Femmes	Total	Hommes	Femmes
0-4	108	122	95	3,4	3,9	2,9
5-14	16	20	12	0,3	0,5	0,1
15-59	16	22	9	0,9	1,3	0,5
60 et +	11	13	9	0,8	0,9	0,8

**Tableau 2 :** Etiologies des brûlures ayant conduit à une hospitalisation sur le territoire français en 2011 d'après *Pasquereau et al*

		Effectif	%	DMS
Accidents	Feu flammes fumée	777	26	16
	Explosions	136	5	14
	Solides chauds	131	4	8
	Liquides chauds	1 126	38	8
	Gaz chauds	105	4	10
	Electricité	131	4	10
	Rayonnements	31	1	12
	Substances chimiques	124	4	4
	Autres, iatrogénie	21	1	8
	Accidents de transport	37	1	14
	Total	2 619	89	11
Lésions autoinfligées, suicides		294	10	18
Agressions		44	1	14
Total		2 957	100	12

DMS : Durée moyenne de séjour

Les parties du corps les plus fréquemment lésées étaient la tête et le cou (22 %), le poignet et la main (18 %), le tronc (16 %), la hanche et le membre inférieur hors cheville et pied (13 %) (22).



**Figure 6 :** Causes de brûlures par classes d'âge d'après Pasquereau et al

### 1.2.3. Coûts

La prévalence des brûlures, leurs panels de gravité et de prise en charge engendrent des dépenses de santé considérables. Ainsi, on estime aux Etats-Unis d'Amérique que le coût d'une hospitalisation pour brûlure oscille entre 1 187 dollars américains (US\$) pour un contact avec un liquide bouillant et 4 102 US\$ pour une exposition à des flammes (25). Par ailleurs, les dépenses Norvégiennes allouées à l'hospitalisation des brûlés sont estimées à 10,5 millions d'euros par an (26).

### 1.2.4. Physiopathologie de la brûlure

À la suite de la destruction des téguments, voire des tissus sous-jacents, induite par la brûlure, la réponse de notre organisme est à la fois **locale** et **systemique**.

#### i. Réponse locale

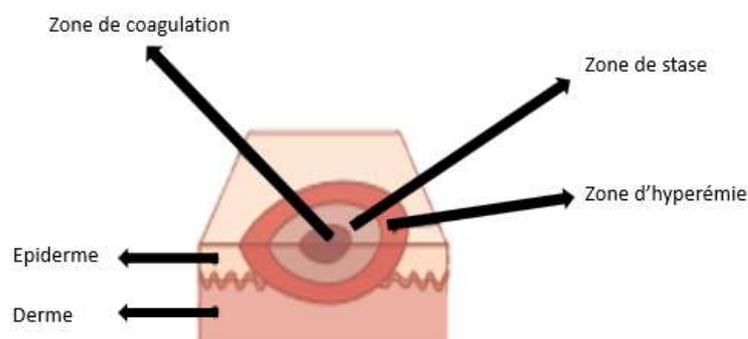
Localement, le site de la brûlure se décompose en **trois zones distinctes**, explicitées dès 1947 par Jackson.

La **zone de nécrose** est la partie centrale de la brûlure, localisée au point de dommage maximum. Le tissu brûlé est toxique pour l'organisme (27).

La chaleur induit des lésions cutanées au-delà de 44°C. On observera sur les tissus brûlés, de manière graduelle à l'augmentation de la température, dénaturation, dégradation et coagulation des protéines de cette zone. La coagulation des protéines constitutives du tissu conduit à la perte irréversible de celui-ci. La destruction et la lyse cellulaires sont responsables de la libération d'ions métalliques à l'origine de la libération d'espèces réactives oxygénées (*Reactive Oxygen Species, ROS*) (28). La perte de substance au niveau de cette zone implique une perte des fonctions protectrices de la peau et donc un risque infectieux (29).

La **zone de stase**, encore appelée zone d'ischémie, est caractérisée par une diminution de la perfusion tissulaire. Le tissu de cette zone est alors potentiellement récupérable (30). En l'absence d'intervention, l'hypoxie et l'ischémie de cette zone peuvent conduire à la nécrose des tissus dans les 48 heures faisant suite à la brûlure (31). Ce phénomène implique des processus d'autophagie, d'apoptose et de stress oxydatif, responsables de la libération de ROS par action de l'enzyme xanthine oxydase et dérivés du monoxyde d'azote (*Nitrogène Oxyde, NO*) (28). Dans le cas de brûlés graves, la réanimation des brûlures aura pour objectif d'augmenter la perfusion tissulaire dans la zone de stase, empêchant des dommages irréversibles supplémentaires. Dans le cas des brûlures non graves, le conseil de prévention donné au grand public de passer sous l'eau tiède la brûlure a pour objectif de préserver cette zone. Des comorbidités, comme une hypotension prolongée, une infection ou un œdème, peuvent conduire à la perte complète des tissus de cette zone, aggravant et élargissant la plaie (32).

La **zone d'hyperémie** présente une perfusion tissulaire augmentée du fait de la vasodilatation inflammatoire. Ce tissu sera invariablement récupéré, sauf complication secondaire à la brûlure telle qu'un sepsis sévère ou une hypoperfusion prolongée (19).



**Figure 7** : Zones distinctes de la brûlure selon Jackson d'après Hettiaratchy et al

La profondeur de la brûlure détermine les structures cutanées atteintes par l'agression.

Les **brûlures superficielles** sont composées des brûlures du premier degré et deuxième degré superficiel.

Les brûlures du **premier degré** affectent les couches superficielles de l'épiderme, mais avec conservation de la couche basale. Un érythème douloureux est alors visible par hypervascularisation dermique sous-jacente. La formation d'un œdème par vasodilatation secondaire des capillaires sanguins est possible. La douleur est liée à la libération de médiateurs chimiques et de prostaglandines. Enfin, un léger prurit peut être ressenti (33).

Les brûlures du **deuxième degré superficiel** correspondent à une atteinte totale de l'épiderme, y compris une partie de la membrane basale et une atteinte partielle du derme, à savoir du derme papillaire. Le signe clinique associé est une phlyctène, laissant ensuite à nu une érosion de couleur rose, suintante et douloureuse (34).

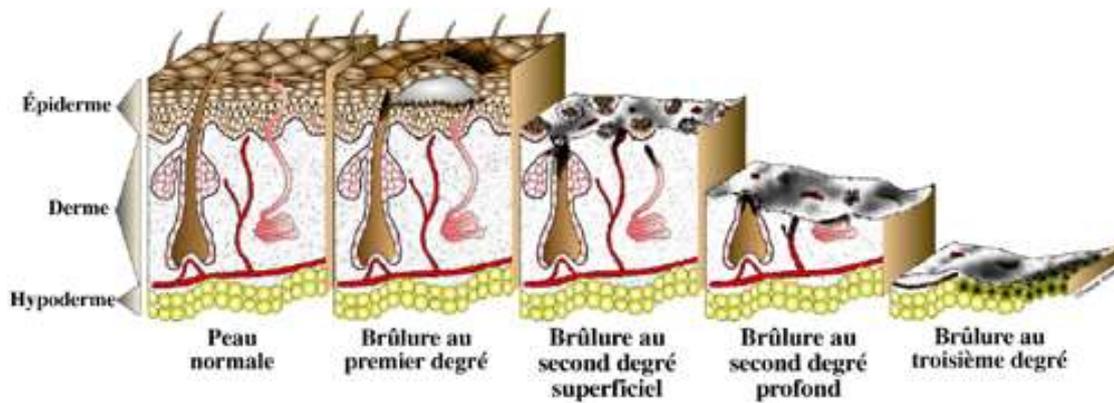
Les **brûlures profondes** incluent les lésions du deuxième degré profond, du troisième et du quatrième degrés.

Le **deuxième degré profond** correspond à une destruction de l'épiderme, du derme papillaire et du derme réticulaire avec toutefois préservation des annexes. Le signe clinique est une phlyctène à fond rouge brun, qui laissera par la suite à nu une érosion blanchâtre atone et hypoesthésique avec un décollement des annexes cutanées. Il faudra se montrer attentif au risque d'approfondissement secondaire (conversion en troisième degré) d'où la nécessité de réévaluation de la brûlure.

L'algie et la présence de saignements à la scarification différencient les brûlures du deuxième degré profond de celles du troisième degré (34).

Les brûlures du **troisième degré** affectent toute l'épaisseur de l'épiderme et du derme avec nécrose de coagulation du réseau vasculaire et disparition des annexes (34).

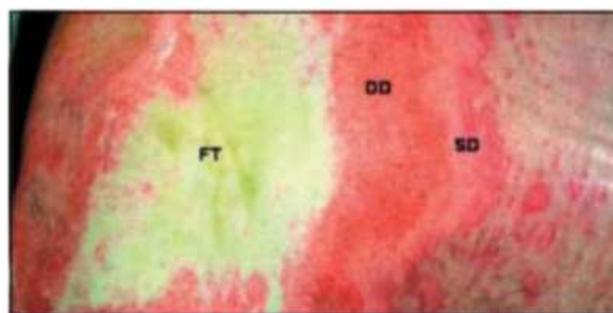
Le **quatrième degré** ou carbonisation correspond à une atteinte graisseuse et/ou musculaire. Le signe clinique associé est un aspect visuel blanc ou noir possiblement cartonné ainsi qu'une perte de sensibilité au niveau de la zone concernée (33).



**Figure 8 :** Degrés de brûlures et structures cutanées atteintes d'après Tran et al



**Figure 9 :** Brûlures polymorphes du premier et deuxième degrés d'après Hettiaratchy et al



**Figure 10 :** Brûlure polymorphe de premier, deuxième et troisième degrés d'après Hettiaratchy et al

*DD: Deep Dermal, brûlure du deuxième degré profond*

*FT: Full Thickness, brûlure du troisième degré*

*SD: Superficial Dermal, brûlure du deuxième degré superficiel*

## ii. Réponse systémique

La destruction étendue de la peau crée une masse nécrotique importante, une rupture de la barrière cutanée et engendre une **réaction inflammatoire** intense (cf. chapitre 1.3.2). Les kératinocytes, les cellules endothéliales et les polynucléaires neutrophiles attirés, sont activés. De nombreux médiateurs (endothéline, histamine, bradykinine, sérotonine, catécholamines, vasopressine, prostaglandines) ainsi que des ROS et des dérivés du NO sont libérés en grande quantité et agissent au niveau de la zone brûlée, mais aussi à distance (40) (28). On considère que la brûlure a un impact systémique à partir d'une surface cutanée correspondant à environ 20% de la surface corporelle (19).

Il existe un lien de corrélation positif entre l'étendue de la brûlure, l'état d'hypermétabolisme et l'inflammation. Par ailleurs, en cas de maintien de cet état, se met en place un retard de réépithélialisation (41).

On distingue classiquement deux phases de réponse de l'organisme à la suite de la brûlure. La première phase, couvrant classiquement les 48 premières heures, est appelée phase hydroélectrolytique et la deuxième phase qui dure jusqu'à la cicatrisation complète des lésions, est appelée phase métabolique. La durée et l'intensité de ces deux phases sont proportionnelles à la sévérité de la brûlure (28).

La **phase hydroélectrolytique** est caractérisée par une fuite liquidienne engendrant un phénomène de trou capillaire. Par ailleurs, une augmentation de la perméabilité cellulaire au sodium se met en place suite à la libération massive de médiateurs inflammatoires tels que des cytokines (IL-1, IL-6, IL-8), des kinines et des facteurs de nécrose tissulaire. Ces phénomènes ont pour conséquences une hypovolémie et la formation d'un œdème à proximité de la brûlure entraînant des compressions vasculo-nerveuses et perturbant la vascularisation des tissus adjacents à la brûlure. Au bout de 36 à 48 heures, cet œdème sera restitué entraînant d'une part, une polyurie et d'autre part, la libération d'exsudats au niveau de la lésion, conduisant à une perte liquidienne définitive. Ces exsudats sont constitués principalement d'eau, de sodium et de protéines, mais également de micronutriments (vitamines, oligoéléments et minéraux).

La **phase métabolique** fait suite à la réaction neuroendocrinienne à l'agression. Elle est caractérisée par un état hypercatabolique et une augmentation de la susceptibilité infectieuse (19).

La brûlure est responsable de **perturbations cardiovasculaires**. La perméabilité capillaire est augmentée, entraînant le passage de protéines et de fluides intravasculaires dans le compartiment interstitiel conduisant à une hypoalbuminémie, une hémococoncentration et à la formation d'œdèmes (29). Se met en place une vasoconstriction périphérique et splanchnique réflexe. La contractilité myocardique est diminuée. Ces changements, couplés à la perte de fluide au niveau de la plaie, entraînent une hypotension systémique et une hypoperfusion de l'organe final : c'est le choc des brûlés. Cet état nécessite une prise en charge incluant un remplissage vasculaire ainsi qu'une maîtrise pharmacologique et/ou chirurgicale de la composante inflammatoire (35).

La brûlure induit des **modifications respiratoires** ; en effet, les médiateurs inflammatoires provoquent une bronchoconstriction, pouvant aller dans le cas de brûlures graves jusqu'à un syndrome de détresse respiratoire (19). Par ailleurs, l'inflammation et le phénomène œdémateux peuvent être responsables d'un œdème pulmonaire (36).

Les brûlures s'accompagnent de **perturbations métaboliques**, un état de stress oxydatif local est amplifié secondairement par la phase inflammatoire de la cicatrisation. Cet état est associé à une production excessive de radicaux libres de type ROS et dérivés du NO. Ces **radicaux libres** sont des molécules ou des atomes instables, hautement réactifs, contenant à minima un électron à l'état singulet, responsable de réactions radicalaires en chaîne en l'absence de contrôle par les systèmes antioxydants de l'organisme. Bien que les ROS jouent un rôle essentiel dans le signalement cellulaire et la lutte antibactérienne, leur excès, qui dans le cas de la brûlure s'avèrera proportionnel à son étendue et sa gravité, provoque une oxydation aspécifique et irréversible de nombreuses molécules biologiques. Les radicaux libres sont en capacité d'oxyder les protéines, les polysaccharides, les acides nucléiques et les acides gras polyinsaturés, molécules endogènes les plus sensibles à leur action. Les membranes cellulaires, riches en acides gras polyinsaturés, sont alors rapidement oxydées sous l'action des ROS : c'est la peroxydation lipidique.

Enfin, ces ROS, en quantité importante, peuvent être responsables à distance d'un phénomène d'amplification de Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (SRIS) (28).

Le phénomène de brûlure est associé à une **consommation majeure d'antioxydants** (i) en réponse au stress oxydatif infligé par la brûlure (37), mais aussi (ii) en lien avec les pertes exsudatives secondaires à celle-ci. Les antioxydants endogènes incluent des molécules telles que l'acide urique, le glutathion, la bilirubine, l'albumine, les vitamines A, C et E, mais également des enzymes comme la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, les catalases et enfin des oligo-éléments tels que le zinc, le cuivre, le sélénium et le manganèse (28). La littérature est ainsi riche de descriptions des carences en zinc, cuivre, sélénium, vitamines A, C et E chez les brûlés graves non supplémentés en micronutriments (38) (39) (40) (41) (19).

Le rapport entre le taux de ROS et le taux d'antioxydants détermine l'évolution locale et à distance du tissu, justifiant la supplémentation en micronutriments des brûlés graves (cf. chapitre 1.5.4.) (37).

La phase secondaire de la brûlure est caractérisée par un état **hypermétabolisme**, le catabolisme basal augmentant jusqu'à trois fois son taux initial, qui justifiera une alimentation entérale hypercalorique du brûlé grave. Par ailleurs, les modifications hormonales engendrées par la brûlure induisent une hyperglycémie.

Une **régulation négative** non spécifique de la **réponse immunitaire** se produit et affecte à la fois l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale. On retrouve dans le plasma des substances immunosuppressives (prostaglandines E2, protéines de l'inflammation, toxines). On observe une diminution temporaire des taux de complément, de fibronectine et d'immunoglobulines. Les capacités d'épuration des cellules du système réticulo-endothélial sont dépassées. Après une hyperleucocytose initiale, suit une leucopénie d'une durée d'environ 7 jours, se traduisant par une diminution des polynucléaires et des lymphocytes. La réponse sécrétoire des lymphocytes B est diminuée du 8<sup>ème</sup> au 33<sup>ème</sup> jour (27). La brûlure est également associée à une diminution de la sécrétion des  $\beta$ -défensines. La translocation bactérienne à partir du tube digestif a été démontrée, la muqueuse voyant sa perméabilité augmentée en cas d'hypovolémie initiale (36).

Cette immunodéficience contribue à majorer le risque infectieux chez le brûlé, et peut amplifier un phénomène de SRIS préexistant susceptible de conduire à la défaillance multiviscérale. Les patients brûlés sont d'avantage susceptibles de mourir par sepsis du fait de la libération massive de médiateurs inflammatoires (42). Bien que l'inflammation soit partie intégrante du processus de cicatrisation, une inflammation aberrante, comme c'est le cas chez les brûlés graves, est responsable de cicatrisations pathologiques. La prise en charge des brûlés graves impliquera donc la maîtrise inflammatoire par des approches chirurgicales et pharmacologiques (36).

### iii. Complications infectieuses

L'infection constitue la **première cause de mortalité** chez le patient brûlé et s'avère d'origine **bactérienne** dans la majorité des cas. La prévalence des infections chez les brûlés est très variable selon les sources (13% de l'ensemble des patients hospitalisés aux USA entre 2003 et 2012, 19% des patients hospitalisés dans les Centres de Traitement des Brûlés français durant l'été 2006 ) et peut être comparée aux 13,1% de patients victimes d'infection au décours d'un séjour en réanimation générale (43). La perte de la barrière cutanée, l'utilisation de dispositifs invasifs et l'état d'immunodépression sont trois mécanismes concourant à la survenue de l'infection. Chez un patient inflammatoire, les signes infectieux généraux d'infection sont peu discriminants.

La majorité des infections secondaires à une brûlure sont **cutanées** ou à porte d'entrée cutanée. En effet, bien que les bactéries de surface soient détruites lors de la brûlure, celles localisées plus profondément, comme dans les annexes cutanées, sont en partie respectées. La brûlure, stérile durant les premières heures, est rapidement colonisée, initialement (dans les 48 h) par des bactéries cutanées (Cocci à Gram positif essentiellement) puis (fin de la première semaine) par des bactéries pouvant être d'origine digestive, ORL ou environnementales ainsi que par des fungi. *Pseudomonas aeruginosa* est un agent pathogène fréquemment incriminé en cas d'infection chez le brûlé. Les bactéries se logent préférentiellement à la jonction zone saine-zone brûlée, où l'environnement humide, chaud et riche en protéines s'avère propice à leur développement. Par ailleurs, la faible vascularisation de ces zones permet aux pathogènes d'échapper au système immunitaire (dysfonctionnant en outre chez les brûlés) et aux antibiotiques.

Le phénomène de colonisation participe activement à la détersion de la brûlure et peut être respecté s'il est contrôlé par des pansements régulièrement changés associés à un nettoyage et à l'utilisation de topiques antibactériens. Si une infection de la zone se produit, elle devra être traitée pour éviter sa généralisation et un retard de cicatrisation (44).

On retrouve également parmi les infections dont sont victimes les patients brûlés des infections en lien avec les dispositifs médicaux utilisés pour le monitoring de fonctions vitales. Les brûlés graves sont par ailleurs à risque de développement d'infection fongique. Les infections virales, principalement à CytoMégaVirus (CMV) et à Herpèsvirus, sont également volontiers réactivées chez les patients brûlés, responsables de 5% de la mortalité infectieuse chez ces sujets (45).

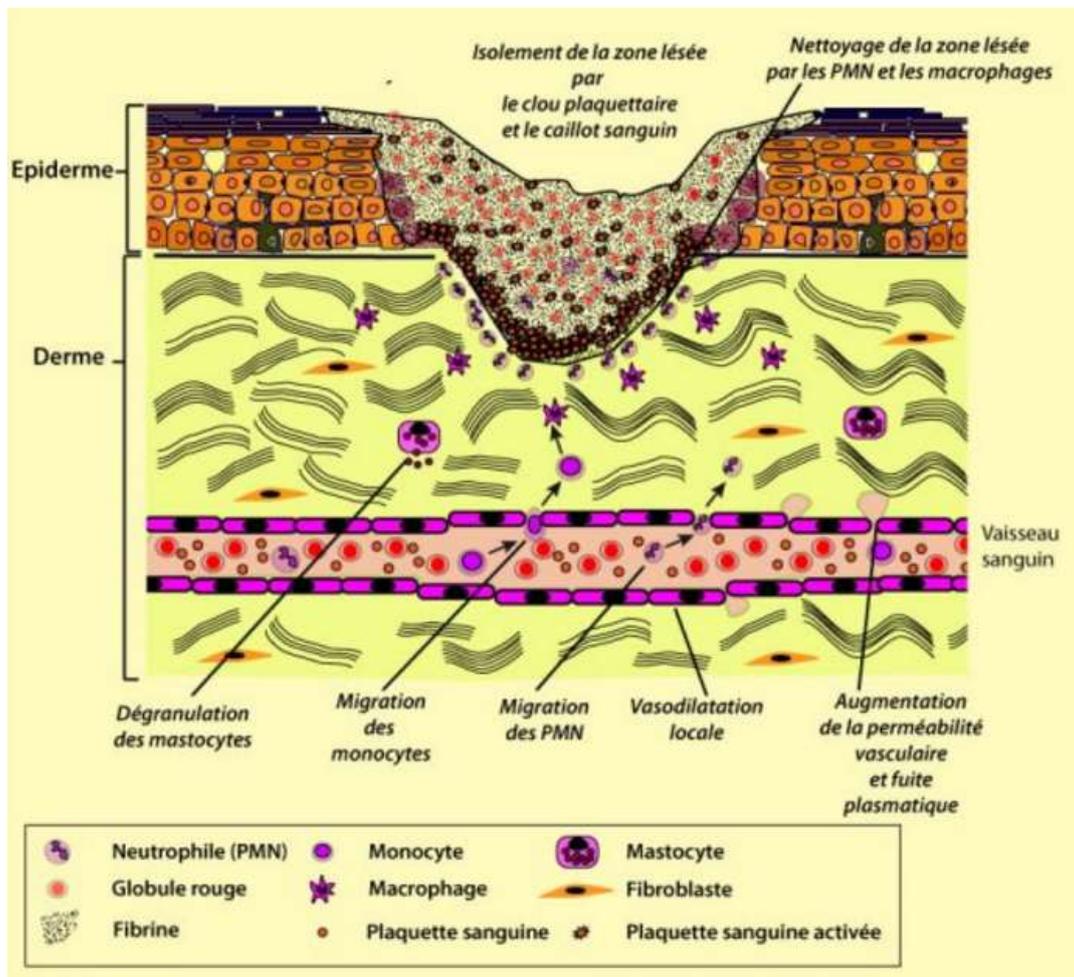
### 1.3. Cicatrisation cutanée

Quelles que soient son étendue et sa profondeur, par l'interruption de la structure anatomique et fonctionnelle qu'elle engendre sur la peau, la brûlure est à la fois une plaie et l'étiologie de celle-ci. La cicatrisation cutanée débute de façon concomitante à la brûlure.

La cicatrisation est un processus **dynamique** qui implique des événements coordonnés, incluant saignement, coagulation, réponse inflammatoire, régénération, migration, prolifération de tissu conjonctif et de cellules parenchymateuses, synthèse des protéines constitutives de la matrice extracellulaire, remodelage de ce nouveau parenchyme et dépôt de collagène. La cicatrisation implique des populations cellulaires résidentes et migrantes ainsi que des facteurs solubles.

Les mécanismes qui sous-tendent ce processus impliquent des médiateurs inflammatoires, des facteurs de croissance, des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire gouvernant la prolifération cellulaire, la migration et la différenciation, l'épithélialisation, la fibroplasie, l'angiogenèse, la contraction de la plaie et le remodelage. Une brûlure peut se décomposer en zones qui, à un même moment, se trouvent être à différentes étapes de cicatrisation. Il est à noter que dès lors qu'une perte de substance touchera le derme, on observe une phase vasculaire et une phase inflammatoire (46).

La cicatrisation est classiquement distinguée en 3 phases différenciables macroscopiquement : la **détersion**, le **bourgeonnement** et l'**épidermisation** correspondant respectivement à la dégradation des tissus nécrosés, au comblement de la plaie par du tissu conjonctif, puis au renouvellement de l'épiderme (47).



**Figure 11** : Phase d'hémostase et phase inflammatoire au cours de la cicatrisation  
d'après Démarchez et al

### 1.3.1. Phase d'hémostase et de coagulation

L'objectif principal de ce mécanisme est de prévenir l'exsanguination et donc le fonctionnement de l'organisme en dépit de la brûlure. Cette phase permet à plus long terme, de fournir une matrice dans laquelle pourront s'insérer les cellules nécessaires aux phases suivantes du processus de cicatrisation.

Le sous-endothélium vasculaire étant mis à nu, une plaie vasculaire est créée. Elle provoque la contraction de la couche musculaire circulaire des vaisseaux impactés et l'activation des mécanismes d'**adhésion plaquettaire** et de **coagulation** (48).

Le rôle du caillot est triple, (i) il assure la protection des tissus mis à nu par la lésion, (ii) il constitue une matrice provisoire permettant la migration des cellules endothéliales, inflammatoires et des fibroblastes mobilisés; enfin (iii), il sert de réservoir de cytokines et de facteurs de croissance libérés par la dégranulation des plaquettes activées (49). Le caillot formé est constitué d'un réseau de fibrine, fibronectine, vitronectine et thrombospondine.

Les plaquettes activées qui y sont enchâssées libèreront des facteurs de croissance et des cytokines comme le *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes), le *Transforming Growth Factor-β* (TGF- β, facteur de croissance transformant bêta) et l'*Epidermal Growth Factor* (EGF, facteur de croissance épidermique). Ces molécules jouent le rôle de promoteurs de la cascade de la cicatrisation en activant et attirant les polynucléaires neutrophiles dans un premier temps, puis dans un second temps les macrophages accompagnés des cellules endothéliales et des fibroblastes. Les plaquettes contiennent aussi des amines vasoactives telle que la sérotonine, responsables de la formation d'un œdème au niveau de la brûlure. Pour finir, les plaquettes libèrent aussi des eicosanoïdes et autres produits du métabolisme de l'acide arachidonique, qui au contact des membranes cellulaires adjacentes, joueront un rôle dans la réponse inflammatoire immédiate.

Cette phase conduit à un état d'hypocoagulabilité initiale par consommation (48).

### 1.3.2. Phase inflammatoire

La phase inflammatoire joue différents rôles : l'établissement d'une **barrière immune** au cours du processus de cicatrisation, la **dégradation du tissu nécrotique** (ou détersion de la plaie), mais aussi l'activation de signaux nécessaires à la réparation de la plaie (50). Elle se décompose en deux temps.

La **phase inflammatoire aigue** débute à la fin de la coagulation. Le système complément est activé et conduit à un afflux de **polynucléaires neutrophiles** sur le site de la brûlure.

Ils sont attirés dans les 24-36 heures suivant la brûlure par action conjointe de chimio attractants comme le TGF- $\beta$ , les facteurs C3a et C5a issus de l'activation du système complément, les produits de l'activation plaquettaire et les produits libérés par d'éventuelles bactéries. Les polynucléaires neutrophiles localisés initialement au niveau sanguin subissent un processus de diapédèse les conduisant au sein de la plaie. Ils pourront alors exercer leur activité phagocytaire vis-à-vis des bactéries, libérer des enzymes protéolytiques (comme l'élastase et des collagénases) et produire des réactifs oxygénés. L'activité neutrophilique, dès lors que la charge bactérienne sera éliminée, se verra diminuer. Cette étape s'achève par la transformation des polynucléaires en cellules remnantes et corps apoptotiques qui seront éliminés par les macrophages.

La **phase inflammatoire tardive** débute dans les 48-72 heures à la suite de la brûlure. Elle comporte comme cellules clés les **macrophages**, issus de la transformation des monocytes sanguins sous l'action de chimioattractants comme les facteurs de coagulation, des cytokines telles que le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*, facteur de croissance dérivé des plaquettes), le TGF- $\beta$  et le leucotriène B4. Les macrophages joueront, en plus de leur fonction phagocytaire, le rôle de cellules régulatrices car ils constituent un abondant réservoir de facteurs de croissance tissulaires, particulièrement le TGF- $\beta$ , mais aussi d'autres médiateurs tels que le TGF- $\alpha$ , l'EGF, le FGF (*Fibroblast Growth Factor*, facteur de croissance des fibroblastes) et les collagénases. Ces médiateurs auront pour rôle d'activer les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Les plaquettes et les macrophages à ce stade sont les principales sources de cytokines et de facteurs chimiotactiques (51).

Les dernières cellules à rejoindre la plaie durant cette phase inflammatoire tardive sont les **lymphocytes** ; ils sont attirés à partir de la 72<sup>ème</sup> heure après la brûlure par l'action de l'interleukin-1 (IL-1) et les composants du complément. L'IL-1 joue un rôle clé de régulation des collagénases ainsi que dans la production de composants de la matrice extracellulaire et leur dégradation. Vers le 5<sup>ème</sup>-7<sup>ème</sup> jour, peu de cellules inflammatoires persistent, les fibroblastes deviennent le type cellulaire prédominant (52).

Si l'inflammation s'avère aberrante, comme dans le cas des brûlures graves et étendues, elle entraînera une cicatrisation et des phénomènes d'œdèmes pathologiques. La maîtrise inflammatoire par des approches chirurgicales et pharmacologiques sera donc partie intégrante de la prise en charge des brûlés graves (36).

### 1.3.3. Phase proliférative

Commençant à partir du troisième jour suivant la brûlure, cette phase dure 10 à 15 jours et correspond à la prolifération des fibroblastes, à l'angiogenèse et à la synthèse de la matrice extracellulaire. Cette phase est largement dépendante des cytokines (53).

#### i. Migration des fibroblastes

Les fibroblastes et myofibroblastes des tissus avoisinant la zone brûlée sont stimulés pour proliférer dès le troisième jour suivant l'agression. Ils migrent au sein de la plaie, attirés par des facteurs comme le TGF- $\beta$  et le PDGF, libérés par les cellules inflammatoires et les plaquettes. Une fois dans la plaie, ils se multiplient et permettent le remplacement progressif du caillot de fibrine-fibronectine par la production des composants de la matrice-extracellulaire : hyaluronanes, fibronectine, protéoglycanes, procollagène types 1 et 3.

Une interaction dynamique et réciproque se manifeste entre la matrice extracellulaire et les fibroblastes. Les fibroblastes participent à la **synthèse** et au **remodelage matriciel** tandis que la matrice extracellulaire influence les fonctions des fibroblastes. La matrice et les cellules s'orientent selon les forces de traction auxquelles sont soumises la plaie et la cicatrice. Certains fibroblastes changeront d'apparence phénotypique, se convertissant en myofibroblastes capables de contraction, permettant ainsi le rapprochement des berges de la plaie (51).

#### ii. Angiogenèse et formation du tissu de granulation

L'établissement d'un nouveau réseau circulatoire est une étape critique de la cicatrisation, il prend place durant l'ensemble de son processus. Les cellules endothéliales résidentes libèrent un nombre important de facteurs angiogéniques incluant le FGF (*fibroblast growth factor*, facteur de croissance des fibroblastes), le VEGF (*vascular endothelial growth factor*, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), l'angiogénine, le TGF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$ . Une régulation fine est effectuée par des facteurs inhibiteurs tels que l'angiostatine et les stéroïdes.

Ces agents activateurs ou inhibiteurs de la prolifération endothéliale agissent de façon plus ou moins directe par activation de la mitose, promotion de leur mobilité ou stimulation de la sécrétion par les cellules résidentes de facteurs de croissance endothéliaux. La migration des cellules endothéliales s'effectue à partir du réseau vasculaire sain situé à proximité de la lésion. Les néo capillaires envahissent la matrice provisoire grâce à une interaction dynamique (54). Les macrophages, les fibroblastes proliférants, le stroma vasculaire associés à la matrice collagénique, au fibrinogène, à la fibronectine et à l'acide hyaluronique constituent le tissu de granulation remplaçant la matrice provisoire de fibrinogène. L'angiogenèse aboutit à la formation d'un réseau vasculaire indifférencié (bourgeon charnu), visible in vivo vers le 5e jour (36).

Le réseau capillaire se raréfie ensuite progressivement dans le tissu de granulation au fur et à mesure que le collagène est synthétisé et que la plaie évolue vers une cicatrice. La contraction de la plaie contribue à en rapprocher les berges ; elle est étroitement liée à la formation du tissu de granulation. Cette contraction est due à la transformation de certains fibroblastes en myofibroblastes capables de se contracter et de transmettre leur activité contractile au tissu environnant par interaction entre les protéines du cytosquelette et de la matrice extracellulaire (51).

### iii. Epithélialisation

L'épithélialisation est composée de plusieurs étapes, incluant la **migration** des cellules épithéliales à partir des berges de la plaie ou des annexes, leur **multiplication** et leur **différenciation**.

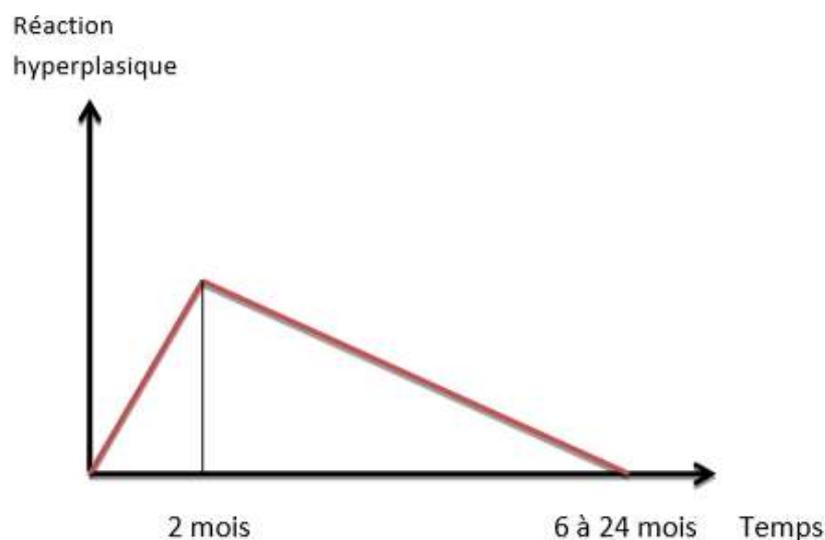
La synthèse de la JDE est concomitante et se produit par interactions derme-épiderme. L'épithélialisation est déterminante dans les plaies peu profondes comme les brûlures superficielles ou les dermabrasions. Les kératinocytes migrent sur les composants matriciels (fibronectine, collagènes I et IV, thrombospondine) en s'orientant eux-mêmes sur les fibres de collagène selon un phénomène appelé « contact guidance » (55). Lorsque la plaie est fermée par une monocouche de kératinocytes, ces derniers stoppent leur migration, se multiplient et se différencient selon leur phénotype de différenciation habituelle. La colonisation de l'épiderme par les cellules de Langerhans et les mélanocytes se produit par la suite (53).

### 1.3.4. Phase de remodelage

Le remodelage de la matrice extracellulaire est constitué de phases inflammatoires et prolifératives durant jusqu'à 2 mois après la fermeture de la plaie, suivies par une phase de régression pouvant persister 2 ans. Le tissu de granulation est peu à peu remplacé par un tissu cicatriciel caractérisé par une raréfaction des fibroblastes, suite à des phénomènes d'apoptose. Une structure collagénique plus dense apparaît, le réseau vasculaire se réorganise. L'acide hyaluronique et la fibronectine sont en partie dégradés. Le collagène permet l'obtention d'une résistance à la traction de la zone cicatricielle équivalente à environ 80% de celle retrouvée au niveau des tissus sains.

La **contraction de la plaie** s'achève aux environs du 21ème jour (55). Les métalloprotéases matricielles produites par les neutrophiles, les macrophages et les fibroblastes sont responsables de la dégradation du collagène. Leur activité est corrélée et synchronisée par des facteurs inhibiteurs, qui quant à eux, favorisent une accumulation matricielle. En conséquence, le dépôt initial de fibres désorganisées de collagène est progressivement remplacé par une matrice collagénique structurée. Ce processus est régulé par des cytokines telles que le TGF- $\beta$ , le FGF et le PDGF. La synthèse et la dégradation du collagène lors de la phase de remodelage atteignent l'équilibre 3 semaines après la brûlure.

Enfin, lorsque la plaie est cicatrisée, les densités fibroblastiques et macrophagiques sont réduites par apoptose (46).



**Figure 12** : Le remodelage cicatriciel, un processus évolutif d'après Dupre

### 1.3.5. Profondeur et étendue de la brûlure conditionnent sa cicatrisation

Une cicatrisation cutanée complète est définie comme le retour à une apparence, une fonctionnalité et une structure cutanée considérées comme normales dans un délai de temps raisonnable (56).

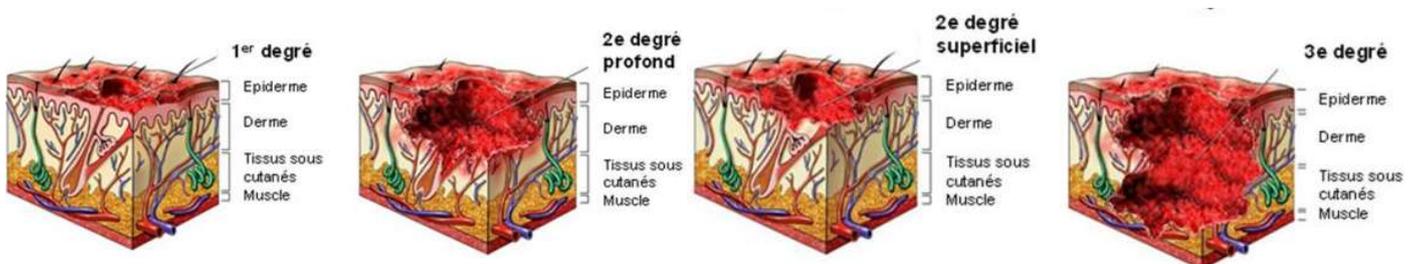
La cicatrisation des brûlures du **premier degré** est spontanée et s'effectue en 3 à 5 jours par desquamation accélérée et épidermisation à partir de la couche basale épidermique, sans prolifération du derme, intact dans ce cas (33).

Les brûlures du **deuxième degré superficiel** présenteront une cicatrisation spontanée en moins de 14 jours, avec dyschromie séquellaire possible (34).

Les brûlures du **deuxième degré profond** présentent deux possibilités d'évolution. La première, favorable, correspond à une cicatrisation conjonctive accompagnée d'une épidermisation spontanée lente à partir d'îlots épidermiques et d'annexes pilo-sébacées. Ce phénomène est alors lent (3 à 6 semaines) et l'apparition de cicatrices hypertrophiques est possible. La seconde, défavorable, correspond à une conversion en brûlure de troisième degré et donc à un approfondissement de la brûlure initiale.

Les brûlures du **troisième degré** ne peuvent cicatriser, la couche basale et les annexes pilosébacées étant détruites. Les possibilités d'épidermisation se limitent alors uniquement la périphérie de la brûlure, et ce pour des brûlures de très petite taille seulement. Dans les autres cas, une greffe de peau est nécessaire.

La cicatrisation des brûlures du **quatrième degré** n'est possible qu'à partir des berges, souvent éloignées de la zone brûlée. Le traitement chirurgical est alors obligatoire.



**Figure 13** : Influence de la profondeur de la brûlure sur la cicatrisation d'après Dupre

### 1.3.6. Facteurs systémiques et locaux modifiant la cicatrisation

De nombreux facteurs systémiques et locaux peuvent être responsables d'un retard de cicatrisation. La cicatrisation est modulée par l'**état général** (e.g. dénutrition), les **pathologies intercurrentes** d'impacts systémiques et/ou locales (e.g. infection systémique et insuffisance veineuse) et par l'**environnement de la plaie** (e.g. influence des pansements).

### 1.3.7. Interactions flore-plaies

Les interactions entre la flore et les plaies sont généralement décrites en trois phases : la **contamination**, la **colonisation** et l'**infection**. La colonisation et la contamination sont des proliférations de germes à la surface de la plaie, n'entravant pas la cicatrisation (57). En revanche, l'infection est une invasion par les germes des tissus sains périphériques et sous-jacents avec réaction de l'hôte comme la présence d'une fièvre, d'un érythème, de pus et d'un retard à la cicatrisation. L'infection induit un retard de cicatrisation (51).

### 1.3.8. Séquelles cicatricielles

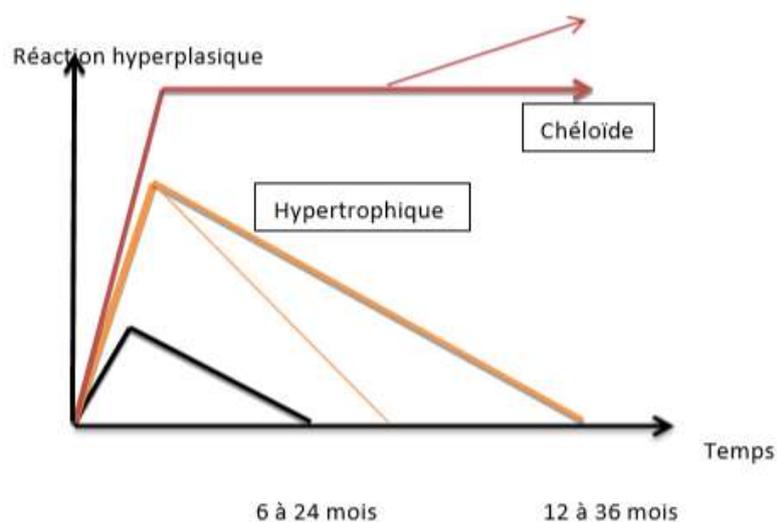
Les **cicatrices hypertrophiques** résultent d'une prolifération conjonctive abondante et sont riches en myofibroblastes. L'aspect histologique des fibres de collagène est anarchique et constitué de nodules. Ces cicatrices présentent un relief inflammatoire borné à la cicatrice. En 12 à 18 mois, les cicatrices hypertrophiques blanchissent spontanément et s'aplanissent, devenant plus souples et, dans la plupart des cas, retrouvent un aspect normal (58).

Les **cicatrices chéloïdes** résultent d'une prolifération inappropriée de fibroblastes, secondaire à un mauvais fonctionnement des collagénases. Elles sont riches en fibroblastes et ne contiennent pas de myofibroblastes. La cicatrisation des chéloïdes se caractérise par une modification d'intensité et de durée des phases de la cicatrisation. Une hypervascularisation est associée à un afflux cellulaire majoré caractérisé principalement par un surcroît mastocytaire. Les mastocytes sécrétant de l'histamine, ils sont responsables du caractère prurigineux de la cicatrice.

Dans les cicatrices chéloïdes, la synthèse de collagène est environ vingt fois supérieure à la peau saine et trois fois plus importante que dans le cas des cicatrices hypertrophiques. Le rapport collagène type I/type III est augmenté par rapport à une cicatrice normale.

*Oliver et al* ont constaté que les fibroblastes dérivés des cicatrices chéloïdes présentait un taux de fibronectine jusqu'à quatre fois plus élevé que celui des fibroblastes normaux.

Les chéloïdes apparaissent sur des terrains particuliers (siège thoracique et cervical) et continuent d'évoluer indéfiniment, pouvant ainsi déborder du siège initial de la cicatrice. Elles présentent un aspect nodulaire et peuvent devenir tumorales. Le caractère inflammatoire régresse dans le cas des cicatrices chéloïdes, de manière lente, celles-ci conservant leur volume et leur induration. Cliniquement, il est difficile de faire la différence entre cicatrices hypertrophiques et chéloïdes les six premiers mois (56).



**Figure 14 :** Profils évolutifs des cicatrices pathologiques d'après Dupre

Les **rétractions** sont une autre forme de séquelles, apparaissant en zone fonctionnelle. Elles se développent à partir des bords de la lésion, attirant ainsi, selon le principe d'économie, la peau saine vers le centre de la brûlure. Elles créent une perte de substance cutanée virtuelle, mise en évidence lors du débridement chirurgical. Schématiquement on peut décrire trois variétés de rétractions, déterminant des aspects différents selon leur localisation. Les brides linéaires se soulèvent sur les deux flancs des plages de peau saine en zone fonctionnelle.

Les brides en héli-placards ne laissent substituer qu'une partie cutanée intacte, occupant environ la moitié de la région topographique. Enfin, les placards cicatriciels ne présentent quant à eux aucun territoire normal environnant.

Les **pertes de substances** font suite à des brûlures très profondes avec carbonisation de la peau. L'impossibilité d'une autre prise en charge conduit généralement à l'amputation esthétique (dans le cas de zones comme le nez, les oreilles) ou à l'amputation fonctionnelle (si un membre est atteint) (56).

## 1.4. Diagnostic de la brûlure

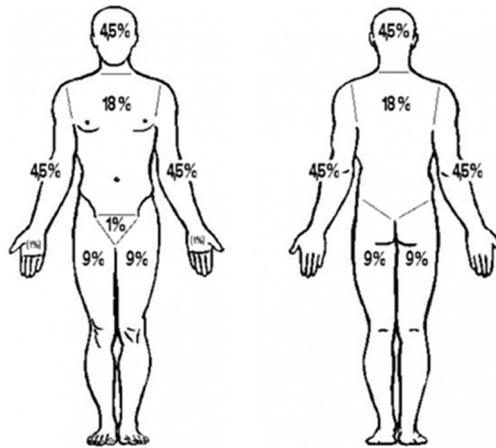
La gravité d'une brûlure dépend de la **surface** cutanée atteinte, de la **profondeur** de la brûlure, du **terrain** sous-jacent ainsi que des potentielles **lésions viscérales** associées (59) (60). Les principaux facteurs de risque de mortalité sont l'âge supérieur à 60 ans, une surface corporelle atteinte supérieure à 40 % et l'existence de brûlures respiratoires associées (61).

### 1.4.1. Surface cutanée atteinte

Une brûlure est jugée comme grave si elle touche 10 % ou plus de la surface corporelle d'un adulte, 5 % ou plus de la surface corporelle d'un enfant ou 5-10 % de la surface corporelle d'un sujet âgé en raison du risque de choc hypovolémique (61). Le pourcentage de Surface Corporelle Brûlée (SCB) peut être estimé par plusieurs moyens.

#### i. Règle des 9 de Wallace

Cette règle permet une estimation simple, bien que peu précise chez l'adulte. En effet, chez les enfants (considérant un âge inférieur à 10 ans), la surface de l'extrémité cervicale est proportionnellement plus importante. Le corps est divisé en zones représentant 9 % de surface corporelle (62).



**Figure 15 :** Pourcentage de surface corporelle par face selon Wallace  
d'après Chagvardieff et al

## ii. Table de Lund et Browder

C'est la méthode la plus pertinente d'évaluation de la surface cutanée atteinte. Elle prend en compte les modifications de forme du corps en fonction de l'âge, et permet donc une évaluation des zones brûlées chez tout type de patients (58).

**Tableau 3 :** Table de Lund et Browder d'après Chagvardieff et al

SURFACE							
Âge	N-Né	1 an	5 ans	10 ans	15 ans	Adulte	
Tête	9,5	8,5	6,5	5,5	4,5	3,5	x 2
Cou	1	1	1	1	1	1	x 2
Tronc	13	13	13	13	13	13	x 2
Bras	2	2	2	2	2	2	x 4
Av. bras	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	x 4
Main	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	x 4
Org. gén.	1	1	1	1	1	1	x 1
Fesse	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	x 2
Cuisse	2,75	3,25	4	4,25	4,5	4,75	x 4
Jambe	2,5	2,5	2,75	3	3,25	3,5	x 4
Pied	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	x 4
Paume de la main = 1 %							= 100 %

### 1.4.2. Profondeur des lésions

La profondeur fait la **gravité** de la brûlure et conditionne le mode de cicatrisation, sa longueur et sa rançon cicatricielle. L'estimation de la profondeur de la brûlure est essentiellement clinique (36). Chez un même patient, une brûlure peut être selon les zones de profondeur inégale, nécessitant une réévaluation quotidienne les premiers jours afin de ne pas méconnaître une aggravation de la profondeur qui pourrait alors modifier la conduite thérapeutique (8).

**Tableau 4 : Profondeur de la brûlure et signes associés d'après Carsin et al**

Profondeur	Deuxième degré superficiel	Deuxième degré profond	Troisième degré
<b>Niveau de l'atteinte</b>			
Epiderme	Destruction partielle	Destruction sauf follicules pileux	Destruction totale
Derme	Ecretement du derme papillaire	Destruction du derme papillaire +/- réticulaire	Destruction totale
<b>Signes Cliniques</b>			
Couleur	Fond rouge	Blanche avec piqueté rouge	Blanche avasculaire, Marron voir carbonisation
Douleur	++++	++	+ en périphérie
Sensibilité	++++	+/-	-
Exsudation	Phlyctènes extensives	Phlyctènes à paroi mince ou absence	Sèche
Adhérence des poils	++++	++	---
Elasticité de la peau	++++	+-	---
Décoloration recoloration à la pression	++++	++	---
<b>Evolution clinique</b>			
Cicatrisation	Spontanée en 10 jours	Aléatoire après 15 jours	Greffes

### 1.4.3. Terrains à risque

Les patients considérés comme à risque de gravité sont les sujets âgés de **moins de 5 ans** ou de **plus de 60 ans**. Les **comorbidités** à risque sont le diabète, l'insuffisance respiratoire, cardiaque ou rénale et l'immunodépression (56).

#### 1.4.4. Lésions associées

Les lésions associées aux brûlures peuvent être l'intoxication au monoxyde de carbone, les brûlures respiratoires (à suspecter en cas de brûlure de la face, des lèvres, du nez) et les lésions traumatiques (fractures, compressions musculaires).

#### 1.4.5. Pronostic

Il s'évalue à l'aide de scores. Nous développerons le score de Baux et la cotation UBS. Des algorithmes pronostiques plus complexes sont régulièrement mis au point tels que l'*Abbreviated Burn Severity Index* (ABSI, indice abrégé de gravité des brûlures) ou encore le *Cape Town modified burns score* (63). Il est à noter que le taux de mortalité des brûlures graves est de l'ordre de 3 %, faisant majoritairement suite à une défaillance multiviscérale, accompagnée dans 50% des cas de surinfection bactérienne (29).

##### i. Score de Baux

Ce score ne tient pas compte de la profondeur de la brûlure, il se calcule selon la formule suivante :

$$\text{Score de Baux} = \text{âge} + \text{surface brûlée (en \%)} + 15 \text{ en cas de tare associée}$$

< 50 : 100 % de survie

100 : 20% de survie

##### ii. Cotation UBS

La cotation UBS est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Cotation UBS [Unité Brûlée Standard]} = \text{surface brûlée} + (3 * \text{surface brûlée au 3}^{\text{ème}} \text{ degré})$$

< 25 : brûlure mineure

> 100 : brûlure grave

> 200 : brûlure mortelle

## 1.5. Prise en charge des brûlures

### 1.5.1. Conseils de premier secours

La prise en charge initiale de la brûlure conditionne son évolution. Les conduites à tenir suivantes doivent donc être connues du grand public :

- appeler les secours, éloigner le blessé de la source de la brûlure ;
- éteindre les flammes en faisant rouler la personne sur le sol ou en la recouvrant d'une couverture, ou encore en utilisant de l'eau ou un autre liquide permettant d'éteindre les flammes ;
- dans le cas d'une brûlure électrique, couper le courant ;
- lors de brûlures chimiques, éliminer ou diluer l'agent chimique en rinçant abondamment ;
- retirer les vêtements brûlés seulement dans le cas où ils ne collent pas à la peau ;
- *cooling* : refroidir les zones brûlées avec une irrigation douce pendant environ 15 minutes, certaines brûlures, notamment chimiques, nécessitant une irrigation plus longue. La température de l'eau doit être comprise entre 8°C et 25°C. Plus la zone brûlée est étendue, plus la température devra se rapprocher des 20°C afin d'éviter une hypothermie chez le patient ;
- envelopper les zones brûlées dans un champ stérile ou à défaut, un drap propre.

Il ne faudra pas :

- commencer les premiers secours avant d'assurer sa propre sécurité (éteindre l'électricité, porter des gants en cas de présence de produits chimiques, etc.) ;
- appliquer de pommade, d'huile ou du coton brut sur la plaie ;
- appliquer de la glace au risque d'approfondir la brûlure ;
- refroidir le brûlé de façon prolongée sous l'eau au risque d'une hypothermie ;
- enlever les vêtements adhérents ;
- percer les ampoules ou appliquer localement des médicaments tant que le patient n'a pas été placé sous traitement médical approprié (25).

### 1.5.2. Prise en charge préhospitalière

La prise en charge initiale des brûlures est focalisée sur la **recherche de signes de gravité**, qui, s'ils sont présents, conditionneront le transfert du patient vers des centres spécialisés (centre des brûlés), permettant ainsi une prise en charge multidisciplinaire avec des moyens techniques adaptés à la gravité de ces pathologies. La majorité des brûlures, simples et non graves, peut être prise en charge en milieu ambulatoire. Nous excluons de cette présentation les cas de brûlures électriques et chimiques. Enfin, il est à noter que la prise en charge préhospitalière des brûlures doit pouvoir répondre aux principaux risques encourus par le brûlé grave, à savoir durant les premières heures suivant la brûlure, le **choc hypovolémique** et par la suite, l'**infection** du fait de la nécrose cutanée et de l'immunodépression (33).

Elle comprend (i) l'anamnèse, (ii) le contrôle des fonctions vitales, (iii) la rééquilibration hydro-électrolytique au besoin, (iv) les premiers soins locaux fonction de la gravité de la brûlure : enlever les vêtements non adhérents, le refroidissement de la brûlure (*cooling*), si transfert vers centre des brûlés, utilisation de champs stériles et couverture de survie ; si transfert différé, nettoyage et désinfection locale ainsi que pansement occlusif stérile. Elle inclut également (vi) la réalisation d'un bilan lésionnel qui comprend le calcul de la SCB, l'évaluation de la profondeur des brûlures, l'existence de lésions associées et la prise en compte du terrain du patient (64).

Les indications d'hospitalisation en centre des brûlés sont constituées par la présence de **critères de gravité** incluant (i) une surface totale atteinte de plus de 10 % chez l'enfant ou le sujet âgé et 15 % chez l'adulte, (ii) la présence de brûlure du troisième degré. Les (iii) brûlures génitales, de la face, du cou, des mains, des pieds, de la région poplitée, des zones péri-orificielles ainsi que (iv) les brûlures circulaires constituent également des critères de gravité. Les (v) brûlures chimiques ou électriques, les (vi) brûlures non accidentelles, l'existence (vii) d'un terrain fragile (e.g. femme enceinte, comorbidités sévères) et la présence de (viii) lésions traumatiques ou encore la suspicion de (ix) brûlures pulmonaires associées sont également considérés comme des critères de gravité (65).

### 1.5.3. Brûlures bénignes : prise en charge en milieu ambulatoire

La prise en charge ambulatoire inclut la prévention du risque tétanique, des soins locaux, adaptés à la profondeur de la brûlure, un traitement général (antalgique au besoin : paracétamol) et des soins après cicatrisation de la brûlure (protection solaire, hydratation cutanée) (59).

Le risque d'**infection tétanique** augmente fortement après une brûlure, il est donc nécessaire de vérifier le statut vaccinal du patient brûlé. Dans le cas où la vaccination ne s'avèrerait pas à jour (absence de vaccination durant les cinq dernières années), un traitement prophylactique antitétanique doit être administré (66).

Les **soins locaux** sont composés du nettoyage et de la désinfection de la plaie, de l'excision des phlyctènes en cas de brûlures du deuxième degré et de l'application de produits topiques ou de la réalisation d'un pansement en fonction du degré de la brûlure (65). Il existe une très grande diversité de produits commercialisés destinés aux soins locaux des brûlures. Il est donc de la responsabilité des professionnels de santé concernés de disposer d'une bonne connaissance des grandes classes de médicaments et dispositifs médicaux destinés à cet usage, pour assurer une prise en charge adaptée et efficace des patients.

#### i. Nettoyage et désinfection de la plaie

Les antiseptiques agressifs tels que l'alcool et l'eau oxygénée ne doivent pas être utilisés pour désinfecter les brûlures ainsi que les produits contenant des colorants (e.g. éosine), le colorant pouvant nuire à l'examen clinique ultérieur de la plaie. On privilégiera un **antiseptique à large spectre incolore** tel que l'Amukine® (chlore 0,06 %), la Biseptine® (gluconate de chlorhexidine 0,25 %, chlorure de benzalkonium 0,250 %). L'application de Bétadine® (povidone iodée 10 %) est également possible suivie d'un rinçage. Un nettoyage préalable ou un rinçage au sérum physiologique peuvent s'avérer nécessaires en fonction de la brûlure et de l'antiseptique utilisé.

Enfin, l'utilisation de produits **moussants** s'avèrera particulièrement adaptée dans le cas des brûlures potentiellement souillées. On peut citer la Bétadine scrub® (povidone iodée 10 %) ou encore l'Hibiscrub® (gluconate de chlorhexidine 4 %) (60).

## ii. Brûlures du premier degré, objectif : épidermisation

L'application d'une préparation semi-solide topique, de confort, du fait d'une **cicatrisation spontanée** en 3 à 5 jours par desquamation accélérée, au-dessus de laquelle un pansement secondaire pourra éventuellement être apposé, est recommandée (67). Ces lésions peuvent être prises en charge à l'officine.

Les préparations semi-solides topiques pouvant être utilisées sont de types (i) hydrogels tel que l'Osmosoft®, (ii) émulsions huile dans eau telle que la Biafine® (0,67% trolamine), les laits après-solaires, le Dexeryl®, (iii) pommades grasses tel que le Cicatryl® ou la vaseline.

Nous décrirons ci-dessous les propriétés de quelques préparations semi-solides topiques. Osmosoft® est un hydrogel non collant, rapidement absorbé par la peau. Il est composé de carbomères et de glycérol. Cette préparation possède des propriétés hydratantes par sa capacité de rétention d'eau et apaisantes, par limitation de l'élévation de la température au niveau de la lésion. Il limite l'érythème par son caractère hyperosmotique (68).

Les préparations topiques suivantes, de par la présence d'excipients lipophiles dans leur composition, exercent un effet pro inflammatoire sur le tissu brûlé, favorisant la détersion de la plaie par les germes saprophytes et la mise en place du bourgeon charnu.

La Biafine® possède des propriétés analgésiques et des excipients émulsifiants, c'est un protecteur cutané, hydratant et émollissant (69). Dexeryl® est une crème huile dans eau aux propriétés hydratantes (70). Cicatryl® est une pommade grasse associant de l'allantoïne et de la vitamine E (cicatrisante), du parachlorometacresol (antiseptique) et du guaiazulène (agent anti-inflammatoire) (71). La vaseline exerce un effet occlusif sur la peau responsable de propriétés hydratantes. Elle ne doit pas être utilisée dans le cas de brûlures plus profondes car elle favorise la prolifération bactérienne à la surface de la plaie et peut entraîner une infection (72).

### iii. Brûlures du deuxième degré superficiel, objectifs : épidémisation et prévention de l'infection

Ces brûlures nécessitent une prise en charge médicale ambulatoire pour (i) lavage et désinfection de la brûlure, (ii) excision adaptée des phlyctènes, (iii) choix du pansement et (iv) évaluation à posteriori de la cicatrisation (48).

L'excision des phlyctènes sera effectuée à l'aide de matériel stérile, selon des modalités variables en fonction de leur taille (perçage ou excision du chapeau).

#### Pansement

Les qualités principales du pansement sont sa capacité à maintenir un milieu humide propice à la cicatrisation, sa non adhérence et sa capacité à absorber les exsudats. Il ne doit pas être douloureux et doit protéger la plaie contre les infections (65).

Une réévaluation de la brûlure accompagnée d'une réfaction du pansement (avec changement éventuel de catégorie en fonction de l'état de cicatrisation) sera effectuée toutes les 48 heures pour dépister une éventuelle aggravation. En effet, toute brûlure qui, après 10 jours d'évolution, ne présente aucun signe de réépidermisation, doit faire l'objet d'une consultation en centre spécialisé. Il est recommandé de respecter un délai d'attente maximal de **21 jours** sous peine d'exposer le patient à un retard de cicatrisation et des séquelles fonctionnelles importantes. Une greffe de peau mince devra être alors envisagée (56).

Différentes catégories de pansements sont disponibles (67).

Les **pansements membranes sans antibactérien**, associés ou non à des moyens de contention, couvrent la brûlure, la protègent, absorbent éventuellement les exsudats et maintiennent un milieu humide, favorable à la cicatrisation. Plusieurs sous-catégories sont disponibles : hydrocolloïdes (e.g. Duoderm Extra mince®), lipocolloïdes, hydrocellulaires, hydrofibres, membranes plus ou moins perméables, alginates. Le choix de la sous-catégorie sera fonction des caractéristiques de la brûlure (e.g. exsudative ou nécrotique). Ces pansements doivent être utilisés sur plaie propre et sous surveillance étroite.

Duoderm Extra mince® est un pansement hydrocolloïde composé (i) d'une couche interne constituée d'une matrice polymérique adhésive contenant des hydrocolloïdes et (ii) d'une couche externe constituée d'une mousse de polyuréthane. (73).

Les **interfaces sans antibactériens** doivent être associés à un pansement secondaire absorbant et à des moyens de contention (e.g. bandes). Ils évitent la macération et drainent les exsudats. On peut citer les tulles vaselinés, avec (e.g. Bactigras®) ou sans additifs (e.g. Jelonet®), les tulles siliconés ou encore les tulles avec hydrocolloïdes.

Jelonet® est composé de gaze hydrophile imbibée de paraffine. Cette compresse est non adhérente, aérée. La paraffine, excipient lipophile, exerce un effet pro inflammatoire, favorisant la détersion de la plaie par les germes saprophytes et la mise en place du bourgeon charnu. Bactigras® est une compresse tissée de gaze imprégnée de vaseline contenant 0,5% d'acétate de chlorhexidine.

*Les trois catégories de pansements suivantes seront privilégiées en cas de doutes sur l'hygiène, de zones brûlées très algues (faces palmaires des mains ou plantaires des pieds), ou en cas de brûlures étendues.*

Les **préparations semi-solides topiques avec antibactérien**, de type crème huile dans eau, incluent dans leur composition un antibactérien à large spectre destiné au traitement prophylactique local de l'infection. Elles doivent être associées à un pansement secondaire.

On peut citer la Flammazine® (1 % sulfadiazine argentique), le Flammacerium® (sulfadiazine argentique 1 %, nitrate de cérium 2,2 %), le laluset +® (sulfadiazine argentique 1 %), la Bétadine crème® (10 % povidone iodée), le Sulfamylon® (acétate de mafénide 5 %), et le Prontosan® (0,1 % polyhexanidine).

Les **interfaces avec antibactérien** évitent la macération, drainent les exsudats, sont composées de différentes sous-catégories et doivent être associées à un pansement secondaire absorbant et à des moyens de contention (e.g. bandes). Elles sont composées d'un antibactérien à large spectre destiné au traitement prophylactique local de l'infection. On peut citer l'Urgotul s.Ag® ou encore le laluset + compresses®.

Les **pansements membrane avec antibactérien** sont composés d'un antibactérien à large spectre destiné au traitement prophylactique local de l'infection. Tout comme les pansements membrane sans antibactérien, ils couvrent la brûlure, la protègent, absorbent éventuellement les exsudats et maintiennent un milieu humide, favorable à la cicatrisation. Plusieurs sous-catégories aux propriétés distinctes sont disponibles : hydrocolloïdes (e.g. Duoderm Extra mince®), lipocolloïdes, hydrocellulaires, hydrofibres, membranes plus ou moins perméables, alginates. Le choix de la sous-catégorie sera guidé par les caractéristiques de la brûlure (e.g. exsudative ou nécrotique), pour la mise en place d'un pansement aux propriétés adaptées (e.g. absorbant ou hydratant). Ces pansements doivent être utilisés sur plaie propre et sous surveillance étroite.

Acticoat® est un pansement absorbant composé de 3 couches: une centrale absorbante insérée entre 2 couches de polyéthylène recouvert de nanocristaux d'argent bactéricide (74). Aquacel Ag® est un hydrocolloïde contenant de l'argent ionique. Il est indiqué dans le cas des brûlures exsudatives.

Les **pansements secondaires** jouent un rôle protecteur, de renforcement et de recouvrement. Ils se divisent en deux catégories, (i) les adhésifs, incluant les films adhésifs semi-perméables, les pansements adhésifs stériles avec compresse intégrée et support adhésif au pourtour et les compresses stériles de coton hydrophile à bords adhésifs et (ii) les dispositifs non adhérents, avec des indications pour recouvrement des pansements primaires : les compresses stériles absorbantes non adhérentes, les compresses stériles non tissées et les compresses stériles de gaz hydrophile.

#### **1.5.4. Brûlures graves : prise en charge hospitalière**

Pour répondre aux risques vitaux engendrés par la brûlure, la prise en charge des brûlés graves nécessite une collaboration multidisciplinaire (incluant chirurgiens, anesthésistes réanimateurs, infirmiers, kinésithérapeutes, psychologues) dans un environnement adapté : le centre des brûlés.

La **prévention de l'infection**, principal facteur de mortalité chez les brûlés, constitue un objectif majeur tout au long de la prise en charge de ces patients (43). On entend par environnement adapté la présence de locaux, d'équipements et de personnel formé, à l'habillage et aux pratiques appropriés permettant le maintien d'une contamination microbiologique et particulière maîtrisée de l'air et des surfaces. L'habillage du personnel doit permettre la réduction de l'aérobiocontamination par les personnes : le port de casaque, masque, couvre-chef et gants stériles est indispensable au contact du malade. En effet, le brûlé présente un haut risque infectieux pour lui-même et pour les autres patients (66).

### **i. Phase initiale (avant 48h)**

Les objectifs de la prise en charge initiale des brûlés graves sont de **maintenir** les grandes **fonctions vitales** et d'obtenir une **couverture cutanée** précoce (75). Cette phase initiale inclut (i) l'isolement du patient, (ii) le diagnostic rapide et précoce des lésions (cf. chapitre 1.4.), (iii) la prévention antitétanique systématique, (iv) la réalisation d'exams de laboratoire, (v) des soins réanimatoires (monitorage hémodynamique, assistance ventilatoire et des autres fonctions vitales) si nécessaires, (vi) le traitement des intoxications associées, (vii) l'antalgie, l'anxiolyse et la sédation du patient si nécessaire. (60) La mise en place (viii) d'une alimentation entérale dans le cas des grands brûlés en prévention d'un syndrome d'hypermétabolisme ainsi que (ix) des soins locaux sont par ailleurs prodigués au brûlé durant cette phase initiale.

Chez les grands brûlés, la **nutrition entérale** hypercalorique et hyperprotidique est indispensable pour faire face à l'hypercatabolisme et pour obtenir une cicatrisation efficace. Les brûlés graves sont à risque important de déficit en micronutriments (éléments traces, et vitamines) (76). Une **supplémentation** en zinc, cuivre, sélénium, **vitamines B1, C, et E** par voie intraveineuse doit être systématique dès la prise en charge initiale et pendant plusieurs semaines, dans l'objectif d'améliorer la cicatrisation et de diminuer la morbidité notamment infectieuse (77).

L'antibioprophylaxie systémique n'est pas indiquée (78) à l'exception des administrations per-opératoires suite à des séances d'excision/greffes, génératrices de bactériémies, de l'existence de lésions périnéales, de lésions souillées ou profondes (43).

Le **traitement local** joue un rôle fondamental : les lésions cutanées provoquent et entretiennent d'une part la maladie générale du brûlé et sont d'autre part à l'origine de séquelles. La composante locale du traitement a pour objectifs la restauration du revêtement cutané par la cicatrisation des lésions superficielles et le remplacement des téguments au niveau des lésions profondes. Le traitement local du brûlé consiste en la réalisation (i) de pansements et/ou (ii) d'interventions chirurgicales.

On entend par pansement des actes spécialisés de brûlologie au décours desquels des gestes sont effectués, des bilans thérapeutiques sont posés et mis en pratique, et ce du fait du caractère évolutif de la brûlure. Les interventions chirurgicales sont principalement composées de séances d'excision/greffe, effectuées selon des modalités variables, en fonction des lésions et de l'état général du patient (79).

## **Nettoyage des brûlures**

Le nettoyage des brûlures est un aspect fondamental de leur prise en charge afin d'éviter la formation de biofilm (66).

Au Centre des Brûlés de Lyon Pierre Colson :

- Les vêtements adhérents sont enlevés par le personnel soignant.
- Le patient est lavé à l'aide d'antiseptiques moussants, Bétadine scrub® (10% povidone iodée) en première intention ou Hibiscrub® (gluconate de chlorhexidine 4 %) en cas d'allergie à l'iode.
- Il est ensuite rincé au sérum physiologique.
- Si le patient est en capacité d'être douché, la douche sera complétée de l'asepsie spécifique de chaque zone brûlée par antiseptique moussant et rinçage au sérum physiologique.
- Les phlyctènes sont mises à plat.

- Les peaux mortes et les croûtes sont retirées à la pince et aux ciseaux.
- Les poils sont rasés sur la brûlure et en périphérie, de même que les cheveux si le crâne est atteint.
- Un savonnage simple et un rinçage sont effectués (80).

Il est à noter qu'on retrouve dans la littérature un grande variété de protocoles de nettoyage-désinfection, incluant l'utilisation d'autres antiseptiques (e.g. Amukine®, hypochlorite de sodium 0.06 % en France; polyhexanide ou octenidine dans les pays germaniques (81)). Par ailleurs, la chronologie des étapes de nettoyage et d'antisepties peut elle aussi s'avérer variable, la réalisation d'un lavage au savon pouvant précéder la désinfection. Le choix de l'antiseptique est donc issu des données de la littérature incluant la prise en compte de son profil d'activité, de sa tolérance, de son efficacité et de sa sécurité chez le patient brûlé mais aussi des habitudes nationales et du service (82).

## **Urgences chirurgicales**

Avant de réaliser les pansements, le corps médical doit s'assurer de la présence ou non d'urgences chirurgicales.

Les **incisions de décharge** sont réalisées classiquement dans un délai de 6 heures au bistouri électrique en suivant l'axe du membre. Elles sont nécessaires en cas de brûlures profondes étendues des membres, du cou ou du thorax du fait du risque d'ischémie, de syndrome de loge ou de défaut d'amplification thoracique. La brûlure provoque une réaction inflammatoire intense qui entraîne une augmentation de la perméabilité capillaire et la constitution d'un œdème majeur au niveau des zones brûlées, à l'origine d'un gonflement des tissus sous-cutanés. En cas de brûlures du troisième degré circonférentielles, les tissus sous-cutanés ne peuvent s'expandre en raison de la rigidité de la peau brûlée sous-jacente. Ces incisions sont réalisées au bistouri électrique (83).



*Figure 16 : Incision de décharge sur main brûlée au troisième degré d'après Conti et al*

L'**excision-greffe précoce de sauvetage** constitue le traitement chirurgical de référence des brûlures graves. Les tissus brûlés libèrent dans l'organisme des composés toxiques à l'origine d'une réaction inflammatoire diffuse et de défaillances viscérales. Elle est effectuée le plus rapidement possible après l'accident, en pratique, dès que le patient est stabilisé du point de vue hémodynamique. Elle est en général limitée à 20% de SCB. Elle peut également s'avérer restreinte par l'étendue de la brûlure, conduisant dans ce cas, à différer l'excision de certaines zones. Elle est indiquée pour des brûlures du deuxième degré profond et plus. Le recouvrement des zones excisées sera immédiat.

La littérature est riche de démonstrations d'efficacité de l'excision-greffe précoce : elle réduit les pertes sanguines, la durée d'hospitalisation et le taux d'infection par rapport à la détersion spontanée des lésions profondes pratiquée autrefois. Elle augmente par ailleurs la prise de greffe. (36). La technique standard est l'excision tangentielle suivie d'une autogreffe de peau mince provenant d'un site donneur non brûlé. Toutefois lorsque la surface brûlée augmente, la surface de peau disponible pour prélèvement diminue, conduisant à l'utilisation d'alternatives transitoires ou définitives (66) (84).

## Pansement

L'*European Burn Association* (EBA, Association européenne des brûlures) stipule dans ses dernières recommandations publiées en 2017 que le choix du pansement dépend de la cause de la brûlure, de sa taille, de sa profondeur, du degré d'exsudation, de la présence éventuelle d'une contamination et de son coût. En effet, il n'y a pas de preuves cliniques directives pour soutenir le choix d'un pansement plutôt qu'un autre. Le choix du pansement est donc **fonction de l'environnement** sur lequel il sera appliqué. Elle précise également que la prévention de l'infection entraîne moins d'inflammation, une meilleure cicatrisation et moins de morbidité et de mortalité. Les crèmes topiques doivent avoir de bons effets antimicrobiens sans risque de résistance ou de réactions allergiques. Elles ne doivent pas laisser de boue sur le lit de la plaie. Enfin, elles ne doivent pas déshydrater la plaie et absorber suffisamment les exsudats pour permettre une cicatrisation en milieu humide (85).

Les recommandations publiées en 2016 par l'*International Society for Burn Injuries* (ISBI, société internationale pour les brûlés) dans le journal *Burns* spécifient que la littérature médicale actuelle n'est pas en mesure de désigner un pansement idéal qui s'adapterait à toutes les blessures ; elle en fournit toutefois les caractéristiques. Elle prend un positionnement divergent de l'EBA en recommandant l'utilisation de pansements fermés dans le cas des brûlures des deuxième et troisième degrés, ne promouvant donc pas l'utilisation de la prophylaxie anti-infectieuse topique en première intention.

L'ISBI définit une autre option pour les brûlures profondes, dite technique semi-ouverte. Elle consiste à appliquer des produits topiques sur la plaie et à recouvrir cet ensemble avec de la gaze. Cette méthode permet la ventilation de la plaie ainsi que des pertes thermiques, hydriques et électrolytiques minimales (66).

L'OMS émettait en 2004 des recommandations de prises en charge des brûlures graves, consistant dans l'application quotidienne d'antibioprophylaxie topique par nitrate d'argent ou sulfadiazine argentique ou mafénide (86).

La position française en matière de pansements des brûlures graves est différente de celle de l'ISBI : pour la *Société Française de Brûlologie*, l'utilisation de le Flammazine® est recommandée pour les brûlures du second degré étendues/profondes et les brûlures du 3ème degré chez l'adulte, selon son avis émis en 2017 à la demande de l'ANSM dans le cadre de la réévaluation du Bénéfice/Risque de la Flammazine®.

Les experts brûlologues interrogés précisait alors que la Flammazine® présente l'avantage d'être une crème épaisse couvrante, qui s'enlève facilement (contrairement aux crèmes iodées) et qui posséderait un pouvoir antalgique très intéressant en clinique. Cette préparation est également recommandée dans cette indication par la *Société Française et Francophone des Plaies et Cicatrisations* (87).

On constate ainsi à la lecture comparative de ces diverses recommandations l'**absence de consensus international** concernant les pansements à utiliser sur les brûlures des second et troisième degrés en centre des brûlés.

La sulfadiazine argentique (*Silver SulfaDiazine*, SSD) a longtemps été considérée de façon collégiale comme traitement de référence dans la prévention de l'infection chez le brûlé (88) (82), incluant l'utilisation de la Flammazine® (SSD 1%) mise sur le marché dans les années 1970, mais également du Flammacerium® (SSD 1%, nitrate de cérium 2,2%) diffusé en 1976 (81).

Le Flammacerium® est utilisé dans la prise en charge des brûlures profondes. En effet, le nitrate de cérium possède des propriétés tannantes protégeant les plans profonds par formation d'une croûte épaisse. Par ailleurs, il est responsable de la dénaturation d'un complexe protéique lipidique immunosuppresseur (89).

Le Sulfamylon® (acétate de mafénide 5%, actuellement sous Autorisation Temporaire d'Utilisation, ATU), est aujourd'hui indiqué en présence de germes résistants, en particulier *Pseudomonas aeruginosa* (90). On peut également citer le Prontosan® (0,1% polyhexanidine) et la Bétadine crème® (povidone iodine 10%) qui sont aussi deux antimicrobiens topiques indiqués dans le traitement des brûlures.

Le développement par les industriels de nombreuses classes de pansements incluant les catégories développées au chapitre 1.5.3. rend aujourd'hui possible l'utilisation de dispositifs spécifiques aux caractéristiques de la brûlure à chaque étape de sa cicatrisation, selon le principe de la cicatrisation dirigée. De nombreux pansements avec antibactériens sont également disponibles, contenant par exemple des nanocristaux d'argent. Certains de ces dispositifs, de mise sur le marché récente et de haute technologie, s'avèrent onéreux.

La littérature fournit ainsi de nombreuses études d'efficacité de faible niveau de preuve comparant ces pansements récents mais coûteux au traitement de référence que constitue la Flammazine® ; on retrouve aussi des synthèses voir des méta-analyses sur le sujet (91) (92) (93) (94). Certaines de ces études portent également sur des brûlés non graves au sens du chapitre 1.4., fournissant donc des résultats concernant des plaies qui ne rentrent en réalité pas dans le champ d'indication de la Flammazine®. Enfin, il semble important de noter que les brûlés graves constituent une population restreinte, permettant difficilement la réalisation d'essais cliniques dont le design permet d'atteindre un haut niveau de preuve (95).

Au Centre des Brûlés de Lyon Pierre Colson (CDBL-PC) :

- La réfaction du pansement est précédée du nettoyage de la plaie et est effectuée toutes les 24 heures.
- De la Flammazine® (1% sulfadiazine argentique) est appliquée en couche épaisse sur les tissus brûlés, elle est recouverte d'interfaces Jelonet® en évitant de réaliser des circulaires
- Un pansement secondaire incluant compresses ou rouleau de gaze, puis bandes Velpeau® ou Nylex® est ensuite apposé.

Dans le cas de localisation sur le visage :

- La Flammazine® sera remplacée par de la Fucidine® (fusidate de sodium 2 %) dans le cas des brûlures peu étendues.
- Un pansement occlusif avec Flammazine®, Jelonet®, puis un pansement secondaire occlusif, seront apposés sur les tissus brûlés (80).

## **ii. Phase secondaire**

La réponse systémique secondaire de la brûlure est marquée par le syndrome d'hypermétabolisme caractérisé par un catabolisme azoté majeur responsable d'une dénutrition sévère, d'une altération des capacités de cicatrisation et enfin d'une plus grande susceptibilité aux infections (96).

La phase secondaire de prise en charge des brûlés graves a donc pour objectifs principaux la **prévention du risque infectieux** et la **cicatrisation**.

Cette phase secondaire inclut :

- La poursuite de la prise en charge réanimatoire, l'état hémodynamique étant généralement stabilisé.
- L'évaluation des lésions et de leur évolution.
- La surveillance bactériologique des lésions par écouvillonnage (en principe hebdomadaire mais de fréquence augmentée devant toute suspicion d'infection).
- Les soins locaux.

Les équipes de réanimation conserveront les charges du monitoring hydroélectrolytique ainsi que de la surveillance et de l'équilibrage des constantes biologiques. Elles contrôleront l'apparition et traiteront d'éventuelles décompensations et infections. En cas d'apparition de signes généraux, une antibiothérapie probabiliste ou documentée selon la situation clinique, sera administrée. Les modifications pharmacocinétiques en lien avec la brûlure doivent être prises en compte par des adaptations posologiques.

En cas d'infection locale, un traitement local pharmacologique est effectué, associé à un traitement chirurgical au besoin. Une alimentation hypercalorique, hyperprotidique, riche en glucides, lipides, vitamines et oligoéléments, adaptée au malade, sera maintenue (85).

Lors de cette seconde phase de prise en charge des brûlés graves, deux attitudes vis-à-vis des tissus endommagés sont possibles opposant la thérapie conventionnelle à la thérapie excisionnelle (stratégie chirurgicale).

## Thérapie conventionnelle

Elle correspond à la **cicatrisation dirigée**. La réévaluation médicale régulière des tissus brûlés est associée à des soins locaux et des pansements. Le suivi de l'évolution des tissus lésés guide le praticien dans le choix des pansements adaptés au stade de cicatrisation de la zone brûlée, assurant ainsi un environnement adapté à la plaie pour optimiser les étapes de détersion, de bourgeonnement et d'épidermisation tout en intégrant la nécessité d'une prophylaxie anti infectieuse en cas d'absence d'épithélialisation. Les catégories de pansements disponibles sont détaillées dans le chapitre 1.5.3.

Les brûlures du deuxième degré profond cicatrisant en plus de deux semaines au niveau des zones fonctionnelles (mains, articulations, cou...) et en plus de trois semaines au niveau des autres zones (règle des 21 jours) doivent être excisées et greffées. En l'absence d'excision-greffe, le tissu de granulation se développe au niveau des plaies et entraîne la formation de cicatrices hypertrophiques et rétractiles (79).

## Thérapie excisionnelle

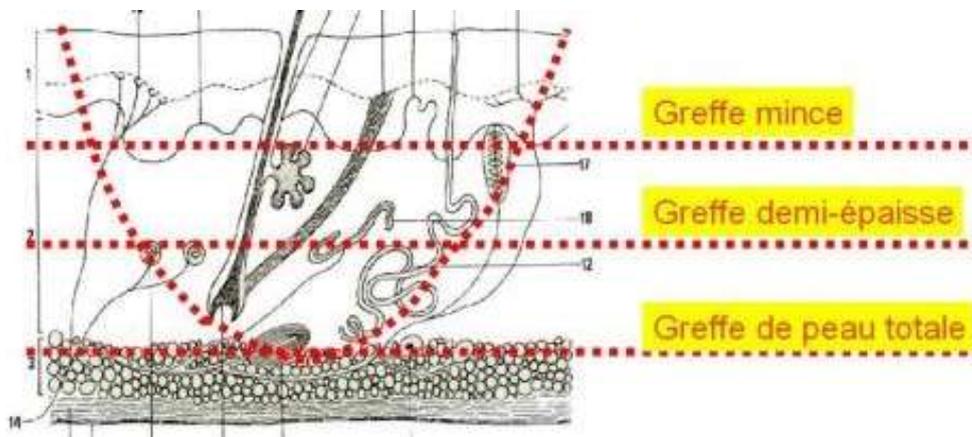
L'**excision-greffe précoce fonctionnelle** fait suite à l'excision greffe précoce de sauvetage ; elle est préconisée pour pallier aux risques esthétiques et fonctionnels de la cicatrisation sur des zones anatomiques telles que la main, le cou, le périnée, les plis de flexion des membres et les pieds. L'objectif de cette technique chirurgicale est de court-circuiter la formation du tissu de granulation, prévenant ainsi la formation de brides et de rétractions cicatricielles (29).

Il existe différents procédés excisionnels : (i) l'**excision tangentielle** est la méthode usuelle d'excision des tissus brûlés, réalisée au moyen d'un dermatome manuel (instrument à lame permettant l'exérèse successive de lamelles de tissu brûlé, jusqu'à obtention d'un sous-sol sain). (ii) L'**excision par avulsion** est réalisée chez les patients porteurs de brûlures très profondes. Cette technique consiste en l'ablation en monobloc de la peau brûlée et du tissu sous-cutané (graisseux) sous-jacent (79).

## Recouvrement cutané

Les excisions seront nécessairement suivies d'un recouvrement cutané, quelle que soit la nature de ce dernier (temporaire ou définitif, biologique ou de synthèse). Ce dernier doit permettre la réduction (i) des pertes hydroélectrolytiques et protéiques et (ii) du risque infectieux. Les possibilités de couverture cutanée sont nombreuses.

Les **greffes de peau** sont classées en fonction de leur épaisseur histologique en différentes catégories : peau mince et demi-épaisse, peau totale (97) .



**Figure 17** : Variabilité des greffes de peau en fonction de l'épaisseur du site donneur d'après Revol et al

L'**autogreffe** cutanée est effectuée immédiatement après l'excision des lésions. Elle consiste au prélèvement d'une greffe dermo-épidermique au niveau d'une région de peau saine (site donneur). En fonction de l'épaisseur du site donneur (valeur limite de 0,25 cm), on parlera de **greffe de peau mince** ou **demi-épaisse**. Ce site donneur est greffé au niveau de la zone brûlée excisée. Ces sites cicatrisent spontanément dans un délai conventionnel de 10 à 15 jours et peuvent être prélevés à plusieurs reprises. Les sites donneurs les plus fréquemment prélevés sont le cuir chevelu et les cuisses. La méthode standard est une greffe de peau mince excisée au dermatome.

Les **greffes de peau totale** sont des autogreffes comportant l'épiderme et la totalité du derme ; elles sont indiquées pour le traitement chirurgical des séquelles de brûlures et le traitement des brûlures des paupières, En effet, la présence d'une couche épaisse de derme empêche une forte rétraction de la greffe (97).

Chez les patients brûlés sur des surfaces importantes, l'**amplification de la surface des autogreffes** cutanées est nécessaire. Elle est effectuée à l'aide d'un **ampligrefe** qui transforme une bande de peau prélevée en un filet aux mailles plus ou moins larges, pouvant multiplier par 6 fois sa surface initiale. Cette méthode permet d'une part un gain de surface et d'autre part une amélioration de la prise de greffe par le drainage des exsudats et hématomes à travers les mailles du filet. Cependant, l'aspect maillé des greffes reste visible après cicatrisation complète (33).

Les **allogreffes cutanées** sont issues de donneurs. Elles constituent une couverture cutanée transitoire en jouant le rôle de pansement biologique temporaire, dans l'attente d'une autogreffe cutanée ou dans le but d'améliorer ou de préserver la qualité du sous-sol de la plaie après excision ; les allogreffes peuvent provenir de donneurs décédés, on parle alors de peau de cadavre (97).

La **xénogreffe cutanée**, issue d'une espèce différente, principalement de porc, permet un recouvrement cutané transitoire en promouvant la réépithélialisation et en préparant la plaie à l'autogreffe. Elle augmente le taux de cicatrisation en comparaison de la thérapie conventionnelle. Elle est moins onéreuse que l'allogreffe (98).

Les **lambeaux** sont des transferts tissulaires vascularisés par opposition aux greffes cutanées, coupées de leur vascularisation et nécessitent donc une « prise » parfois aléatoire. L'utilisation de lambeaux est nécessaire lorsque des éléments ne pouvant être greffés (os, tendon, nerf) sont exposés (97).

Une grande variété de **substituts cutanés** a été mise au point. Ils restent à ce jour l'objet de nombreuses recherches qu'implique toute innovation. L'avancée de ces techniques doit conduire dans le futur à réduire la surface des sites donneurs nécessaire au traitement des brûlés graves, diminuant ainsi le temps de cicatrisation des sites receveurs mais aussi donneurs, et augmentant le taux de prise de greffe comme la qualité cicatricielle.

Des travaux supplémentaires concernant ces thérapies cellulaires sont toutefois indispensables avant d'envisager leur implantation généralisée en première ligne de traitement, bien qu'elles disposent déjà à ce jour d'indications spécifiques (29). Cette revue non exhaustive a pour simple objectif d'éclairer le champ des possibilités offert par l'ingénierie tissulaire et le génie biomédical.

Les **feuilletts épidermiques cultivés en laboratoire** sont utilisés en cas de surface brûlée très étendue et de sites donneurs d'autogreffes cutanées insuffisants. Ces feuilletts sont produits à partir d'une biopsie de peau saine du patient, dont les cellules épidermiques ont été isolées, puis cultivées. Au terme du processus de culture, les cellules se stratifient pour former un feuillet épidermique (99).

Les **équivalents dermiques**, comme le Dermagraft® TC ou Transcyte®, correspondent à la culture de fibroblastes humains apposés sur une matrice résorbable. L'ensemble est alors mis en place sur la plaie.

Les **peaux reconstruites** incluent un épiderme et un derme artificiels séparés par une JDE, obtenus par ingénierie tissulaire.

Les **dermes artificiels** sont des supports biocompatibles favorisant par leurs propriétés chimiques et physiques l'activité des cellules de la peau (100). Leur utilisation se limite à un rôle de pansement ou de couverture temporaire. Ils peuvent être utilisés pour reconstituer le derme brûlé et aider à la restauration de l'élasticité et de l'aspect esthétique du tissu brûlé. On peut citer le dispositif médical Intégra®, qui est une matrice collagénique d'origine bovine acellulaire. Ce dispositif est secondairement revascularisé et réhabité par des fibroblastes au sein de la plaie (84).

Des travaux concernant l'utilisation des **kératinocytes** et des **cellules souches** dans le traitement de la brûlure sont régulièrement publiés, démontrant leur efficacité sur la cicatrisation. Les mécanismes d'action des cellules souches hématopoïétiques sur la brûlure ne sont pas totalement élucidés mais incluent une modulation de l'inflammation (101). Le rôle des **cellules souches adipocytaires** sur l'accélération de la re-épithélialisation par activité paracrine sur les cellules hôtes a été mis en avant par l'équipe de *Kim et al.* en 2007 (102). Des recherches sur les **cellules souches folliculaires** (103) et sur les **cellules souches non embryonnaires** sont également en cours.

### iii. Rééducation

Les séquelles cutanées des brûlures sont dominées par les **rétractions**, les **cicatrices hypertrophiques**, les **chéloïdes** ainsi que les **pertes de substance**. L'immobilisation prolongée, les complications en lien avec la prise en charge réanimatoire sont également source de complications. La rééducation devra être précoce, adaptée à l'évolution cicatricielle, aux temps thérapeutiques rythmés par la réanimation, la chirurgie, les séjours en centre de rééducation et réadaptation, le suivi à domicile et le traitement des séquelles. La mobilisation du malade, le port de vêtements compressifs, l'utilisation d'orthèses d'immobilisation et de posture pour permettre un étirement cutané majoré sont des axes clés de la prise en charge rééducationnelle. Le brûlé grave présente une forte diminution de sa qualité de vie du fait des conséquences fonctionnelles, esthétiques et psychosociales de la brûlure. Son suivi nécessite donc une prise en charge multidisciplinaire pendant au moins les deux années nécessaires à l'acquisition de la maturation cicatricielle (104).

---

## **Chapitre 2 : développement et étude d'efficacité ex-vivo d'une préparation topique anti-infectieuse et cicatrisante à 1% de sulfadiazine argentique pour le traitement des brûlures**

---

### **2.1. Parties prenantes**

2.1.1. Demandeur

2.1.2. Exécutants

### **2.2. Aspects réglementaires**

2.2.1. Généralités

2.2.2. Faisabilité

2.2.3. Matières premières à usage pharmaceutique

2.2.4. Stabilité

### **2.3. Intérêt pharmacothérapeutique**

2.3.1. Flammazine®, crème à 1% de sulfadiazine argentique

2.3.2. Vitamines A, C et E

### **2.4. Préformulation : choix de dérivés vitaminiques estérifiés**

2.4.1. Palmitate de rétinyle

2.4.2. Acétate de tocophérol

2.4.3. Palmitate d'ascorbyle

2.4.4. Effets synergiques d'une supplémentation vitaminique combinée

2.4.5. Conclusion

### **2.5. Partie expérimentale**

2.5.1. Matériel et Méthodes

2.5.2. Résultats

2.5.3. Discussion

2.5.4. Conclusion

## 2.1. Parties prenantes

### 2.1.1. Demandeur

Cette étude de développement pharmaceutique a été initiée sur demande du Docteur Christo Shipkov, chirurgien plasticien, praticien hospitalier au CDBL-PC, situé au sein de l'*Hôpital Edouard Herriot (HEH), Groupement Hospitalier Centre (GH-Centre), Hospices Civils de Lyon (HCL)*.

Le CDBL-PC constitue l'unique centre de traitement des brûlés de Lyon. Il a été labellisé centre de niveau européen et est le plus grand centre de ce type en France ; enfin il ambitionne de devenir le plus grand centre des brûlés européen. Il regroupe les activités de prise en charge de la brûlure (urgence, réanimation, rééducation et chirurgie) sur un site disposant de 30 lits. Le service de chirurgie a pour vocation la prise en charge des patients post-greffe ou avec des brûlures lourdes, hospitalisés pour des pansements, sédations profondes, patients non autonomes ou en attente d'un transfert en soins de suite et réadaptation (105).

La demande du Dr Shipkov était de **développer** une **préparation topique anti-infectieuse** cicatrisante destinée au **traitement des brûlures actuellement prises en charge par Flammazine®** au sein du CDBL-PC, nous suggérant l'intérêt d'étudier une **supplémentation** de type **vitaminique**.

Le protocole Pansement du CDBL-PC préconise l'utilisation systématique de la Flammazine® sur les zones brûlées non épidermisées, non greffées, non situées sur le visage et non nécrosées (cf. **annexe 1**).

En cas d'efficacité de cette préparation, un essai clinique institutionnel serait mis en place.

## 2.1.2. Exécutants

### i. Plateforme FRIPHARM

La demande de projet formulée par le Dr Shipkov a été étudiée par la plateforme FRIPHARM dans le cadre de son activité de développement pharmaceutique institutionnel.

La plateforme FRIPHARM est une plateforme de **développement hospitalo-universitaire** dont l'activité comporte la **préparation** par des pharmacies hospitalières de médicaments destinés à des patients hospitalisés dans les établissements de santé, la prise en charge pharmaceutique d'essais cliniques comportant la mise en forme de médicaments, des axes de recherche avec des équipes labellisées développant des molécules d'intérêt thérapeutique. FRIPHARM® assure le transfert de la recherche et du développement vers la clinique. Elle est composée de l'Unité de Préparation et Contrôle du Médicament (UPCM) de la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) de l'HEH GH-Centre et du Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle, UMR 5305 de la Faculté de Pharmacie de Lyon (106). Cette plateforme est actuellement dirigée par le Professeur Fabrice Pirot.

### ii. Collaborateur en tant qu'évaluateur préclinique : Banque de Tissus et Cellules

La *Banque de Tissus et Cellules des Hospices Civils de Lyon (BTC/HCL)* a été créée le 10 juin 1999 par le Docteur Odile Damour; elle est actuellement dirigée par le Docteur Céline Auxenfans. Elle possède des activités cliniques ainsi que de recherche et développement. Celles-ci concernent l'**ingénierie tissulaire** de la peau, de la cornée et du cartilage. C'est un centre de ressources biologiques qui travaille en collaboration avec des structures publiques tel que l'UPCM et le CDB-PC, mais également avec des entreprises privées. La BTC/HCL collabore dans le cadre de ce projet avec l'UPCM en tant qu'évaluateur de l'efficacité des préparations en développement.

## 2.2. Aspects réglementaires

### 2.2.1. Généralités

Les *Bonnes Pratiques de Préparation* (BPP) constituent le texte de référence **opposable**, destiné à garantir la qualité des préparations pharmaceutiques réalisées, entre autres, dans les établissements disposant d'une **PUI** dûment autorisée. Ce référentiel s'applique à l'ensemble des préparations, notamment magistrales, hospitalières, ou rendues nécessaires par les recherches biomédicales. Emises par l'ANSM, la décision d'application de ces BPP a été publiée au Journal Officiel (JO du 21/11/2007).

Il est à noter que les BPP concernent les préparations réalisées en PUI en **petites séries** (moins de 300 unités galéniques par lot), destinées à un ou plusieurs malades, en cas d'inexistence ou d'indisponibilité d'un médicament soumis à une autorisation de mise sur le marché. Pour la production à l'échelle industrielle, le référentiel opposable applicable sera différent, il s'agit des *Bonnes Pratiques de Fabrication* (BPF) (107).

Les BPP définissent les exigences réglementaires associées (i) aux **activités de fabrication** et de **contrôle** de telles préparations, portant notamment sur les locaux, le personnel, le circuit des matières premières et des préparations. Les BPP spécifient également les exigences associées à (ii) la **gestion** de la **qualité** et de la **documentation**, (iii) la gestion des **anomalies**, des retours, des réclamations et rappels de lots, (iv) la **sous-traitance** des préparations, des contrôles et du transport, (v) la préparation de **médicaments stériles**, (vi) la **préparation** de médicaments contenant des **substances dangereuses** pour le personnel et l'environnement, (vii) la réalisation de préparations rendues nécessaires par les **recherches biomédicales**, y compris les préparations de médicaments expérimentaux. Enfin, elles précisent également les exigences associées à la (viii) préparation de **médicaments radiopharmaceutiques** (107).

Le **projet de développement** d'une préparation topique anti-infectieuse cicatrisante destinée au traitement des brûlures actuellement prises en charge par Flammazine® étant étudié par la plateforme hospitalo-universitaire FRIPHARM, dans les objectifs (i) d'une production au sein de la PUI de l'HEH GH-Centre et (ii) de l'éventuelle réalisation d'un essai clinique institutionnel concernant l'évaluation d'une telle préparation alors rendue nécessaire par la recherche biomédicale, **sa structuration doit répondre aux exigences des BPP**.

### 2.2.2. Faisabilité

Le chapitre 3 des BPP spécifie que la décision d'exécution d'une préparation au sein d'une PUI est prise par un pharmacien responsable suite à la réalisation d'une **étude de faisabilité**.

On entend par faisabilité l'appréciation, en vue de sa réalisation, de la conformité d'une préparation à l'état des connaissances scientifiques, médicales et techniques.

Cette étude de faisabilité est effectuée en considérant (i) l'**intérêt pharmacothérapeutique**, (ii) le **bon usage** de la préparation (en termes d'objectif et d'ajustement thérapeutiques, de meilleure acceptabilité, d'observance renforcée, de diminution des risques, de traçabilité de la prise) et (iii) le **risque sanitaire** vis-à-vis du patient. L'étude de faisabilité inclut également une évaluation de (iv) la **galénique** de la préparation et des **contrôles** associés à cette dernière, en termes de réalisation technique (formulation, personnel, matériels, locaux). Enfin, l'étude de faisabilité est effectuée (v) en conformité avec les **textes en vigueur** (interdictions, restrictions, substances vénéneuses, disponibilité de spécialités pharmaceutiques adaptées).

Cette évaluation de faisabilité réalisée conformément à une **procédure écrite**, fait l'objet d'un compte-rendu qui met notamment en évidence les **points critiques** éventuels de la réalisation de la préparation. Elle permet au pharmacien de justifier la décision de réalisation ou de non-réalisation de la préparation.

Le formulaire de faisabilité de l'UPCM de la PUI de l'HEH GH-Centre est disponible en **annexe 2**.

Le développement d'une préparation topique anti-infectieuse cicatrisante destinée au traitement des brûlures actuellement prises en charge par Flammazine® doit donc être effectué en regard des critères d'évaluation de la faisabilité d'une telle préparation au sens des BPP.

### 2.2.3. Matières premières à usage pharmaceutique

Selon les BPP, les Matières Premières à Usage Pharmaceutique (MPUP) répondent aux spécifications de la Pharmacopée quand elles existent et sont conformes à la monographie de la Pharmacopée « substances pour usage pharmaceutique ».

Seules les matières premières répondant aux spécifications de la Pharmacopée sont utilisées pour l'exécution des préparations, sauf en cas d'absence de matière première répondant aux dites spécifications disponible et adaptée à la réalisation de la préparation considérée (107).

Les BPP spécifient que les MPUP utilisables pour les préparations peuvent provenir de différentes sources, à utiliser selon un ordre de priorité déterminé.

Concernant les matières premières hors spécialités pharmaceutiques, en fonction du type de fournisseur, les exigences réglementaires en termes de contrôle permettant de qualifier la MP sont différentes (107).

Les BPP stipulent également que si, à défaut d'une matière première disponible, une spécialité pharmaceutique est utilisée, aucun contrôle de celle-ci n'est exigé au titre de matière première (107).

Le choix des matières utilisées dans le cadre du projet de développement d'une préparation topique destinée au traitement des brûlures doit prendre en compte les exigences des BPP, privilégiant l'utilisation de **matières premières disposant d'une monographie** spécifique au sein de la Pharmacopée Européenne (PhE).

Concernant l'**utilisation de spécialités pharmaceutiques injectables** pour la fabrication de préparations par les PUI, bien que dans un contexte général, les BPP recommandent leur usage pour la formulation des préparations en 4<sup>ème</sup> intention, ce texte réglementaire stipule que leur utilisation est recommandée en 1<sup>ère</sup> ligne dans le cas de la production par les PUI de préparations injectables, suite à la réalisation d'une étude de faisabilité.

Bien que la préparation anti-infectieuse et cicatrisante en développement soit destinée à une application topique et non à une administration intraveineuse, le caractère **stérile** des spécialités commerciales injectables, d'une part, et la présence de **fortes concentrations de principes actifs solubilisés** au sein de ces dernières, d'autre part, ont été considérés comme des arguments de poids, permettant la simplification de la fabrication et la sécurisation d'emploi de la préparation future. L'utilisation de spécialités pharmaceutiques injectables pour la supplémentation vitaminique d'une préparation topique à 1 % de SSD a donc été privilégiée à l'utilisation de matières premières vrac quand cela était possible.

#### 2.2.4. Stabilité

La réalisation d'une préparation pharmaceutique ne se limite pas à l'étude de sa faisabilité clinique et aux aspects techniques inhérents à sa fabrication, elle inclut également, en conformité avec les textes en vigueur, l'évaluation de sa stabilité.

Les BPP stipulent ainsi que, dans le cadre des activités de fabrication de médicaments par les PUI, le pharmacien est **responsable du contrôle de la stabilité** de ces préparations (107). En effet, pour pouvoir assurer l'efficacité, la sécurité et l'innocuité d'un médicament, le pharmacien doit s'assurer du maintien des propriétés de ce dernier jusqu'à sa date limite d'utilisation, en vue de son administration au patient.

Le pharmacien responsable doit donc disposer de données de stabilité fiables. D'un point de vue méthodologique, en première lieu, la recherche de données de stabilité s'effectue à partir de la littérature. Une fois recueillies, le pharmacien s'assure alors que ces données, si elles existent, s'appuient sur des bases scientifiques rigoureuses et vérifie leur transposabilité vis-à-vis de la préparation en étude. Si ces données ne s'avéraient pas transposables, le pharmacien devra, s'il souhaite maintenir la réalisation de la préparation, mettre en œuvre une étude de stabilité. La réalisation de cette dernière n'est envisageable qu'à la condition de disposer des moyens matériels, techniques et humains nécessaires (108).

Les études de stabilité s'appuient sur les recommandations de l'*International Conference on Harmonisation* (conférence internationale d'harmonisation, ICH). Celles-ci représentent une base méthodologique essentielle pour le développement d'un médicament (108).

Le développement d'une **nouvelle** préparation cicatrisante destinée au traitement des brûlures actuellement prises en charge par Flammazine® implique donc à terme la réalisation d'une **étude de stabilité** de la préparation finale. Dans ce but, seront détaillées au chapitre 2.5. les travaux réalisés jusqu'à ce jour concernant le développement de méthodes de dosage indicatrices de stabilité des principes actifs de la préparation en développement.

## 2.3. Intérêt pharmacothérapeutique

### 2.3.1. Flammazine<sup>®</sup>, crème à 1% de sulfadiazine argentique

#### i. Aspects historiques

Les traces de l'utilisation de l'argent pour le traitement et la prévention des maladies infectieuses remontent à 4000 ans avant Jésus-Christ. Durant le dix-neuvième siècle, l'utilisation topique de nitrate d'argent était indiquée dans le traitement des brûlures, des ulcères et des plaies infectées. Le nitrate d'argent en solution à 0.5 % constituera dans les années soixante le traitement standard de la prophylaxie anti-infectieuse des grands brûlés du fait de leur forte activité antibactérienne et de l'absence de résistance alors rapportées. Le nitrate d'argent présente cependant une faible stabilité en solution aqueuse en présence de lumière, conduisant à une coloration noire des tissus traités. Enfin, la toxicité cutanée des ions nitrate et de leurs produits de dégradation ainsi que les modalités d'administration de ce produit demeurent des inconvénients forts de son utilisation (88). Ce traitement aujourd'hui peu coûteux, reste recommandé dans cette indication par l'OMS dans les pays en voie de développement (86).

En 1970, Fox brevète un nouveau sel d'argent sous forme de préparation topique (US3761590A): la sulfadiazine argentique, donnant naissance à la Flammazine<sup>®</sup> (109) (110). Le Flammacerium<sup>®</sup> (SSD 1 %, nitrate de cérium 2,2 %), mis sur le marché en 1976, sera indiqué plus spécifiquement dans la prise en charge des brûlures profondes en raison des propriétés tannantes du nitrate de cérium. (89). La Flammazine<sup>®</sup> demeure cinquante ans après son invention le traitement de référence dans cette indication dans de nombreux pays incluant la France, en accord avec les recommandations de sociétés savantes de Brûlologie (88).

#### ii. Composition

La Flammazine<sup>®</sup> est une crème de type huile dans eau contenant 1% de SSD. Cette spécialité pharmaceutique est actuellement commercialisée par le laboratoire Alliance Pharma en conditionnement de 50 g et 500 g.

**Tableau 5 : Composition qualitative de la Flammazine®**

Excipients	Catégories fonctionnelle <sup>s</sup>
Polysorbate 80 (= Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate)	Emulsifiant, surfactant non ionique, solubilisant
Polysorbate 60 (= Polyoxyethylene 20 sorbitan monostearate)	Emulsifiant, surfactant non ionique, solubilisant
Eau purifiée	Solvant
Paraffine liquide	Emollient, solvant
Alcool cétylique	Emulsifiant, épaississant
Monostearate de glycérol	Emollient, émulsifiant, solubilisant, stabilisant

a: Ramond C Rowe et al. *Handbook of Pharmaceutical Excipients (6th Ed)*, Stokesley, 2009.

### iii. La sulfadiazine argentique : un dérivé argenté

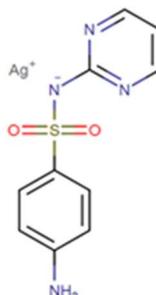
L'argent est un élément naturel de poids atomique égal à 107.870 g.mol<sup>-1</sup> et de numéro atomique 47. Ce métal de transition peut se retrouver sous trois états oxydés : Ag<sup>1+</sup>, Ag<sup>2+</sup> et Ag<sup>3+</sup>. Parmi eux, seul l'argent sous forme **Ag<sup>1+</sup>** est suffisamment stable pour exercer un effet **antibactérien**. En effet, les autres cations argentés, bien qu'étant hautement réactifs, présentent une demi-vie trop courte. Les composés argentés vont s'ioniser en milieu aqueux ou dans les fluides biologiques, libérant ainsi l'ion Ag<sup>1+</sup> dans le milieu. On rappelle que l'argent à l'état non ionisé n'exerce pas d'action biocide (111). Le sel de SSD est issu de la combinaison du nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>) et de l'antibiotique sulfadiazine sodique (91).

La Pharmacopée Européenne n'intègre pas de monographie de la SSD contrairement à la Pharmacopée Américaine dont la monographie USP 37 est dédiée à ce produit (112).

**Tableau 6 : Propriétés physico-chimiques de la sulfadiazine argentique**

(Base de données DrugBank; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB05245>)

Structure chimique



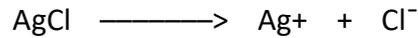
Masse moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	357,14
Log P (octanol-eau)	0,39
pKa 2	6,99
pKa 1	2,01
Solubilité aqueuse (mg/mL)	7,87
Nombre d'hydrogènes accepteurs	6
Nombre d'hydrogènes donateurs	1
Aspect macroscopique	Poudre cristalline de couleur blanche à jaune-blanche
Aspect microscopique de la matière première vrac	Cristaux formants des agrégats de taille < 10 μm

### iii. Propriétés pharmacologiques

Nous passerons en revue les propriétés biopharmaceutiques, pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la spécialité pharmaceutique Flammazine®.

#### **Phase biopharmaceutique**

La sulfadiazine argentique étant relativement insoluble, elle réagit très lentement avec les ions chlorure et les protéines de l'exsudat des tissus pour former du chlorure d'argent, des complexes protéiques d'argent et de la sulfadiazine sodique. Le chlorure d'argent étant très légèrement soluble (Solubilité (AgCl) =  $1,8 \cdot 10^{-4}$  g/100 mL à 25 °C), il libère lentement des ions argent, qui sont alors libres d'exercer leur effet bactéricide (113). La sulfadiazine argentique agit comme un dépôt à libération prolongée d'argent et de sulfadiazine à la surface de la plaie (113).



**Figure 18** : Dissociation de la sulfadiazine argentique dans l'exsudat

### **Propriétés pharmacocinétiques (114)**

**Absorption** : moins de 10 % de la sulfadiazine est résorbé ; le taux d'argent résorbé se situe en dessous de 1% du contenu en argent de la crème. Il est à noter que l'absorption d'argent est supérieure lors des phases inflammatoires et prolifératives de la cicatrisation.

**Distribution** : des concentrations plasmatiques de sulfadiazine de 10–20 µg/ml ont été observées ; des taux plus élevés peuvent néanmoins être atteints, lors de traitement de plus grandes surfaces cutanées.

**Élimination** : la sulfadiazine est éliminée par voie urinaire. Dans les urines, chez les grands brûlés recevant de 5 à 10 g de sulfadiazine argentique (500 g à 1 kg de crème), on retrouve des sulfamides à des taux variant de 5 à 200 mg/100 ml, soit 50 mg à 2 g par 24 heures (14). L'argent absorbé est éliminé par voies urinaire et biliaire.

### **Pharmacodynamie**

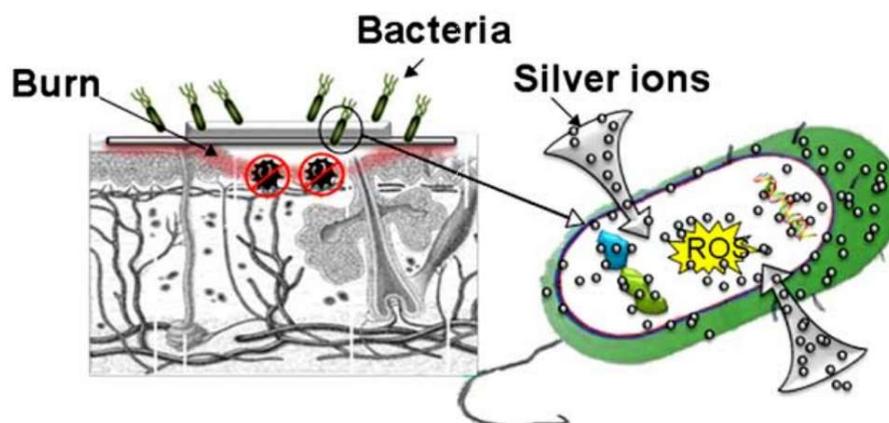
**Mécanisme d'action des ions argent** : le premier mécanisme proposé implique l'interaction avec la chaîne respiratoire des microorganismes. L'ion argent est capable de bloquer le système de transport des électrons des bactéries. Des concentrations de 15 µg/mL d'argent ionique inhibent l'oxydation de glucose, glycérol, fumarate, succinate, D-lactate, L-lactate chez *Escherichia coli*, et ce par interaction avec les groupes thiol des enzymes. Ces groupes sont présents chez les enzymes qui contiennent l'acide aminé cystéine (115).

Le deuxième mécanisme bactéricide de l'argent ionique est sa capacité **d'interaction et de rupture de la membrane cellulaire ou paroi cellulaire**. Une membrane cellulaire bactérienne contient à la fois des charges cationiques et anioniques à sa surface.

En solution, l'argent ionique se lie électrostatiquement aux portions anioniques de la membrane, inhibant ainsi les mouvements de l'organisme ou provoquant rupture et fuite de la membrane. De plus, la liaison de l'argent à la membrane peut inhiber le passage d'éléments nutritifs à travers celle-ci ou être responsable d'interférences avec les gradients de concentration normaux entre la cellule et son environnement (116).

Un troisième mécanisme implique l'**interaction** de l'argent ionique **avec l'ADN des cellules bactériennes**. Alors que les cellules eucaryotes ne sont pas affectées par ce mécanisme (puisque l'ADN est contenu dans le noyau), les cellules procaryotes, telles que les bactéries, n'ont pas de noyau. L'argent ionique interagit avec les paires de bases guanine – cytosine et adénine – thymine. Ces deux interactions entraînent une mutation de l'ADN et finalement la mort cellulaire bactérienne (116).

Enfin (quatrième mécanisme), lors de la liaison de l'ion argent aux acides aminés, un complexe organométallique est formé. En cas de rupture du complexe, des **radicaux libres** sont générés à l'intérieur de la cellule. Ces radicaux libres possèdent une haute activité antimicrobienne due à la présence d'électrons singulets. Ils ont la capacité d'interagir avec le transport des électrons, d'inactiver l'ADN et l'ARN bactériens, d'endommager la membrane cellulaire et de précipiter les protéines possédant des groupements cystéine et thiol, provoquant ainsi la mort cellulaire (117).



**Figure 19** : mécanismes d'actions anti-microbiens de l'argent topique sur les brûlures d'après Dai et al

Il existe une corrélation directe entre la létalité bactérienne et la concentration en ions argent libres dans le milieu (118). Les ions argent présentent quatre mécanismes d'action principaux vis-à-vis des pathogènes.

**Mécanisme d'action du sulfamide :** le sulfonamide libéré présente un effet synergique aux ions argent en interférant avec le métabolisme du pathogène. C'est un bactériostatique (119).

**Spectre d'action de la sulfadiazine argentique :** la SSD est essentiellement efficace sur les germes gram négatifs tels que *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique), *Aerobacter aerogenes* (enterobacter), *Klebsiella pneumoniae* (bacille de Friedlaender ou bacille de Neumann) ainsi que sur le *Staphylococcus aureus* (119). La SSD est également active sur les *Enterococcus* résistants à la vancomycine et le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à concentration efficace. Cet antibiotique s'avère également efficace sur certaines souches de *Candida albicans* (88).

**Résistances à la sulfadiazine argentique :** les faibles taux de résistance à l'argent s'expliquent par la pluralité des mécanismes d'action de cet anti-infectieux (95). Toutefois, l'utilisation accrue de l'argent inorganique comme adjuvant à de nombreuses préparations topiques et dispositifs médicaux suscite des inquiétudes quant à l'émergence de résistances bactériennes en structures de soin.

L'expression phénotypique des gènes de résistance à l'argent est très peu fréquemment décrite en milieu clinique. La littérature fournit toutefois des cas de plaies infectées par *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* présentant des résistances notables à l'argent (120). Des résistances associées à *Pseudomonas aeruginosa* sont également décrites, un brevet combinant SSD et pipéracilline a été déposé dans ce sens par Fox en 1985 (121).

#### iv. Effets indésirables notoires

Les effets indésirables suivants sont rapportés par le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) de la spécialité pharmaceutique Flammazine®:

- Eczématisations de contact.

- Photosensibilisation.
- Effets indésirables en lien avec le profil de complications associées à la prise de sulfamides : troubles hématologiques, rénaux, intestinaux et cutanés.
- De rares cas de leucopénies ont été décrits.
- Bien qu'il n'ait pas été rapporté d'effet d'argyrisme, ce risque ne peut être exclu.
- Risque de surdosage en argent. Un passage systémique n'est pas exclu, fonction de l'étendue et de la gravité des lésions traitées ainsi que des doses et de la durée du traitement. L'augmentation des niveaux sériques d'argent après une utilisation prolongée de doses élevées de sulfadiazine argentique peut entraîner des symptômes d'origine neurologique, rénale, hépatique, respiratoire, gastro-intestinale ou hématologique.
- Une décoloration temporaire bleu-gris de la peau et des yeux peut être observée (119).

#### v. Effets indésirables cutanés

Bien que ne figurant pas dans les effets indésirables mentionnés au RCP de la Flammazine®, la littérature fournit de nombreuses illustrations des effets néfastes de la SSD sur la cicatrisation cutanée.

En effet, un nombre croissant d'études démontre la **cytotoxicité fibroblastique, kératinocytaire et leucocytaire** de la SSD (122) (123) (124) (125) (126) (127) (128).

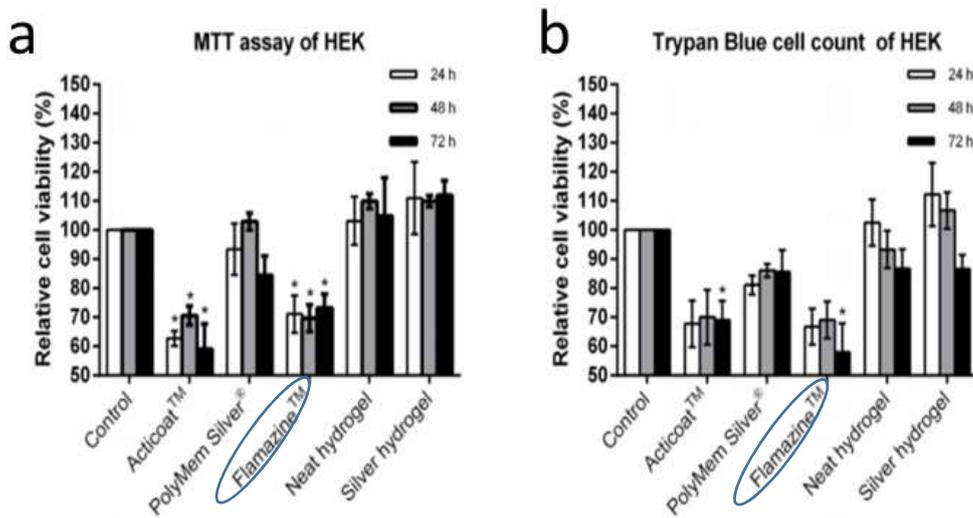
En 2017, l'équipe de *Qian et al* inculpait également la SSD quant à sa responsabilité vis-à-vis du développement de **cicatrices hypertrophiques** (129). Enfin, *Cho Lee et al* démontraient en 2015 dans la revue *Biomaterials* un **retard de cicatrisation** induit par la Flammazine®, réversible par supplémentation en EGF (130).

Nous reprendrons ci-dessous quatre de ces études.

*Fraser et al* publiaient en 2004 une étude évaluant *in vitro* la cytotoxicité de divers traitements topiques à base d'argent dont la Flammazine®. Le protocole expérimental consistait à appliquer, en fonction des groupes de traitements, le produit testé au centre de plaques de cultures.

Concernant le groupe Flammazine<sup>®</sup>, 0,1 mL de produit était déposé par plaque de culture. Ces dernières étaient ensuiteensemencées de kératinocytes de lignée HaCaT avec une confluence estimée de 25%. Les cultures cellulaires étaient alors incubées 72 heures à 37°C en étuve, puis traitées par bleu de toluidine pour analyse de la viabilité cellulaire. Le colorant était éliminé, puis les plaques de culture étaient photographiées et analysées, permettant de calculer les pourcentages de surface de plaque recouverts par les kératinocytes en fin d'expérimentation. Cette étude conclut à une réduction significative de la survie cellulaire du groupe de traitement Flammazine<sup>®</sup> par rapport au contrôle ( $p < 0,05$ ), démontrant ainsi la cytotoxicité kératinocytaire de la SSD (115).

Boonkaew *et al* publiaient dans le journal *Burns* en 2014 une étude évaluant la cytotoxicité de spécialités topiques à base d'argent dont la Flammazine<sup>®</sup> (1% SSD) vis-à-vis de kératinocytes et de fibroblastes humains. Les lignées kératinocytaires évaluées étaient de type HEK et les fibroblastiques de type NHF. La viabilité cellulaire était évaluée à 24, 48 et 72 heures par test au bleu trypan et test de viabilité au 3- (4,5-diMéthylThiazol-2-yl) -2,5-diphénylTétrazolium (MTT).

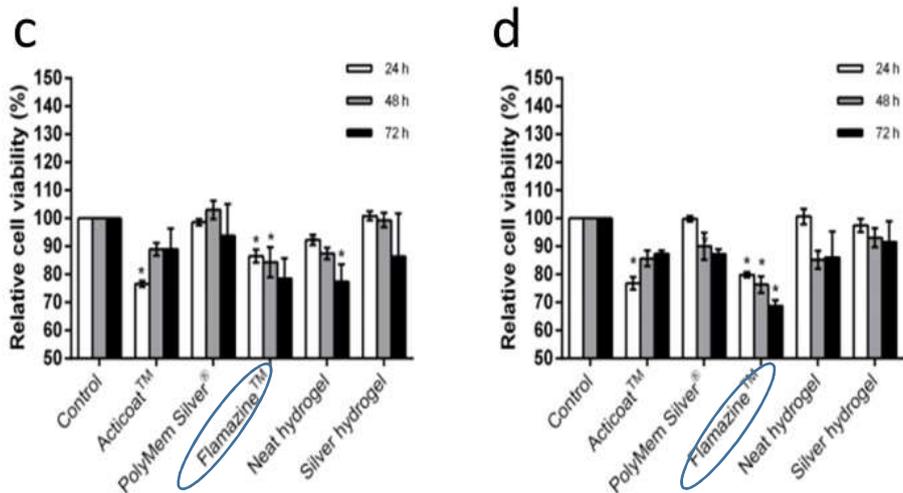


**Figure 20** : Viabilité cellulaire à 24, 48 et 72 h de cellules HEK exposées à différents traitements anti-infectieux d'après Boonkaew *et al*

a : test au MTT

b : test au bleu trypan

\* : différence significative en comparaison du groupe contrôle,  $p < 0.01$



**Figure 21** : Viabilité cellulaire à 24, 48 et 72 h de cellules NHF exposées à différents traitements anti-infectieux d'après Boonkaew et al

c : test au MTT

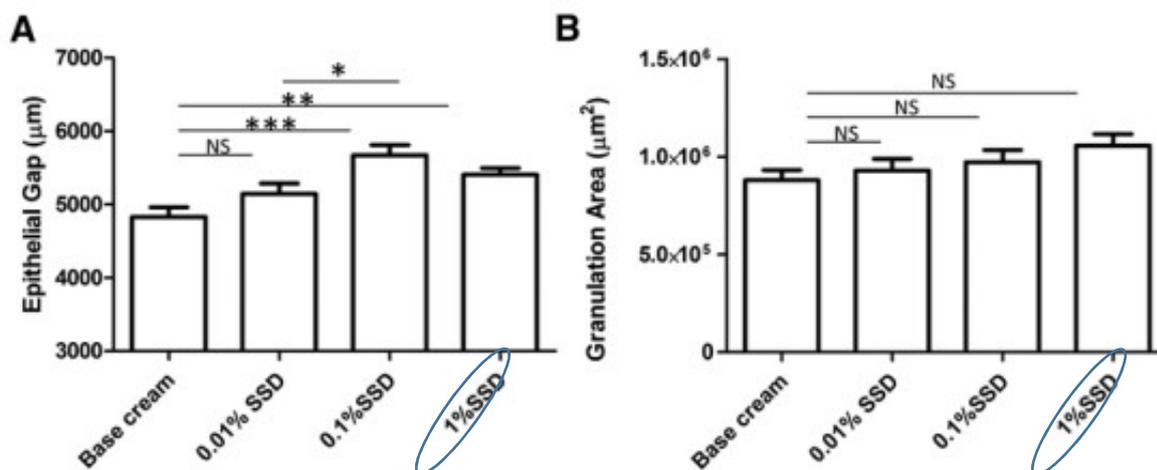
d : test au bleu tryptan

\* : différence significative en comparaison du groupe contrôle,  $p < 0.01$

On constate donc dans cette étude que 24, 48 et 72 heures après le début de l'expérimentation, la Flammazine® s'est révélée toxique pour l'ensemble des lignées cellulaires. Les auteurs concluent à la cytotoxicité kératinocytaire et fibroblastique de la Flammazine® sur les lignées cellulaires testées (124).

En 2017, Qian et al publiaient dans le *Journal of burn care et research* une étude évaluant les effets de l'utilisation topique de crèmes à concentrations variables en SSD sur la cicatrisation de plaies excisionnelles d'oreille de lapin. Vingt-quatre lapins étaient randomisés en quatre groupes de traitement : crème sans SSD, à 0,01 % SSD, à 0,1% SSD, ou à 1% SSD, respectivement. Sept jours après la réalisation des plaies, la moitié des lapins de chaque groupe était tuée et les tissus étaient prélevés pour caractérisation histomorphométrique de la zone de granulation et détermination de l'écart épithélial.

Vingt-huit jours après l'opération, les lapins restants étaient tués et les cicatrices étaient évaluées par détermination d'un index cicatriciel comparant la surface dermique cicatrisée à la surface dermique excisée pour caractériser la présence d'une cicatrisation hypertrophique.



**Figure 22** : Le traitement topique par crème à 1 % de SSD induit un retard de cicatrisation sur des plaies excisionnelles d'oreilles de lapin d'après Qian et al

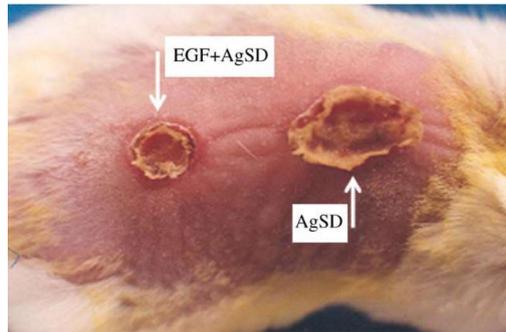
A : les gaps épithéliaux des plaies traitées par crèmes à 0,1 et 1% de SSD étaient plus larges que les plaies contrôles (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001 ; NS : non significatif ; n = 36)

B : La comparaison des aires recouvertes par du tissu de granulation n'a pas montré de différence significative entre les groupes (NS : non significatif ; n = 36)

Les auteurs concluent que la SSD est responsable d'un retard d'épithélialisation (SSD 1% : p < 0,01). Enfin, l'évaluation de la cicatrisation 28 jours après l'excision montrait une cicatrisation hypertrophique plus importante pour les groupes traités par SSD 0,1 et 1% en comparaison du groupe contrôle (p < 0,05) (129).

Cho Lee et al publiaient en 2015 dans la revue *Biomaterials* une étude d'efficacité *in vivo* sur modèle de souris brûlée au second degré visant à évaluer les effets de la supplémentation en SSD et en EGF d'éponges de collagènes destinées au traitement des brûlures. L'étude visait à évaluer la réversibilité du retard de cicatrisation induit par la SSD par ajout d'EGF.

Quatre types des pansements de collagène étaient préparés : SSD, SSD +EGF, EGF seul, et sans SSD ni EGF ; des concentrations variables de SSD (1 à 2%) ainsi que d'EGF étaient évaluées (2 à 4 µg/mL). Ils étaient changés toutes les 96 heures.



**Figure 23** : Fermeture des plaies après 7 jours de traitement par (i) EGF + SSD et (ii) SSD seul chez la souris brûlée d'après Cho Lee et al

Les flèches indiquent la plaie traitée avec SSD 2% ou la plaie traitée avec SSD 2% + EGF (2 mg / cm<sup>2</sup>) en éponge de collagène

AgSD : SSD

**Tableau 7** : Pourcentage de fermeture des plaies par groupes de traitement d'après Cho Lee et al

Jour	EGF (4 µg/mL)	SSD (1%)	SSD (1%) + EGF (4 µg/mL)
7	64.6 ± 6.4 <sup>c</sup>	40.5 ± 0.7	46.3 ± 1.2 <sup>c</sup>
13	92.6 ± 2.0 <sup>c</sup>	80.8 ± 1.9	92.1 ± 1.1 <sup>c</sup>

c : indique une différence significative avec le groupe plaie traitée par Ag-SD (p < 0,01)

Les auteurs concluent que la co-supplémentation en EGF d'éponges de collagène contenant de la SSD augmente la régénération épidermique et accélère la fermeture de la plaie en comparaison d'éponges contenant de la SSD seule (130).

## vi. Indications

Les indications fournies par l'Autorisation de Mise sur le Marché de la Flammazine®, dernière mise à jour le 03/10/2016, sont les suivantes :

- traitement antiseptique d'appoint des plaies infectées et des brûlures ;
- traitement d'appoint des affections dermatologiques primitivement bactériennes ou susceptibles de se surinfecter (119).

Suite à la réévaluation de la balance bénéfique/risque de la Flammazine® lancée par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé (ANSM), une modification de l'indication AMM de la spécialité est en cours. L'indication « Prévention et traitement des infections dans le cadre de la prise en charge des brûlures à partir du 2nd degré » a été adoptée par le groupe de travail Dermatologie de l'ANSM le 15/11/2017 en accord avec la SFFPC, sans pour autant figurer sur le RCP à ce jour.

#### **vii. Contres indications**

Les contres indications d'utilisation de ce produit sont l'hypersensibilité aux sulfamides ou à l'un des excipients. Cette préparation topique n'est pas adaptée à un usage chez le nouveau-né ou le prématuré.

#### **viii. Evaluation de la consommation annuelle de Flammazine® par le service des brûlés pour l'année 2017**

Une analyse de la consommation annuelle de Flammazine® par le Service des Brûlés de la ville de Lyon, actuel CDBL-PC, sur la période du 14/12/2016 au 14/12/2017 inclus, a été effectuée à l'aide du logiciel de gestion pharmaceutique Gildas® au sein de la PUI de l'*HEH GH-Centre*. Les produits étudiés étaient (i) la spécialité pharmaceutique Flammazine®, 50 g, tube et (ii) la spécialité pharmaceutique Flammazine®, 500 g, pot. Les unités fonctionnelles consommatrices incluses étaient les services de chirurgie, de réanimation et l'unité de soins continus du pavillon I.

2753 tubes de Flammazine® 50 g ainsi que 8219 pots de Flammazine® 500 g ont été dispensés à ces services sur la période d'intérêt correspondant à une dépense de 198 764.66 € hors taxes et à un poids de 4,247 tonnes de produit.

Ces données démontrent l'importance de l'utilisation de ces spécialités pour la prise en charge des brûlures au sein des Hospices Civils de Lyon. Il est à noter que la période analysée fournit des valeurs minorées aux consommations futures attendues du fait de la mutualisation au sein du CDB-PC des services de soins aux brûlés de la ville de Lyon avec le service des brûlés du Centre Hospitalier Saint Joseph Saint Luc.

## ix. Conclusion

Bien que présentant des propriétés toxiques vis-à-vis des structures cutanées, la Flammazine®, est un produit couramment utilisé en tant que traitement prophylactique des brûlés graves, par définition à haut risque infectieux. Ses modalités d'administration simples et bien tolérées, son faible coût, le recul quant à son efficacité et sa sécurité d'usage, l'absence d'études cliniques de haut niveau de preuve concernant les alternatives thérapeutiques à ce produit constituent autant d'éléments justifiant la recommandation de son utilisation par des sociétés savantes telles que l'EBA et la SFFPC, ainsi que son utilisation pratique en Centre des Brûlés (CDB). En outre, l'optimisation de sa tolérance cutanée apparaît être un axe stratégique d'amélioration de ce produit. Dans un esprit similaire à *Cho Lee et al*, l'hypothèse de ce projet de développement était qu'une supplémentation, dans le cas présent vitaminique, d'une préparation topique à 1% de SSD permettrait l'optimisation de ses propriétés cicatrisantes. Nous aborderons dans la suite de ce document l'intérêt d'utilisation, d'après les données de la littérature, des vitamines A, C et E sur le tissu brûlé.

### 2.3.2. Vitamines A, C et E

Les **vitamines** sont définies par l'Académie de Médecine comme étant des substances biologiques **indispensables** à la croissance et au fonctionnement des organes, apportées en **petites quantités** par l'alimentation, que l'organisme n'est pas capable de synthétiser et dont la carence entraîne des troubles caractéristiques pour une espèce donnée (avitaminoses) (18).

Afin d'évaluer l'intérêt pharmacothérapeutique du développement d'une préparation topique à 1% de SSD supplémentée en vitamines, une revue de la littérature ayant pour but la sélection de vitamines pro-cicatrisantes vis-à-vis des tissus brûlés a été effectuée.

L'hypothèse de ce travail bibliographique était que les vitamines sélectionnées, de par leurs propriétés pharmacodynamiques, seraient à l'origine, soit de l'inhibition d'un processus impliqué dans la **pathogénèse** de la brûlure, soit de l'**optimisation** du **processus cicatriciel**, bien que d'un point physiologique la cicatrisation cutanée débute de façon concomitante à la brûlure.

Comme vu supra au chapitre 1.2.4., la brûlure conduit à la libération massive d'agents oxydants (i.e. ROS et dérivés du NO) et à une consommation majeure d'antioxydants (i) en réponse au stress oxydatif et (ii) en lien avec les pertes exsudatives secondaires à la brûlure (37).

La littérature est ainsi riche de descriptions des carences en zinc, cuivre, sélénium, **vitamines C et E** chez les brûlés graves non supplémentés en micronutriments (38) (39) (40) (41) (19). Par ailleurs, la supplémentation par voie orale des brûlés en micronutriments antioxydants est déjà considérée comme facteur d'amélioration de la vitesse de cicatrisation et de diminution du taux d'infections (76).

La cicatrisation des plaies est un processus complexe, qui peut être subdivisé en quatre phases : la phase d'hémostase, la phase inflammatoire, la phase proliférative et la phase de remodelage (cf. supra chapitre 1.3.). De nombreux mécanismes biochimiques et moléculaires par lesquels la vitamine A est responsable d'une amélioration de la cicatrisation, restent à ce jour inconnus. Il est toutefois clair que les rétinoïdes influencent les quatre phases de la cicatrisation (131).

Une attention particulière a donc été portée sur l'intérêt pharmacothérapeutique des vitamines A, C et E. Les chapitres suivants traitent de chacune de ces vitamines, détaillant leur pharmacologie cutanée et la bibliographie en lien avec leurs effets étudiés sur la cicatrisation des brûlures.

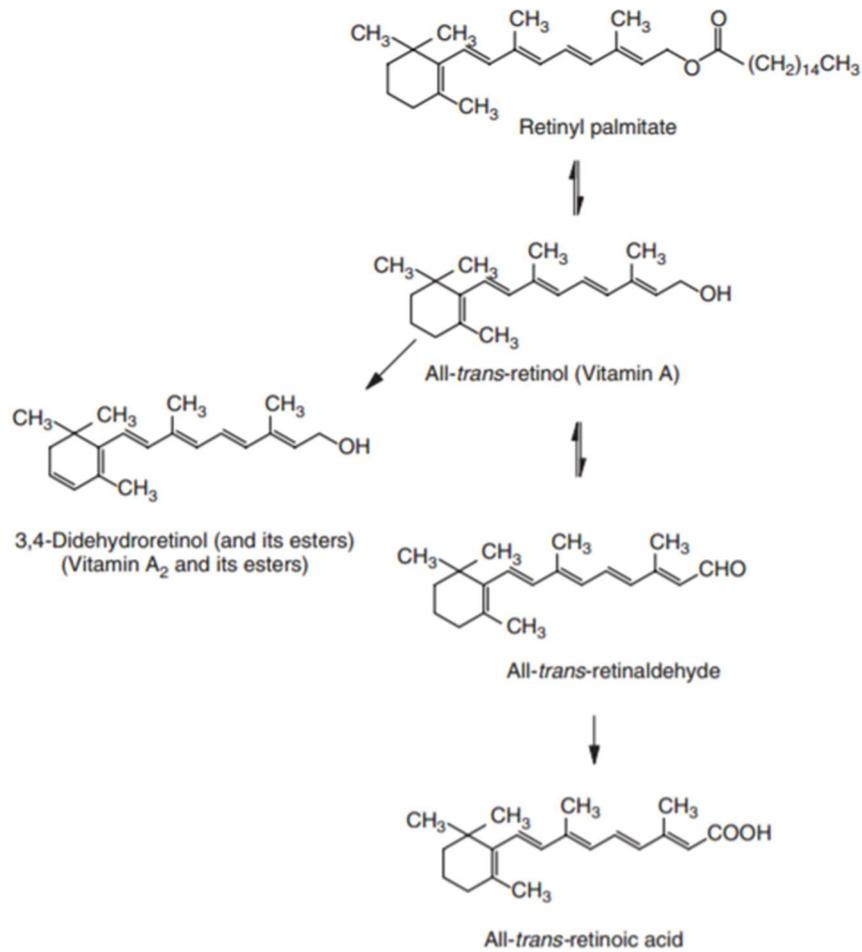
## i. Vitamine A

### Définition et caractéristiques

La *Vitamine A* est définie selon la PhE comme étant un ensemble de molécules **liposolubles** de structure très voisine. La substance principale et la plus active du point de vue biologique est le rétinol (ROL) tout-(*E*), encore appelé rétinol all-trans, de nomenclature UICPA tout-(*E*)-3,7-diméthyl-9-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-ényl)nona-2,4,6,8-tétraén-1-ol et de formule développée  $C_{20}H_{30}O$  (132).

Structurellement, tous les rétinoïdes possèdent également un cycle  $\beta$ -ionone et une chaîne latérale polyinsaturée composée de quatre unités isoprénoïdes, avec une série de doubles liaisons conjuguées en configuration trans ou cis incluant un groupement soit alcool, soit aldéhyde, soit acide carboxylique ou ester (133).

Les rétinoïdes comprennent la vitamine A, ses métabolites (le rétinaldéhyde, l'acide rétinoïque tout-trans et l'acide 9-cis-rétinoïque) ainsi que ses analogues synthétiques.



**Figure 24** : Structures des rétinoïdes

Les Unités Internationales (UI) sont utilisées pour exprimer l'activité de la vitamine A. 1 UI de vitamine A correspond à l'activité de 0,300 µg de ROL tout-(E) et à 0,550 µg de palmitate de rétinol tout-(E). 1 mg d'équivalent rétinol correspond à 3333 UI.

## Pharmacologie cutanée des rétinoïdes

L'utilisation topique des rétinoïdes couvre deux grandes sphères :

- les traitements dermatologiques de l'acné, des troubles de kératinisation tel que le psoriasis, les cancers de la peau et le vieillissement cutané photo-induit
- la cosmétologie avec les crèmes anti-âge (134).

**Métabolisme cutané des rétinoïdes** : la connaissance du métabolisme complexe des rétinoïdes permet d'appréhender la pluralité d'action de cette famille de molécules. Avant d'exercer leurs effets pharmacologiques ou biologiques, les rétinoïdes subissent un métabolisme composé de quatre temps, explicité par *P.Brebis* en 2011 dans les *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* (135).

Dans un premier temps, un **métabolisme extracellulaire** conduit à la formation de **rétinol**, seul rétinoïde en capacité de pénétrer les cellules cibles. Ces réactions métaboliques se révèlent variables en fonction de la structure initiale du rétinoïde et de sa voie d'administration.

Cette première phase est suivie par un **métabolisme intracellulaire complexe**, soumis à l'action de nombreux co-acteurs, conduisant à la synthèse intracytoplasmique des métabolites actifs du ROL : l'**acide rétinoïque tout-trans** (ARTT ou trétinoïne) et l'**acide 9-cis-rétinoïque** (A-9-cis-R). La cellule est en capacité de réguler les quantités d'ARTT et d'A-9-cis-R disponibles en formant d'autres produits tels que les rétorétinoïdes ou les rétinylesters. Au niveau cutané, ce métabolisme est différent selon le type cellulaire, s'avérant ainsi variable entre les sébocytes et les kératinocytes (5).

Pour exercer leur action biologique au sein du noyau cellulaire, l'ARTT et l'A-9-cis-R seront **transportés** vers le noyau lié à un **récepteur cytoplasmique soluble**, lui-même soumis à des régulations.

Au sein du noyau, l'ARTT et le A-9-cis-R devront se coupler à des **récepteurs nucléaires aux rétinoïdes**. Il en existe deux types : les **récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque** (RAR), dont le ligand naturel est l'acide rétinoïque, et les **RXR** dont le ligand naturel est l'acide 9-cis-rétinoïque. Ils sont chacun composés de trois isotypes, de répartition variable dans l'organisme, et qui s'avèreront jouer des rôles distincts une fois couplés à leur ligand.

Les récepteurs nucléaires aux rétinoïdes sont des **facteurs de transcription** dépendants de ligands.



**Pharmacodynamie cutanée des rétinoïdes :** les mécanismes d'actions cellulaires des rétinoïdes sont basés sur l'influence temps et dose-dépendante de la morphogénèse, la prolifération et la différenciation épithéliales, la performance de synthèse des tissus mésenchymateux, l'immunomodulation, la stimulation de l'angiogenèse et l'inhibition de la carcinogenèse (136) (5).

Au niveau **épidermique**, les rétinoïdes sont impliqués dans la modulation de la **différenciation cellulaire**. Les rétinoïdes favorisent la prolifération cellulaire dans l'épiderme normal en raccourcissant la phase mitotique du cycle cellulaire, mais agissent vers la normalisation quand ils sont administrés sur des épithéliums hyperprolifératifs. Sur épiderme sain, ils induisent une métaplasie sécrétoire de l'épiderme par la diminution de la synthèse de kératine de type I au profit de la synthèse de kératines de poids moléculaire réduit, caractéristiques des épithéliums de type sécrétoire. Les rétinoïdes élèvent l'index mitotique kératinocytaire, réduisent la synthèse des protéines tant d'enveloppe (filaggrine, involucrine) que constitutives du desmosome, fragilisant la cohésion kératinocytaire. Les rétinoïdes interviennent également en tant que molécules intermédiaires dans les processus de glycosylation, conduisant à la modification de glycoprotéines de surface jouant un rôle dans la différenciation. Les rétinoïdes entraînent une augmentation quantitative des jonctions adhérentes impliquées dans la communication intercellulaire et donc de l'homéostasie (137).

Au niveau **dermique**, les rétinoïdes induisent la synthèse de TGF- $\beta$  par le kératinocyte, conduisant à une **augmentation** de la **synthèse de collagène** et de **fibronectine** par le fibroblaste. Les rétinoïdes inhibent la stimulation induite par les UV des métalloprotéinases matricielles. Par ailleurs, les rétinoïdes inhibent la production kératinocytaire de VEGF (138). Les rétinoïdes exercent des propriétés **anti-inflammatoires** en réduisant la synthèse des prostaglandines, des leucotriènes mais également de la cyclo-oxygénase 2 (COX2) (137). Les rétinoïdes exercent aussi un rôle **immunomodulateur** par action sur les **polynucléaires neutrophiles**, en inhibant la production de ROS, la libération d'enzymes lysosomiales et le chimiotactisme. Ils agissent également sur la réponse **lymphocytaire** modulant, par exemple, la production d'immunoglobulines et la réponse lymphocytaire (5). Enfin, les rétinoïdes possèdent des **propriétés antinéoplasiques** en lien avec leurs propriétés modulatrices (i) de la prolifération et de la différenciation des épithéliums et (ii) de l'immunité cellulaire et humorale (139).

## Rétinoïdes et cicatrisation de la brûlure : revue de la littérature

Rai et al publiaient en 1975, dans la revue *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, la démonstration du retard de cicatrisation induit par la carence en vitamine A chez les patients gravement blessés, en particulier les brûlés (140).

Les brûlures graves et étendues, en générant un stress oxydatif important, conduisent à un état de carence en vitamine A (28) (cf. chapitre 1.2.4.).

En 1987, Aida et al publiaient dans le *British Journal of Experimental Pathology* une étude comparant la cicatrisation de rats brûlés répartis en 3 groupes : carencés en vitamines A et nourris au rétinol, carencés en vitamine A et nourris par acide polyprénoïque et carencés en vitamine A et non supplémentés. Les auteurs concluaient alors à une production de fibroblastes et à un dépôt de collagène majorés chez les rats supplémentés en rétinoïdes (141).

Bien que la totalité des mécanismes biochimiques et moléculaires par lesquels la vitamine A impacte la cicatrisation des brûlures ne soit élucidée, il est toutefois établi que les rétinoïdes influencent les quatre phases de la cicatrisation.

La **phase d'hémostase** de la cicatrisation est impliquée par activation des récepteurs RXR plaquettaires, conduisant à une inhibition de l'hémostase (142).

L'action des rétinoïdes sur les **phases inflammatoire** et **proliférative** impliquent la régulation du relargage de cytokines et de facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$  et l'*insuline-like growth factor-1*, impactant la mobilité kératinocytaire (143).

La **phase de remodelage** semble être la plus influencée par les rétinoïdes, impliquant la prolifération des fibroblastes dermiques ainsi que l'augmentation de la synthèse de composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène et le hyaluronate (144). Ils induisent par ailleurs une diminution de l'activité des métalloprotéinases de la matrice, conduisant à une inhibition de la dégradation de la matrice extra cellulaire (145). Enfin, les rétinoïdes augmentent l'élasticité cicatricielle (146) et sont indiqués comme traitement de seconde ligne des cicatrices chéloïdes (147).

En 2006, Rittié *et al* publiaient dans le *Journal of Investigative Dermatology* la démonstration de l'**activation du récepteur à l'EGF par les rétinoïdes** (148), augmentant ainsi la sensibilité à l'EGF. Nous mettrons ces résultats en lien avec l'étude de *Cho Lee et al*, présentée au chapitre 2.3.1. Ces auteurs neutralisaient le retard de cicatrisation inculquée à la SSD par application concomitante d'EGF. Ces résultats constituent un élément supplémentaire justifiant l'intérêt d'une supplémentation en vitamine A d'une préparation topique à 1 % de SSD.

## i. Vitamine E

### Définition et caractéristiques

Le terme générique vitamine E désigne 2 grands groupes de molécules **liposolubles** : les tocophérols et les tocotriénols, comportant chacun 4 vitamères:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . Leur structure chimique est composée d'un motif commun chromanol, mono, di ou triméthylé, auquel est rattachée une chaîne latérale isoprénique à 16 carbones.

On distingue deux grandes familles par le caractère **saturé** ou **insaturé** de cette chaîne latérale :

- les **tocophérols**, disposant d'une chaîne saturée,
- les **tocotriénols**, disposant d'une chaîne insaturée.

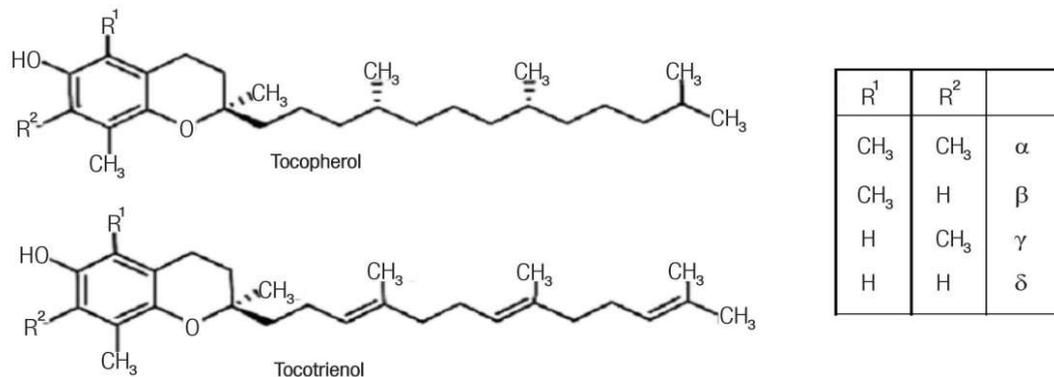
Ces composés sont subdivisés en 4 vitamères  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  en fonction de la position et du nombre de groupements méthyles situés sur le cycle aromatique du noyau chromanol.

Les tocophérols présentent trois carbones asymétriques : en position 2 du cycle chromanol et en 4' et 8' de la chaîne latérale, conduisant à la présence de huit stéréo-isomères (149).

La forme naturelle de la vitamine E est le **RRR- $\alpha$ -tocophérol** ; en raison de sa légère dextrorotation, il est souvent appelé **d- $\alpha$ -tocophérol**.

Les formes synthétiques du tocophérol incluent différents stéréo-isomères, leur mélange racémique (RRR, RRS, RSS, RSR, SSS, SRR, SSR, SRS) est nommé **all-rac- $\alpha$ -tocophérol**, synonyme de **dl-  $\alpha$ -tocophérol**.

Ces formes synthétiques sont souvent estérifiées dans le but d'augmenter leur stabilité, comme par exemple dans les préparations topiques. Toutefois ces isomères ne sont pas actifs avant leur hydrolyse en composés biologiquement actifs (150).



**Figure 26 : Structures de la vitamine E (151)**

Le (R,R,R)-α tocophérol, composé le plus actif, sert de référence pour définir l'**activité** de la vitamine E : 1 UI représente l'activité de 1 mg d'α-tocophérol naturel. Les activités respectives des β, γ et δ tocophérols naturels ne sont que de 0,5, 0,1 et 0,03 UI par mg. Parmi les tocotriénols, seul le dérivé α possède une activité significative de 0,3 UI par mg. L'unité « équivalent α-tocophérol » est aussi retrouvée dans la littérature, en tant que synonyme de UI (151).

### Pharmacologie cutanée de la vitamine E

L'utilisation topique de la vitamine E couvre :

- la photoprotection,
- la cosmétologie avec les crèmes anti-âge,
- la prévention des cicatrices pathologiques,
- la dermatite atopique,
- le traitement adjuvant du mélanome,
- l'utilisation en tant qu'agent conservateur (134).

Il est à noter que la majeure partie des preuves scientifiques du rôle bénéfique de la vitamine E topique concerne la photoprotection (151).

L' $\alpha$ -tocophérol est la vitamine la plus abondamment retrouvée dans la peau humaine et constitue la barrière physiologique antioxydante principale de la peau, bien que le stress oxydatif issu de l'environnement puisse être responsable d'une diminution de sa quantité (136). L' $\alpha$ -tocophérol est présent à l'état naturel dans l'épiderme, le derme et le *stratum corneum*, avec un rapport  $\alpha$ -tocophérol dermique /  $\alpha$ -tocophérol épidermique de 10 :1. On retrouve des concentrations d' $\alpha$ -tocophérol de niveau comparable au derme dans le sébum. Toutefois, on estime que 90 % de la quantité totale de vitamine E est stockée dans le tissu adipeux, plus précisément dans la gouttelette lipidique des adipocytes (152). En cas, d'hypermétabolisme, ces stocks peuvent toutefois être mobilisés, comme dans le cas des brûlés graves (153).

La vitamine E est un **antioxydant** : elle a la capacité de protéger les lipides polyinsaturés et les membranes biologiques du stress oxydant et de la **peroxydation** en **neutralisant les radicaux libres**, tel que les **ROS** ou les dérivés du **NO** (136) (155). Le stress oxydant issu de l'environnement cutané conduit à une diminution des réserves cutanées en vitamine E, qui étant quantitativement faibles, doivent être régénérées pour en maintenir l'activité (151).

D'un point de vue chimique, l'oxydation de l' $\alpha$ -tocophérol conduit à la formation d'un radical tocophéryl relativement stable, du fait du noyau chromanol. Ce radical peut être secondairement régénéré en présence de vitamine C ou d'autres réducteurs servant de donneurs d'hydrogène, dont les groupements thiols et plus particulièrement le glutathion. En l'absence de ces derniers, la vitamine E pourrait présenter des effets pro-oxydants démontrés *in vitro* (156).

En absence de vitamine E :  $ROO\bullet + RH \rightarrow ROOH + R\bullet$

$R\bullet + O_2 \rightarrow ROO\bullet$

En présence de vitamine E :  $ROO\bullet + \text{Vit E-OH} \rightarrow ROOH + \text{Vit E-O}\bullet$

**Figure 27** : Réactions radicalaires et vitamine E

L'application topique de vitamine E permet de restaurer la barrière antioxydante de la peau (151).

Sur peau saine, le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de **s'insérer dans les membranes biologiques** riches en acides gras polyinsaturés, où elle joue un rôle protecteur. Elle agirait de même à la surface des lipoprotéines (154).

La vitamine E **module** également la **réponse** des **agents infectieux** de **portage cutané** tel que le *Staphylocoque Aureus* Résistant à la Méricilline (SARM) (157). Elle permettrait également, par perturbation matricielle du biofilm, la dégradation du biofilm produit par *Staphylococcus aureus* (158).

### **Vitamine E et cicatrisation des brûlures : revue de la littérature**

La réduction du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire permet la diminution des dommages cellulaires causés par les ROS (155).

Suite à la brûlure, la concentration plasmatique de vitamine E **chute** de façon retardée, atteignant sa valeur minimale 6 à 8 jours après la brûlure ; concomitamment et à l'opposé, les peroxydes lipidiques du sérum se verront augmenter (159). La supplémentation par 100 mg/jour de vitamine E par voie orale conduit à une diminution des peroxydes lipidiques, simultanée à une augmentation de la concentration plasmatique de vitamine E (76).

Les directives de la *Société Américaine de Nutrition Parentérale et Entérale* de 2016 recommandent l'administration de vitamines antioxydantes (vitamines E et acide ascorbique) et d'oligo-éléments (sélénium, zinc et cuivre) chez les patients brûlés sur interprétation de méta-analyses. Ces dernières spécifient par ailleurs que les schémas posologiques et les modalités d'administration ne sont actuellement pas standardisés (77).

Le rôle de la vitamine E dans la cicatrisation des plaies a été étudié avec des résultats mitigés. Nous reprendrons en premier lieu les résultats d'études réalisés chez l'animal.

*Houwing et al* ont prétraité par voie orale des porcs par 500 mg de vitamine E avant de leur infliger des lésions cutanées induites par pression. Ces auteurs ont constaté une diminution des lésions tissulaires et du stress oxydatif dans le groupe supplémenté (160).

*Musulmah et al* infligeaient quant à eux à des rats diabétiques, supplémentés ou non en vitamine E par voie orale, des plaies incisionnelles. Ils concluaient à une accélération de la fermeture des plaies et à une diminution des taux de malondialdéhyde (produit final de l'oxydation) associée à une augmentation de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx), enzyme antioxydante (161).

L'administration de vitamine E permet également d'épargner le sélénium, un cofacteur important de la GPx (162).

Une déplétion prolongée en vitamine E a été corrélée à une mortalité accrue chez les patients brûlés (163) et à une augmentation des ulcères cutanés chez le rat (164).

Des cobayes blessés thermiquement recevant une supplémentation intrapéritonéale en vitamine E ont présenté une diminution du stress oxydatif, illustrée par une diminution du malondialdéhyde et une augmentation des antioxydants enzymatiques superoxyde dismutase et GPx en comparaison du groupe contrôle (165).

Les effets bénéfiques démontrés chez l'homme de la supplémentation en vitamine E sont plus modérés.

Les quatre tocophérols ont été identifiés par *Wu et al* comme étant *in vitro* modulateurs de la fonction immune cellulaire humaine (166). Les tocophérols ont par ailleurs une influence directe sur l'activation fibroblastique (167). Enfin, la vitamine E induit une activité transcriptionnelle chez le kératinocyte (168).

*Zampieri et al* publiaient en 2009 les résultats concluants de l'application topique de vitamine E réalisée au préalable de l'incision chirurgicale de 428 enfants sur la cicatrisation. Ils concluaient à un aspect esthétique supérieur et à l'absence d'apparition de cicatrices chéloïdes chez le groupe traité. Il est à noter que 6,5% des patients du groupe contrôle ont présenté des cicatrices chéloïdes (169).

Une revue de la littérature publiée par *Hobson* en 2014 rapporte toutefois un manque significatif d'études robustes évaluant l'effet de la vitamine E sur la cicatrisation humaine et animale, suggérant l'intérêt de leur promotion (155).

### iii. Vitamine C

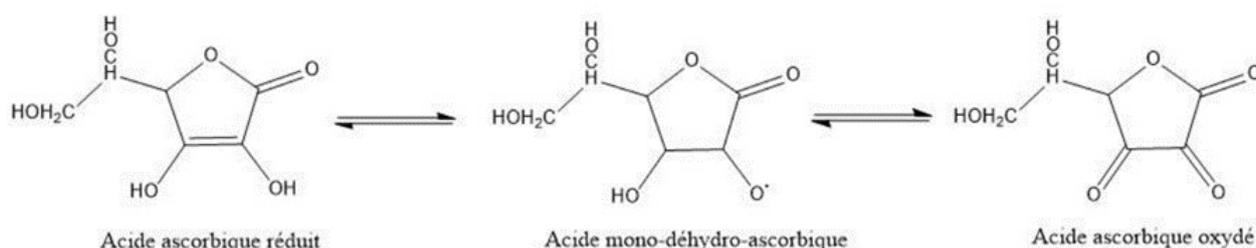
#### Définition et caractéristiques

Le terme vitamine C désigne un composé organique hydrosoluble, l'**Acide L-Ascorbique (ALA)**, encore appelé (R)-3,4-dihydroxy-5-((S)-1,2-dihydroxyéthyl) furan-2(5H)-one selon la nomenclature IUPAC. Ce composé est un des stéréo-isomères de l'acide ascorbique et de ses sels, les ascorbates. C'est un dérivé cyclique des hexoses.

L'acide ascorbique peut être retrouvé sous deux formes optiques : lévogyre et dextrogyre, mais seule la forme **lévogyre**, forme naturelle (acide L-ascorbique) est biologiquement active. La vitamine C peut être extraite de la nature ou créée par voie de synthèse à partir du D-Glucose (171).

La vitamine C est composée d'une fonction cétone, d'un cycle lactone, d'une fonction ène-diol et de deux fonctions alcools, l'une étant primaire et l'autre secondaire. La fonction ène-diol en C<sub>2</sub> de la vitamine C est responsable de l'**acidité** de la molécule et de son pouvoir **antioxydant**.

L'ALA s'oxyde en milieu alcalin, en présence de métaux, particulièrement ferreux, où il se transforme en acide mono-déhydroascorbique, puis en en acide déhydroascorbique, ces formes étant physiologiquement actives et présentes dans les liquides de l'organisme. La réaction entre la forme réduite et oxydée de l'acide ascorbique est réversible (172).



**Figure 28** : Structures de l'acide ascorbique et de ses produits d'oxydation

La vitamine C est un **antioxydant** mais également le **cofacteur** de nombreuses **enzymes**. Contrairement aux plantes et à certains animaux, les humains sont incapables de synthétiser la vitamine C en raison de l'absence de l'enzyme L-gulonolactone oxydase.

L'**activité** de la vitamine C est exprimée en UI, où 1 UI de vitamine C équivaut à 50 µg d'acide ascorbique lévogyre.

## Pharmacologie cutanée de la vitamine C

L'utilisation topique de la vitamine C couvre :

- le traitement des dermatoses inflammatoires,
- les soins anti-âges,
- les soins anti-pigmentaires,
- la photoprotection,
- le traitement du photovieillissement,
- l'utilisation en tant qu'agent conservateur.

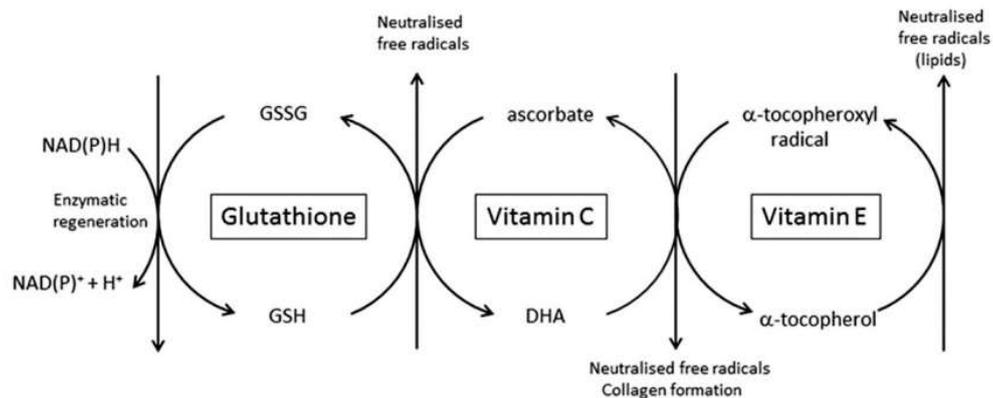
Les niveaux de vitamine C retrouvés dans la peau sont similaires à ceux d'autres antioxydants hydrosolubles tel que le glutathion (173). On retrouve dans la peau saine des concentrations importantes de vitamine C, de niveau comparable aux autres tissus de l'organisme et de niveau supérieur aux concentrations plasmatiques. L'épiderme contient des quantités plus importantes de vitamine C que le derme, avec des différences rapportées entre les deux couches allant d'un rapport 2 à 5 (174). On suspecte l'existence d'un gradient de concentration de vitamine C au sein du *stratum corneum* (175).

Les teneurs cutanées d'ALA sont limitées par la concentration plasmatique en ALA, qui ne peut augmenter au-delà d'un **point de saturation**. Ce phénomène est en lien avec le mécanisme de transport actif de l'ALA (176).

Appliquée sur peau saine, la vitamine C est repoussée par le *stratum corneum* du fait de ses caractères hydrophile et chargé. Ce n'est que lorsque les niveaux de pH sont inférieurs à 4, qu'une certaine pénétration peut se produire, celle-ci s'avérant par ailleurs dépendante d'autres paramètres de la formulation dans laquelle sera contenu le Principe Actif (PA) (177).

La vitamine C est un **antioxydant**, elle a donc la capacité de neutraliser les radicaux libres tels que les ROS et les dérivés du NO. Elle constitue l'un des acteurs de l'arsenal antioxydant cutané qui inclut des systèmes enzymatiques et non enzymatiques.

La vitamine C est particulièrement efficace pour réduire des dommages oxydatifs cutanés lorsqu'elle est **associée** à la **vitamine E** (178). En effet, la vitamine E, en tant qu'antioxydant lipophile, à la capacité d'interagir avec les membranes biologiques, et ainsi de limiter la peroxydation lipidique. Le stress oxydant issu de l'environnement, constitué par les UV et les polluants, est associé à une diminution des réserves cutanées de vitamine C (179).



**Figure 29** : Interdépendance des vitamines C, E et du glutathion dans leur régénération et la capture des radicaux libres d'après Pullar et al

La vitamine C est un **promoteur de la formation du collagène**. L'ALA agit en tant que **cofacteur** des proline et lysine **hydroxylases**, enzymes dont le rôle est de stabiliser la structure tertiaire des molécules de collagène. La dépendance des hydroxylases collagéniques vis-à-vis de la vitamine C a été démontrée dans plusieurs études *in vitro* sur les fibroblastes humains. L'absence de vitamine C conduit à la fois à une diminution de la synthèse et de la réticulation collagéniques. L'ALA favorise également l'expression génétique du collagène, ainsi elle stimule la production d'ARNm de collagène par les fibroblastes (174). Davidson et al concluent qu'*in vitro*, en présence de vitamine C, les fibroblastes humains synthétisent d'avantage de collagène I et IV (180).

La vitamine C est un **inhibiteur de la mélanogénèse**, conduisant à une réduction de la synthèse de mélanine *in vitro* et *in vivo*. Un mécanisme d'action proposé est sa capacité à interférer avec la tyrosinase, enzyme limitante de la mélanogénèse (181).

La vitamine C **interagit** avec de nombreuses **voies de signalisation intracellulaires** des cellules cutanées.

La vitamine C améliore la **différenciation** de **kératinocytes** murins dans un modèle de culture organotypique, conduisant à une organisation ultrastructurale optimisée du *stratum corneum*, accompagnée d'une augmentation de la production de granules de kératohyalines et de filaggrine.

La vitamine C améliore la formation de l'enveloppe cornifiée (182). L'ALA augmente également la **prolifération** et la **migration** des **fibroblastes dermiques** (183). *In vitro*, la synthèse de l'élastine par les fibroblastes s'avère stimulée ou inhibée par la vitamine C, et ce en fonction de sa concentration.

La vitamine C augmente la synthèse des **glycosaminoglycanes** lors de la formation de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, l'ALA amplifie *in vitro* l'expression génétique de fibroblastes humains en lien avec la réplication et la réparation de l'ADN. Elle élève l'index mitotique, la motricité cellulaire lors de la cicatrisation et augmente la réparation des bases de l'ADN (174).

Enfin, il est à noter que la capacité de protection des kératinocytes par la vitamine C vis-à-vis de l'exposition aux rayonnements UV est en lien avec son impact sur la **modulation de l'expression génétique** cellulaire, qui conduit à une inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et à la réduction des phénomènes d'apoptose (184).

La vitamine C joue par ailleurs un rôle dans la **modulation des voies épigénétiques**. On définit les modifications épigénétiques comme étant des **changements** potentiellement **réversibles** dans l'activité des gènes, n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires (185). La vitamine C régule l'expression des gènes en tant que cofacteur de la famille d'enzymes *ten-eleven translocation* (TET, translocation 10-11). Ces enzymes catalysent l'élimination de cytosines méthylées par leur hydroxylation en 5-hydroxyméthylcytosines (5 hmC). Des données suggèrent qu'une perte d'5 hmC se produirait pendant le développement précoce et la progression du mélanome. Il a été démontré que le traitement par vitamine C augmentait la teneur en 5 hmC dans les lignées cellulaires de mélanome, entraînant une diminution du phénotype malin (174).

## Vitamine C et cicatrisation de la brûlure : revue de la littérature

D'une manière générale, le paramètre déterminant de l'efficacité de l'application topique de la vitamine C est la concentration plasmatique en ALA. En effet, si la concentration plasmatique en ALA est saturée, son application par voie topique n'augmentera pas la teneur cutanée en ALA. Toutefois, dans le cas de la cicatrisation, le **renouvellement d'ALA** au sein de la plaie étant **constant** du fait de l'inflammation locale et des besoins d'augmentation de production de collagène, la supplémentation en ALA par voies orale et topique produit des effets sur la cicatrisation (174).

Dans les suites des brûlures graves, la concentration plasmatique en AA est rapidement altérée, pouvant chuter à des valeurs inférieures à 50 % de la concentration plasmatique initiale (28).

Les directives de la *Société Américaine de Nutrition Parentérale et Entérale* de 2016 recommandent ainsi l'administration de vitamines antioxydantes (vitamines C et E) et d'oligo-éléments (sélénium, zinc et cuivre) chez les patients brûlés, sur interprétation de méta-analyses. Ces dernières spécifient par ailleurs que les schémas posologiques et les modalités d'administration ne sont actuellement pas standardisées (77).

Selon *Graves et al* 87% des CDB déclaraient en 2009 administrer une supplémentation vitaminique en ALA (186).

L'ensemble des effets cutanés de la vitamine C détaillés supra est bénéfique pour la cicatrisation. La vitamine C est un cofacteur direct de la synthèse de collagène ; ainsi, un des signes cliniques associé à l'hypovitaminose est le retard de cicatrisation. Nous citerons les principaux résultats de quelques-unes des études réalisées chez l'homme sur le sujet.

D'après *Barbosa et al*, la supplémentation orale en vitamines C et E augmente le taux de cicatrisation chez des enfants présentant des brûlures étendues (187).

*Yun et al* concluaient en 2013, après réalisation d'une étude de faible niveau de preuve, à la réduction de la formation de cicatrices permanentes suite à plaies chirurgicales en présence de l'application topique de vitamine C contenue dans un gel de silicone (188).

*Sarpooshi et al* publiaient en 2016 dans le *Journal of Biomedical Science* une étude évaluant l'efficacité de l'application d'une solution à 10% d'AA préalablement à celle de Flammazine® sur la réduction du tissu de granulation des plaies de brûlure du second degré. Ils concluaient qu'après 7 et 14 jours de traitement, les zones qui avaient reçu de la vitamine C topique présentaient une croissance des tissus de granulation plus rapide par rapport au groupe contrôle (189).

*Pielestz et al* concluaient quant à eux en 2017, suite à analyse spectroscopique de tissus humains excisés brûlés aux 3 ou 4<sup>ème</sup> degrés, incubés ou non pendant 24 heures dans une solution d'ALA à 3,5%, que l'ALA diminue les symptômes externes la brûlure sur les tissus traités (190).

#### **iv. Conclusion**

Malgré l'absence d'études cliniques de haut niveau de preuve justifiant l'intérêt de l'utilisation des vitamines A, C et E par voie topique dans la cicatrisation de la brûlure, la littérature fournit un rationnel pharmacodynamique, incluant les propriétés antioxydantes des vitamines C et E et les effets fibroblastiques et kératinocytaires des vitamines A et E, en faveur de leur incorporation dans une préparation topique à 1% de SSD. Par ailleurs, un nombre non négligeable d'études pré-cliniques et cliniques confirme l'intérêt de telles supplémentations dans le but d'optimiser les propriétés cicatrisantes de préparations topiques.

## 2.4. Préformulation : choix de dérivés vitaminiques estérifiés

*Erbert de Deritter* présentait en 1982 dans le *Journal of Pharmaceutical Sciences* une revue de la littérature concernant les spécificités liées à la formulation des préparations pharmaceutiques contenant des vitamines. Selon cet auteur, un certain nombre de vitamines, telle que la **vitamine E**, peut être classé comme **stable** car ne présentant pas de problème majeur en ce qui concerne la stabilité dans les formes galéniques pharmaceutiques. Les vitamines **labiles** susceptibles de poser des problèmes d'instabilité incluent la **vitamine A** et la **vitamine C**. L'auteur précisait alors que les esters synthétiques vitaminiques, tels que l'**acétate de tocophérol** pour la vitamine E ou le **palmitate de rétinyle** pour la vitamine A, sont des composés plus stables que les vitamines sous formes natives (191).

Trente ans plus tard, *Gianiti et al* écriront, dans un esprit similaire à *De Ritter*, que les dérivés des vitamines A, C et E sous formes **estérifiées** sont préférentiellement utilisés dans les formulations topiques du fait de leur stabilité améliorée (192).

En suivant cette même logique, l'objectif du travail de préformulation présenté ci-dessous était de sélectionner, pour chacune des vitamines A, C et E, un dérivé estérifié.

Les critères de sélection incluait pour chaque vitamine :

- i. L'existence de **spécialité pharmaceutique injectable** contenant le principe actif, et ce dans un souci (i) de simplification des contrôles analytiques sur Matière Première à Usage Pharmaceutique (MPUP) associés à la préparation (cf chapitre 2.2.3. supra), (ii) de simplification du futur procédé de fabrication de la préparation par l'utilisation de PA solubilisés et (iii) de sécurisation de la qualité microbiologique de la forme pharmaceutique finale.
- ii. En cas de non-respect du critère (i) ci-dessus, l'existence à minima pour le PA sélectionné d'une **monographie PhE** (cf chapitre 2.2.3. supra), en conformité des exigences des BPP.
- iii. Des notions de **stabilité**.
- iv. Des notions de **métabolisme cutané**, nécessaires à l'assurance de l'efficacité de tels PA.

Dans un deuxième temps, une recherche bibliographique des **concentrations** utilisées dans les domaines pharmaceutique et cosmétique a été effectuée pour chaque ester à partir des données de la littérature. Ces recherches avaient pour objectif de **déterminer 3 gammes de concentrations vitaminiques**, respectivement basse, moyenne et haute.

Il serait ainsi développé puis évalué trois types de formulations à 1% de SSD composées de suppléments vitaminiques qualitativement fixes (vitamines A, C et E) mais quantitativement variables (gamme basse, gamme moyenne, gamme haute). Il s'agit des formulations *F1*, *F2*, et *F3* qui seront présentées dans le chapitre 2.5.1.

Les formes estérifiées des vitamines A, C et E sélectionnées s'avèrent être respectivement le **palmitate de rétinyle (RP)**, l'**ascorbyle palmitate (AP)** et l'**acétate de tocophérol (TA)**.

### 2.4.1. Palmitate de rétinyle

#### i. Généralités

En France, une seule spécialité pharmaceutique injectable à base de vitamine A, disposant d'une AMM, est disponible : il s'agit de la **Vitamine A Nepalm® 100 000 UI/2 mL**. Elle contient un dérivé estérifié de la vitamine A: le RP. La composition qualitative de cette spécialité est présentée dans le **tableau 8**.

La PhE précise dans la monographie de la vitamine A (n°0217) que cette vitamine est **généralement** utilisée sous la forme d'**esters** tels que l'acétate, le propionate et le **palmitate**. Cette monographie définit les exigences de qualité auxquelles est soumis le RP de qualité pharmaceutique (193).

Le *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS, Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs) est un groupe de travail de la Commission Européenne émettant des avis sur les risques en matière de santé et de sécurité (risques chimiques, biologiques, mécaniques et autres risques physiques) des produits de consommation non alimentaires.

Ce comité a élaboré en 2017 un avis sur la **vitamine A** (rétinol) et ses dérivés retinyl acétate et RP. Le SCCS spécifie que la vitamine A est principalement retrouvée dans les produits cosmétiques sous forme de rétinol, de **RP** et de retinyl acétate (194). Les esters de rétinol sont mieux tolérés par la peau que le rétinol et l'acide transrétinoïque (195).

**Tableau 8** : Composition qualitative de la spécialité Vitamine A Nepalm® 100 000 UI/2 mL

Constituants	Catégories fonctionnelles <sup>a</sup>
Retinyl pamitate	Principe actif
Cremophor RH 40	Agent émulsifiant
Polysorbate 60 (= Polyoxyethylene 20 sorbitan monostearate)	Agent dispersant
Eau Pour Préparations Injectables (P.P.I)	Solvant
Benzoate de sodium	Conservateur antimicrobien
Alpha tocophérol	Conservateur antioxydant
Acide chlorhydrique	Agent d'ajustement du PH

*a: Ramond C Rowe et al. Handbook of Pharmaceutical Excipients (6th Ed), Stokesley, 2009. [Book]*

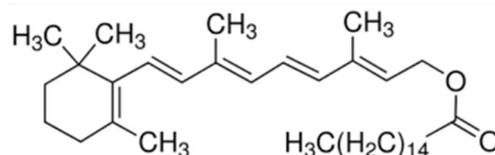
Le RP est formé par greffage de l'acide palmitique, un acide gras à longue chaîne, au radical hydroxyle de la chaîne latérale du rétinol. Les propriétés physico-chimiques de ce composé de formule brute C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>O<sub>2</sub> et de nomenclature IUAPC All-trans-3, 7-diméthyl-9-(2, 6, 6-triméthyl-1-cyclohexen-1-yl)-2, 4, 6, 8- nonatetraene-1-yl palmitate sont présentées dans le **tableau 9**.

Le RP est soluble dans la plupart des solvants organiques (éthanol, isopropanol, chloroforme, l'acétone), dans les graisses et les huiles. Il est insoluble dans l'eau et le glycérol (194).

**Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques du palmitate de rétinyle**

(Adapté de DrugBank; <https://www.drugbank.ca/salts/DBSALT000855>)

Structure chimique



Masse moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	524,86
Log P (octanol-eau)	10,12
pKa 2	-
pKa 1	- 7
Solubilité aqueuse (mg/mL)	8.07e-05
Nombre d'hydrogènes accepteurs	2
Nombre d'hydrogènes donateurs	0
Aspect macroscopique	Solide jaune pâle ou l'état de fusion (T > 26°C), liquide jaune huileux

Concernant l'expression de l'**activité** du RP, 1 UI de vitamine A correspond à 0.300 µg de rétinol, soit 0.550 µg de palmitate de rétinyle. L'unité Rétinol Equivalent (RE) est aussi retrouvée dans la littérature, où 1 mg de rétinol correspond à 1000 µg RE et 1 mg de RP à 550 µg RE (194).

## ii. Métabolisme cutané du palmitate de rétinyle

La pénétration et l'absorption percutanée du RP ont été étudiées *in vitro* et *in vivo*, sur des modèles animaux et humains. Le RP est absorbé de manière effective, et ce, suite à sa **bioconversion**, principalement sous forme de rétinol, puis de rétinaldéhyde et d'acide rétinoïque (131).

L'absorption percutanée du RP sur biopsies cutanées humaines montées sur cellules de diffusion a été mesurée par *Boehnlein et al.* 24 heures après application de 20 µg/m<sup>2</sup> de RP, 8 % du matériel déposé avait été absorbé. Environ 44 % du matériel absorbé a été retrouvé sous forme de rétinol ; enfin 0,2 % avait traversé l'ensemble des couches cutanées (196).

Sur modèles animaux cette fois, *Yan et al* ont étudié la répartition des rétinoïdes dans les différentes strates cutanées suite à l'application quotidienne pendant 4 jours d'une émulsion à 0,5% (m/m) de RP sur peau de souris. L'absorption du RP était plus importante dans l'épiderme que dans le derme ; toutefois, le derme représentant un pourcentage surfacique plus important que l'épiderme, la majorité des rétinoïdes s'avérait dermique (197).

### iii. Concentrations retrouvées dans la littérature

#### Vitamine A topique

Les médicaments topiques à base de vitamine A commercialisés en France comprennent :

- L'Avibon 1 000 000 UI POUR CENT, pommade à base de concentrat de vitamine A synthétique, destinée au traitement d'appoint des dermatites irritatives.
- La Vitamine A Dulcis 25 000 UI/100 g, pommade ophtalmique à base de concentrat de vitamine A synthétique, destinée au traitement d'appoint des troubles de la cicatrisation cornéenne (198).

Pour induire une activation du récepteur à l'EGFR sur peau humaine *in vitro*, *Rittié et al* utilisaient 0,1% de rétinol topique (148).

#### Rétinoïdes de synthèse topiques

Concernant les médicaments à base d'acide rétinoïque ou trétinoïne, des concentrations variables sont disponibles : 0.025%, 0.05%, et 0.1%. Les préparations topiques à 0.1% de trétinoïne et 0.1% tazarotène, conduisent fréquemment à des irritations cutanées modérées à sévères (199). On estime que le rétinol est environ 20 fois moins puissant que la trétinoïne, il nécessite par ailleurs d'être converti *in vivo* en acide rétinoïque pour exercer son action (200).

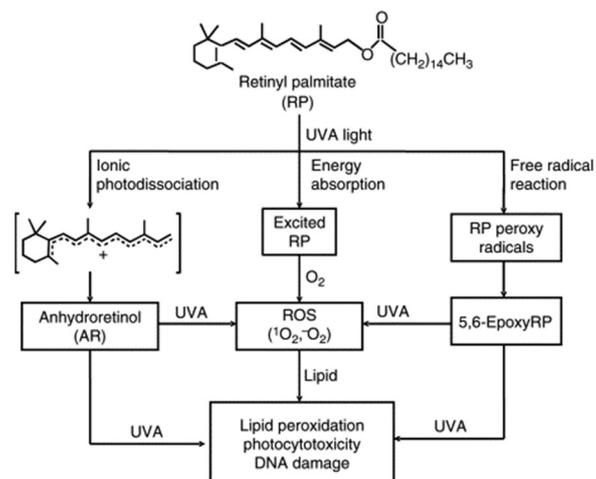
## Palmitate de rétinyle

Aucune spécialité pharmaceutique topique disposant d'une AMM ne contient du RP en tant que PA. Les teneurs autorisées de vitamine A dans les produits cosmétiques sont définies par la SCCS. Les lotions pour le corps doivent contenir des concentrations maximales de 0,3% ER. Les crèmes pour les mains et le visage doivent contenir des concentrations maximales de 0,05% ER. Ces produits sont généralement présentés comme agents anti-rides (194).

### iv. Stabilité

Au-delà de la perte d'efficacité induite par l'éventuelle dégradation des rétinoïdes au sein des préparations pharmaceutiques, ces composés s'avèrent phototoxiques et photocarcinogéniques (201). Les problématiques de stabilité constituent donc une préoccupation majeure dans la formulation de cosmétiques de préparations pharmaceutiques à base de vitamine A.

Le SCCS spécifie que le RP est plus stable que le rétinol, mais présente la même typologie de dégradation, incluant une sensibilité aux agents oxydants tels que les rayonnements UV, la chaleur et l'oxygène atmosphérique. Le RP est également sensible aux métaux (194). Lors de sa photoirradiation, le RP s'isomérise en un mélange d'isomères *trans* et *cis*. Les composants de la formulation dans laquelle est contenu le RP peuvent affecter à la fois l'étendue de l'isomérisation des *trans*-rétinoïdes et les quantités relatives des différents isomères *cis* formés (201).



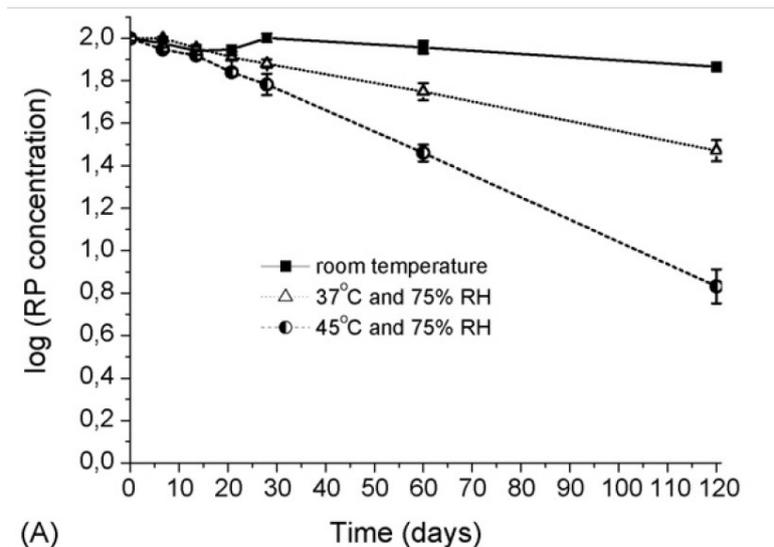
**Figure 30 :** Photodégradation du palmitate de rétinyle d'après Fu et al

La dégradation du RP en solution est inversement proportionnelle à sa concentration initiale. Le RP s'avère d'avantage dégradé en présence d'Ultraviolets A (UVA) que d'UVB (202). La chaleur et les métaux traces accélèrent la décomposition du RP par l'oxygène et la lumière ; cette molécule est par ailleurs sensible aux acides et aux bases (194).

Le RP est d'avantage protégé de l'oxydation en phase huileuse qu'en phase aqueuse. Le RP est légèrement moins stable en émulsion Huile dans Eau (H/E) que dissout dans un solvant organique tel que l'octyl octanoate. Ce phénomène est probablement causé par la localisation à l'interface eau/huile du RP, la phase aqueuse pouvant influencer négativement la stabilité de cette vitamine (202).

Le RP peut être protégé de l'isomérisation en prévenant l'exposition aux UV et à l'air par utilisation d'un emballage primaire du produit final imperméable à l'oxygène et opaque. D'autres stratégies peuvent également être employées, incluant l'incorporation d'antioxydants stabilisants tel que le ButylHydroxyToluène (BHT) dans la formulation ou encore les stratégies de vectorisation du RP (e.g. encapsulation) (195).

*Guaratini et al* mettaient en évidence la corrélation entre la stabilité chimique du RP et la stabilité physique (évaluée par analyses rhéologiques) de la crème H/E dans laquelle cette vitamine était incorporée, suggérant l'impact des produits de dégradation formés sur les caractéristiques physiques de la préparation. La dégradation du RP dans les émulsions H/E suit une réaction du premier ordre. Selon l'équation d'Arrhenius, la durée théorique permettant le maintien de 85% de la concentration initiale en RP est d'environ 77 jours à température ambiante. *Guaratini et al* obtiennent des résultats similaires à température ambiante, validés par des études complémentaires en condition de dégradation accélérée (203).



**Figure 31** : Quantification du RP contenu dans des gels-crèmes à 1% de RP au cours du temps conservés à 75% d'humidité relative et (i) à température ambiante (25 °C), (ii) à 37°C ou (iii) 45 °C d'après Guaratini et al

Composition du gel-crème : RP 1 %, TA 2%, Sepigel™ 5.0 %, NET FS™ 4.0%, glycérine 2.0%, Phenova™ 0.8%, propylène glycol 3.0 %,dl- $\alpha$ -tocophérol 0.02%.

## 2.4.2. Acétate de tocophérol

### i. Généralités

En France, une seule spécialité pharmaceutique injectable dont le principe actif est la vitamine E et disposant d'une AMM, est disponible : il s'agit de la **Vitamine E Nepalm® 100 000 UI/2 mL**, qui contient un dérivé estérifié de la vitamine E : le TA. La composition qualitative de cette spécialité pharmaceutique est présentée dans le **tableau 10**.

Dans les autres cas, le TA est retrouvé dans les médicaments à des concentrations plus faibles, en tant que conservateur antioxydant.

Pour une meilleure stabilité, la vitamine E est couramment utilisée sous forme estérifiée, telle que le TA (204). La monographie n°0439 de la PhE définit les exigences de qualité et les méthodes d'analyse de référence associées au TA de qualité pharmaceutique.

**Tableau 10** : Composition qualitative de la spécialité Vitamine E Nepalm® 100 mg/2 mL

Constituants	Catégories fonctionnelles <sup>a</sup>
Acétate de tocophérol	Principe actif
Cremophor EL	Agent émulsifiant
Water for injection	Solvant
Phénol	Conservateur
Glycérol	Co-solvant

*a: Ramond C Rowe et al. Handbook of Pharmaceutical Excipients (6th Ed), Stokesley, 2009.  
[Book]*

L'analyse des registres du *Voluntary Cosmetic Registration Program* (VCRP, programme d'inscription volontaire des cosmétiques) de la *Food et Drug Administration* (FDA, agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) permet de déterminer la fréquence d'utilisation du TA parmi les dérivés de la vitamine E entrant dans la composition des produits cosmétiques. Pour l'année 2013, **59,20 %** des cosmétiques à base de vitamine E contenaient en réalité du **TA**.

Le groupe d'experts *Cosmetic Ingredient Review* (CIR, revue des ingrédients cosmétiques) a évalué en 2014 comme sûre l'utilisation du TA en tant qu'ingrédient entrant dans la composition des produits destinés à la voie topique (205).

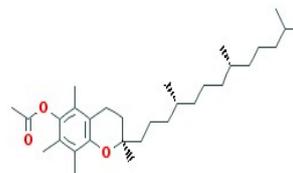
Le TA est formé par greffage de l'acide acétique, un acide gras à courte chaîne, au radical hydroxyle du noyau chromanol du tocophérol.

Les propriétés physico-chimiques de ce composé de formule brute  $C_{31}H_{52}O_3$  et de nomenclature IUAPC all-rac-2,5,7,8-Tetraméthyl-2-(4,8,12-triméthyltridécyloxy)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-6-yl acétate sont présentées dans le **tableau 11**.

Le TA est pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acétone, dans l'éthanol anhydre et dans les huiles.

**Tableau 11 : Propriétés physico-chimiques de l'acétate de tocophérol**

Structure chimique



Masse moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	472,74
Log P (octanol-eau)	9,06
pKa 2	-
pKa 1	- 4,9
Solubilité aqueuse (mg/mL)	2.93e <sup>-06</sup>
Nombre d'hydrogènes accepteurs	2
Nombre d'hydrogènes donateurs	0
Aspect macroscopique	Liquide huileux, limpide, incolore ou légèrement jaune-vert, visqueux.

Base de données DrugBank; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB14002>

Concernant l'expression de l'**activité** du TA, 1,36 UI de vitamine E correspond à 1 mg de d- $\alpha$ -acétate de tocophérol ; 1,00 UI de vitamine E correspond à 1 mg de dl- $\alpha$ -acétate de tocophérol (206).

## ii. Métabolisme cutané de l'acétate de tocophérol

Le TA est un promédicament puisqu'il nécessite une étape d'hydrolyse pour être transformés en vitamine E active.

La plupart des études suggère que la bioconversion du TA en vitamine E est beaucoup moins importante dans le *stratum corneum* humain que dans les couches épidermiques nucléées. Ces phénomènes de bioconversion semblent dépendants de la formulation (204).

*Baschong et al* ont étudié *in vitro*, et pour 4 types de véhicules différents contenant 2% de TA, (i) la pénétration cutanée du TA et (ii) la bioconversion du TA en tocophérol dans des échantillons de peau humaine.

Le TA était (a) soit dissout dans de l'huile de coco fractionnée, (b) soit solubilisé dans de l'eau à l'aide d'un mélange de tensioactifs (PEG-40, huile de ricin hydrogénée et PPG-26-buteth-26), (c) soit encore encapsulé dans des liposomes de phosphatidylcholine de soja ou (d) encapsulé dans des nanotopes™. Une dose de 11 mg /cm<sup>2</sup> de chaque formulation (correspondant à 220 pg / cm<sup>2</sup> de TA) a été appliquée sur les échantillons de peau en conditions occlusive et non occlusive.

Après 8 heures d'exposition, la distribution du TA et du tocophérol libre dans les différentes strates cutanées a été déterminée. Le taux de recouvrement en vitamine E totale (TA + tocophérol libre) a dépassé 90% pour chacune des expérimentations.

En fin d'expérimentation, le TA initialement dissout dans l'huile de coco fractionnée, était situé soit à la surface de la peau, soit dans la couche cornée.

Concernant les trois autres formulations, des différences significatives ont été observées entre les conditions occlusive et non occlusive, l'application en condition non occlusive conduisant à des taux majorés de vitamine E totale dans les couches inférieures au *stratum corneum*. La bioconversion du TA en tocophérol libre a eu lieu dans l'ensemble des couches cutanées à l'exclusion du *stratum corneum*. Enfin, le pourcentage de bioconversion du TA en tocophérol s'est révélé plus élevé dans le cas de l'application occlusive des formulations testées. La distribution de la vitamine E totale dans les différentes strates cutanées ainsi que les pourcentages de bioconversion du TA en tocophérol, pour chaque formulation, sont présentés dans **tableau 12** (207).

**Tableau 12 : Recouvrement du TA et du tocophérol au cours de l'essai de perméation et bioconversion du TA en tocophérol d'après Baschong et al**

Formulation	Vitamin E form	Surface		Horny Layer		Underlying Skin <sup>5</sup>	
		Non-Occlusive	Occlusive	Non-Occlusive	Occlusive	Non-Occlusive	Occlusive
in triglyceride oil	tocopherol+acetate	79.2	74.2	12.6	17.0	0.4	--
	tocopherol	1.2	1.2	0.1	0.1	--	--
surfactant-solubilized in water	tocopherol+acetate	43.2	48.4	20.7	27.6	26.6	16.6
	tocopherol	1.3	1.4	0.9	1.3	9.3	8.1
	% conversion					34.8	48.9
soybean phosphatidylcholine liposomes	tocopherol+acetate	30.6	40.6	23.6	33.0	36.8	20.2
	tocopherol	1.3	1.9	1.3	1.7	14.5	10.5
	% conversion					39.4	51.2
nanotope	tocopherol+acetate	24.5	29.5	24.0	31.1	45.3	31.7
	tocopherol	1.12	1.5	1.1	1.5	19.5	15.69
	% conversion					43.1	49.2

*In vivo*, des pommades contenant 2 % ou 20 % de TA ont été appliquées sur le dos de cinq rats Wistar mâles pendant 24 heures, puis un poinçon de 2 cm a été prélevé pour déterminer la teneur en vitamine E de la peau. L'application de la formulation contenant 20% de TA a conduit à une augmentation statistiquement significative de la teneur cutanée en vitamine E, contrairement à la formulation contenant 2 % de TA. En fin d'expérimentation, la teneur en vitamine E cutanée avait augmenté de 2,9 µg / g de peau suite à l'administration de la pommade à 20% de TA, contre 0,8 µg / g de peau avec la pommade à 2% de TA (208).

### iii. Concentrations retrouvées dans la littérature

Aucun médicament topique à base de vitamine E ne dispose en France d'une AMM. Concernant les formulations cosmétiques, les concentrations de vitamine E retrouvées dans ces dernières s'avèrent extrêmement variables.

En effet, bien que les recommandations d'utilisation du TA topique selon le *In Cosmetic Group* soient comprises entre 0.1 % et 5.0%, des produits avec des concentrations allant de 0,00000001% à 100 % de TA (cas de l'huile Veal Oil®) ont été développés et commercialisés en Europe et aux États-Unis. *Thiele et al* soulignent, dans une revue de la littérature consacrée à la vitamine E topique, le manque de données publiées sur l'étude dose-réponse de la vitamine E, permettant à terme une définition des posologies optimales de vitamine E (209).

*Baumann et al* dans l'article « *The Effects of Topical Vitamin E on the Cosmetic Appearance of Scars* » concluent à l'efficacité d'une préparation topique contenant 320 UI/gramme de vitamine E sur l'apparence des cicatrices (210). Cette concentration équivaldrait à 32 % (m/m) de TA

*Palmieri et al* rapportaient en 1995 l'effet bénéfique de l'utilisation de gel de silicone contenant 3% de d-α-tocophérol sur des cicatrices hypertrophiques et des chéloïdes apparues suite à interventions chirurgicales ou brûlures (211). Cette concentration équivaldrait à 4,08 % (m/m) de TA.

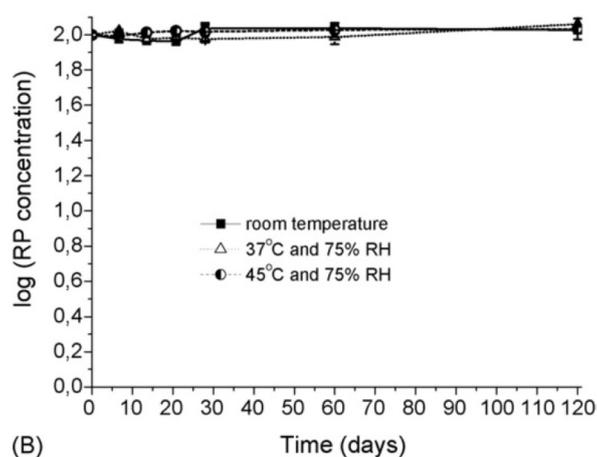
Enfin, *Stanizzi et al* concluaient, dans une étude de faible qualité, à l'effet bénéfique de l'application de Veal Oil®, préparation contenant 100%, de TA sur la cicatrization des brûlures, des ulcères superficiels post-traumatiques et des greffes de peau (212). On retrouve toutefois

dans la littérature la description de dermatites irritatives associées à l'utilisation de telles concentrations de TA.

## v. Stabilité

Conformément aux résultats de l'étude de stabilité de gels-crèmes contenant 1% de RP et 2 % de TA menée par *Guaratini et al*, le TA est relativement stable à l'air et à la chaleur. Il est toutefois sensible à l'humidité, aux alcalins qui conduisent à son hydrolyse, aux acides forts et aux oxydants forts. La plage de pH recommandée pour les formulations contenant du TA est comprise entre 4 et 8. Enfin, le TA est sensible aux métaux lourds (213). Les variations de concentration de TA contenu dans les gels-crèmes de *Guaratini et al*, en condition de vieillissement normal et accéléré, sont présentées dans la **figure 32**.

Les auteurs de cette étude concluaient que le TA, du fait de sa stabilité importante en comparaison du RP, ne constituait pas un composant déterminant de la Date Limite d'Utilisation (DLU) de telles formulations.



**Figure 32** : Quantification du TA contenu dans des gels-crèmes à 2% de TA au cours du temps conservé à température ambiante (25 °C), 37 ou 45 °C et 75% d'humidité relative d'après *Guaratini et al*

Composition du gel-crème : RP 1 %, TA 2%, Sepigel™ 5.0 %, NET FS™ 4.0%, glycérine 2.0%, Phenova™ 0.8%, propylène glycol 3.0 %, dl- $\alpha$ -tocophérol 0.02%.

### 2.4.3. Palmitate d'ascorbyle

#### i. Généralités

En France, aucune spécialité pharmaceutique injectable disposant d'une AMM ne contient d'AA-PAL en tant que PA, les spécialités injectables à base de vitamine C, telle que la Laroscorbine® injectable, étant composées d'ALA. Les spécialités médicamenteuses commerciales actuellement disponibles intègrent, pour certaines d'entre elles, l'AA-PAL dans leur composition, en tant qu'excipient antioxydant (214).

Les premières formulations cosmétiques destinées à l'administration topique cutanée de vitamine C incluait cette vitamine sous forme d'ALA. Toutefois, ces dernières s'avéraient instables en raison de l'oxydation rapide de l'ALA, en particulier en conditions aérobie et/ou d'exposition à la lumière (199). Pour améliorer la stabilité de la vitamine C dans les formulations topiques, des dérivés estérifiés ont été développés (215).

Trois dérivés estérifiés de la vitamine C sont aujourd'hui largement utilisés en cosmétologie : le palmitate d'ascorbyle (*Ascorbyl 6-palmitate*, AA-PAL), le phosphate d'ascorbyle de sodium (*Sodium Ascorbyl Phosphate*, SAP) et le phosphate d'ascorbyle de magnésium (*Magnesium Ascorbyl Phosphate*, MAP). L'AA-PAL est un ester d'acide gras, lipophile tandis que le SAP et le MAP sont des esters d'acides inorganiques et sont hydrosolubles.

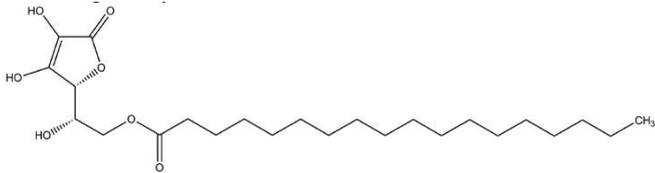
L'analyse des registres du VCRP de la FDA a déterminé la fréquence d'utilisation de l'AA-PAL parmi les dérivés de la vitamine C entrant dans la composition des produits cosmétiques. Cette étude conclut qu'en 2016, l'AA-PAL était incorporé dans **79,62%** des cas (205).

Il est à noter que parmi les dérivés estérifiés de la vitamine C précédemment cités, seul l'AA-PAL dispose d'une **monographie** au sein de la PhE (n°0807). Ce point s'est être décisif dans notre choix de dérivé de vitamine C incorporé dans la préparation en développement.

Par ailleurs, en 2016, le CIR a conclu que l'utilisation de l'AA-PAL en tant qu'ingrédient entrant dans la composition des produits cosmétiques était considérée comme sûre (205).

Enfin, l'AA-PAL a été approuvé par la FDA pour être utilisé comme excipient dans des produits médicamenteux.

**Tableau 13 : Propriétés physico-chimiques du palmitate d'ascorbyle**

Structure chimique	
	
Masse moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	414,54
Log P (octanol-eau)	6
pKa 2	4.45
pKa 1	-3.6
Solubilité aqueuse (mg/mL)	74.47
Nombre d'hydrogènes accepteurs	7
Nombre d'hydrogènes donateurs	3
Aspect macroscopique	Poudre blanche à jaune-blanche

(Base de données Pubchem; [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Ascorbyl\\_6-palmitate](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Ascorbyl_6-palmitate))

L'AA-PAL est formé par condensation du chlorure de palmitoyle avec l'acide ascorbique en présence d'un agent de déshydrochloration tel que la pyridine (216). Sa formule brute est C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub> et sa nomenclature IUPAC hexadécanoate de (2S)-2-[(2R)-3,4-dihydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl]-2-hydroxyéthyle.

L'AA-PAL est pratiquement insoluble dans l'eau, le chlorure de méthylène et les huiles grasses, mais il est facilement soluble dans l'éthanol à 96 % (132).

## ii. Efficacité cutanée du palmitate d'ascorbyle

La littérature est discordante sur les capacités de la peau à métaboliser l'AA-PAL en ALA. Nous verrons toutefois que, comme exposé par *Stamford et al* dans le *Journal of Cosmetic Dermatology* en 2012, sa potentielle non conversion en ALA n'implique ni son inactivité pharmacodynamique, ni son inefficacité (217).

Le rapport émis par le CIR en 2017 concernant les dérivés de la vitamine C comprend deux études en faveur de la bioconversion cutanée de l'AA-PAL ; il est à noter que celles-ci semblent de faible qualité. Une étude effectuée sur des cochons d'inde concluait à la pénétration cutanée de l'AA-PAL au sein de la peau des animaux sacrifiés, avec des concentrations cutanées 8 fois supérieures au groupe témoin. Une autre étude stipulait que l'application topique d'AA-PAL marqué au carbone 14 sur des cochons d'inde atteints de scorbut conduisait à des concentrations d'ALA à minima 4 fois supérieures au groupe témoin (194).

L'absorption percutanée de l'AA-PAL issu d'une formulation contenant 10 % d'AA-PAL a été évaluée *ex-vivo*, par *Pinnell et al*, à l'aide de cellules de diffusion en condition semi-occlusive sur peau de porc. Cette étude rapporte des résultats inverses à ceux précédemment cités. Les concentrations d'ALA mesurées au sein de la peau après exposition à l'AA-PAL ont été comparées aux taux cutanés initiaux d'ALA. Après exposition, les concentrations d'ALA cutanées étaient comparables à celles du groupe témoin (218).

D'après *Bissett et al*, bien que l'AA-PAL pénètre dans la peau, il semble difficilement converti en ALA *in vivo*. *Gosenca et al* suggéreront que, suite à son application topique, l'AA-PAL semble rester au niveau de la surface extracellulaire des tissus traités (194).

Toutefois, l'AA-PAL est, tout comme l'ALA, un composé biologiquement actif. Le **radical ascorbyle libre de l'AA-PAL** lui permet d'exercer son effet antioxydant de façon similaire à l'ALA. L'AA-PAL augmente par ailleurs la synthèse (i) de procollagène intracellulaire et (ii) de collagène excrété dans un modèle *in vitro* de cellules musculaires lisses intestinales en culture (217).

### iii. Concentrations retrouvées dans la littérature

L'analyse des registres du VCRP de la FDA rapporte pour l'année 2016 des concentrations extrêmement variables (comprises entre 0.000001 % et 2 %) en AA-PAL entrant dans la composition des produits cosmétiques aux Etats-Unis. Classiquement, l'AA-PAL est utilisé comme agent conservateur à des concentrations de 0,05 à 0,1% (m/m), alors qu'à des concentrations plus importantes, de 1 % à 2%, il est utilisé comme actif (205).

*Rosenblat et al* démontraient en 1999 dans le *Journal of Cellular Biochemistry*, que l'AA-PAL augmentait d'un facteur 2 la synthèse de collagène excrété *in vitro*, à des concentrations de 2,5 et 5 µM/L (soit 10,33 % (m/v) et 20,7 % (m/v)), de cellules musculaires lisses intestinales en culture. Ils démontraient également qu'à ces mêmes concentrations, l'AA-PAL induisait une augmentation des taux intracellulaires d'ARNm de procollagène I et III à l'état d'équilibre, respectivement par des facteurs 1,6 et 3,5 (217).

*Jurkovic et al* présentaient en 2003 dans le *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, une étude d'efficacité *ex-vivo* comparant l'application topique préalable d'une gamme de microémulsions contenant de l'AA-PAL versus véhicule seul, suivie d'une irradiation par UVA pendant 30 minutes, sur la formation de radicaux libres. Ils concluaient à l'effet bénéfique de l'AA-PAL, de façon concentration dépendante (concentration maximale évaluée 5 % (m/m)) et à l'efficacité supérieure de l'AA-PAL incorporé dans des microémulsions de type H/E (219).

On retrouve sur le marché européen des cosmétiques contenant des concentrations élevées d'ALA : 8 % d'ALA dans le sérum C-Recover® du laboratoire Filorga®, 30 % d'équivalent vitamine C pour la crème Tri Vita C30® du laboratoire Dermaceutic®.

Concernant les concentrations d'ALA retrouvées dans des études cliniques destinées à des applications médicales, *Sarpooshi et al* publiaient en 2016 dans le *Journal of Biomedical Science* une étude évaluant l'efficacité de l'application d'une solution à **10% d'AA** préalablement à celle de Flammazine® sur la réduction du tissu de granulation des plaies de brûlure du second degré. Les auteurs concluaient à l'efficacité de cette solution (189).

*Pielestz et al* incubaient quant à eux, pendant 24 heures, des tissus humains brûlés dans une solution d'ALA à 3,5% et concluaient également à des résultats significatifs (190).

*Al-Niimi et al* stipulaient dans l'article « *Topical Vitamin C and the Skin* » paru en 2017 dans le *Journal of Clinical et Aesthetic Dermatology*, que des concentrations supérieures à 8 % d'ALA s'avèrent nécessaires à son efficacité. Selon ces auteurs, les produits contenant de la vitamine C, les plus connus actuellement disponibles, sont donc de l'ordre de 10 à 20% pour exercer un effet antioxydant (219).

Il est à noter que d'après les résultats de *Pinnell et al* concernant l'évaluation dose-réponse de l'ALA en application topique, des niveaux de concentration supérieurs à 20% d'ALA n'augmentent pas ses effets biologiques et provoquent au contraire une irritation cutanée (218).

#### **iv. Stabilité**

L'oxydation de la vitamine C et de ses esters au sein des formulations est repérée par l'apparition d'une coloration jaunâtre, qui s'accroît avec le temps (220).

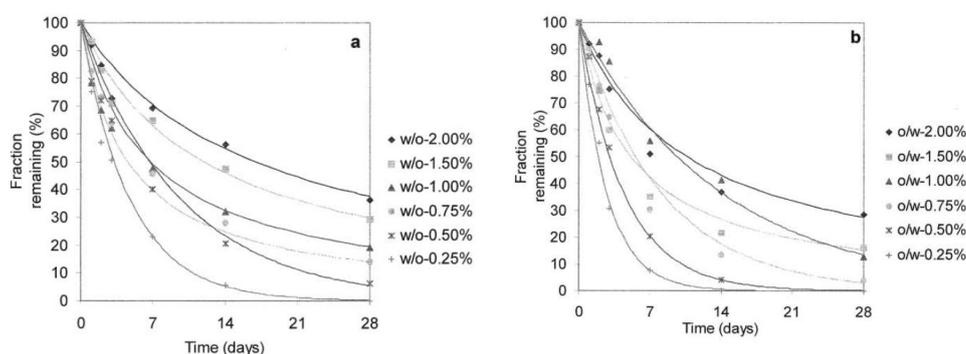
*Austria et al* évaluaient en 1996 la stabilité de l'AA-PAL au sein d'émulsions de type H/E, en utilisant différents types d'agents émulsifiants. La formulation A comportait comme système émulsifiant 2.0 % (m/m) d'Eumulgin B1 (Cetareth-12) et 1.5 % (m/m) d'Eumulgin B2 (Cetareth-20). La formulation B comportait comme système émulsifiant 3,0 % (m/m) de Brij 72 (Stearth-2) et 2,0 % (m/m) de Brij 721 (Stearth-21). Enfin, la formulation 3 était composée d'alcool comme agent solubilisant et de 3 % (m/m) de Sepigel 305 (Polyacrylamide/C<sup>3</sup>/~4 Isoparaffin/Laureth-7) en tant qu'agent épaississant et stabilisant de l'émulsion.

Au terme de 2 mois de conservation à température ambiante et à l'abri de la lumière, 27 % de l'AA-PAL était présent au sein de la formulation A, 50 % au sein de la formulation B et 85 % dans la formulation C. La viscosité du véhicule augmentait donc significativement la stabilité de l'AA-PAL (220).

La stabilité de l'AA-PAL a également été évaluée par *Spiclin et al*, en l'incorporant dans des microémulsions H/E et eau dans huile (E/H), à des concentrations variant de 0,25 % à 2,00 % (m/m) et pendant une durée de 28 jours, en conditions de conservation à température ambiante ( $22 \pm 1$  °C), à l'abri de la lumière.

Après 28 jours, au moins 60 % de l'AA-PAL avait été dégradé dans l'ensemble des formulations. Le pourcentage d'AA-PAL non dégradé s'est avéré supérieur pour les microémulsions E/H qu'H/E, en lien avec la structure chimique de ce composé qui lui confère des propriétés tensioactives. L'AA-PAL se positionne à l'interface eau-huile de l'émulsion, le résidu palmitique dans la phase lipophile et le cycle lactone dans la phase aqueuse.

Il est à noter que seul le cycle contenant la double liaison est susceptible d'être oxydé. La concentration initiale en AA-PAL influençait significativement la dégradation du composé, les hautes concentrations réduisant généralement sa dégradation. Enfin, les auteurs mettaient en évidence que l'élimination de l'oxygène dissout de la préparation permettait d'augmenter la conservation de l'AA-PAL (221).



**Figure 33** : Quantification de l'AA-PAL au cours du temps en fonction de sa concentration initiale et du type de véhicule, d'après *Spiclin et al*

#### 2.4.4. Effets synergiques d'une supplémentation vitaminique combinée

##### i. Effet synergique sur l'efficacité

Une étude comparait les effets photoprotecteurs de 15 % d'ALA et d'1 % d' $\alpha$ -tocophérol seuls ou de leur combinaison au sein d'un même véhicule. Elle concluait à un effet photoprotecteur multiplié par 2 dans le cas de la combinaison de ces 2 principes actifs (178).

## ii. Effet synergique sur la stabilité

*Donato et al* rapportaient, dans une étude publiée en 2012 dans le journal *Molecules*, l'**effet synergique** d'une combinaison d'1% de RP, d'1% de TA et d'1% d'ascorbyle tétraisopalmitate **sur la stabilité** de ces principes actifs au sein de formulations cosmétiques. La stabilité des 3 composés associés s'avérait ainsi supérieure pour chacun d'entre eux, en comparaison de leur stabilité propre quand ils étaient incorporés de façon isolée dans le véhicule. Ainsi, à l'abri de la lumière, à 37°C et 75% d'humidité relative, la demi-vie du RP passait de 61 jours à 120 jours, la demi-vie de l'ascorbyl tétraisopalmitate de 173 jours à 318 jours et la demi-vie du TA de 757 jours à 1116 jours dans le cas de leur association.

Le rationnel physico-chimique de l'augmentation de leurs stabilités respectives dans le véhicule, dans le cas de leur incorporation combinée, n'est pas totalement élucidé. Il semble que la présence d'interactions intermoléculaires entre les dérivés vitaminiques diminue la réactivité de l'oxygène moléculaire, augmentant ainsi leurs stabilités respectives (192).

### 2.4.5. Conclusion

Le RP, le TA et l'AA-PAL sont respectivement des dérivés estérifiés des vitamines A, E et C. Ils disposent chacun d'une monographie au sein de la Pharmacopée Européenne. Le RP et le TA sont respectivement métabolisés par la peau en vitamines A et E actives. Concernant l'AA-PAL, bien que la littérature s'avère discordante quant à sa bioconversion cutanée en ALA, des données d'efficacité concernant ses propriétés antioxydantes et pro-cicatrisantes permettent d'incorporer ce dérivé au sein de la préparation en développement.

Le RP et plus particulièrement l'AA-PAL sont des composés fragiles ; toutefois, ils s'avèrent plus stables que les vitamines sous forme native auxquelles ils sont associés. La littérature fournit des données quant aux concentrations retrouvées (i) dans des études cliniques évaluant ces dérivés ou (ii) les vitamines natives qui leur sont associées. Des données quantitatives concernant ces dérivés vitaminiques ont également été obtenues par la recherche de leurs (iii) concentrations au sein de formulations médicamenteuses autorisées ou (iv) de formulations cosmétiques.

## 2.5. Partie expérimentale

Seront présentés, puis mis en perspective dans ce chapitre, les différents travaux expérimentaux qui ont été effectués jusqu'à ce jour dans le but de développer une préparation anti-infectieuse et cicatrisante à 1% de SSD, supplémentée en vitamines A, C et E et destinée à la prévention de l'infection chez le brûlé.

Ces travaux se décomposent en 3 axes :

- La **préparation** selon les BPP des formulations tests *F1*, *F2* et *F3*.
- L'**évaluation de l'efficacité *ex-vivo*** des formulations *F1*, *F2* et *F3* sur des explants de peau humaine brûlés et maintenus en survie en interface air-liquide.
- Le **développement** parallèle selon les recommandations **Q1A(R2)** et **Q2(R1)** de l'ICH) de trois méthodes de dosage indicatrices de stabilité par **chromatographie liquide haute performance** pour permettre l'étude de la stabilité de la préparation finale.

### 2.5.1. Matériel et Méthodes

#### i. Matériel utilisé pour la préparation des formulations

*Spécialités pharmaceutiques déconditionnées* : la Flammazine® a été fournie par le laboratoire Alliance Pharma France (Paris, France). La Vitamine A Nepal® 100 000 UI / 2 mL et la Vitamine E Nepal® 100 mg / 2 mL ont été approvisionnées par le laboratoire Nepal SARL (La Seyne sur Mer, France). La crème Versatile® riche était fournie par Fagron (Rotterdam, Pays-Bas).

*Matières premières vrac* : le TA (pureté : 97,2%) a été obtenue auprès du laboratoire BASF (Ludwigshafen, Allemagne). La SSD, *Sulfadiazinum argenticum micro USP* (pureté : 98,2%), était fournie par Fagron (Rotterdam, Pays-Bas). L'AA-PAL (pureté : 99,4%) a été fournie par Farmalabor (Canosa di Puglia, Italie).

*Solvant* : l'eau P.P.I. a été achetée auprès des laboratoires Lavoisier Chaix et du Marais (Paris, France).

## ii. Matériel pour la réalisation des essais d'efficacité ex-vivo

Une *biopsie de peau humaine* a été obtenue à la suite de la réalisation d'une dermolipéctomie abdominale. Ce résidu chirurgical a été récupéré en accord avec la réglementation, suite au consentement éclairé du patient et à la déclaration de l'utilisation de ce résidu à des fins de recherches auprès du Ministère de la Recherche.

L'alcool stérile à 70 ° a été fourni par la société Sterigene® (Franconville, France) et le chlorure de sodium 0,9 % 12,5 mL par le laboratoire Macopharma (Mouvoux, France). Le *Phosphate Buffered Saline (PBS)*, tampon phosphate salin) était approvisionné par Euromedex (Souffelweyersheim, France). Les antibiotiques pénicilline 200 UI/mL et gentamicine 40 µg/mL ont été fournis par le laboratoire Panpharma (Luitré, France). L'amphotéricine B 2 µg /mL a été achetée auprès de la société Bristol Myers Squibb (New York, États-Unis). Enfin, le *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*, milieu Eagle modifié de Dulbecco) et le sérum de veau fœtal (SVF) étaient procurés par le laboratoire Thermo Fisher Scientific (Dardilly, France).

## iii. Réactifs et solvants pour le développement analytique par chromatographie liquide haute performance

*Principes actifs purs* : le RP (pureté : 98,7 %) et le dl- $\alpha$ -TA (pureté > 96 %) étaient fournis par la société Sigma-Aldrich (Lyon, France). La SSD, *Sulfadiazinum argenticum micro USP* (pureté : 98,2%), était procurée par Fagron (Rotterdam, Pays-Bas).

*Solvants* : le méthanol et l'isopropanol étaient de qualité *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC, chromatographie liquide haute performance), ont été achetés auprès de Fisher Scientific (Illkirch, France). Le chlorure de sodium 0,9 % 250 mL était approvisionné par le laboratoire Macopharma (Mouvoux, France). L'eau P.P.I. a été achetée auprès des laboratoires Lavoisier Chaix et du Marais (Paris, France).

## iv. Formulation des préparations supplémentées en vitamines

Trois gammes de concentration en vitamines A, C et E ont été déterminées sur la base des données d'efficacité de la littérature, comme vu au sous chapitre 2.3.2. supra.

Elles sont reportées dans le **tableau 14**. Les formulations *F1*, *F2* et *F3* comportaient respectivement des concentrations faibles, moyennes et élevées en vitamines A, C et E.

Du point de vue de la fabrication des formulations tests développées, l'utilisation de vitamines sous forme de spécialités pharmaceutiques injectables prêtes à l'emploi a été privilégiée, quand cela était possible, à l'utilisation de matières premières pharmaceutiques vrac, du fait de la présence des PA solubilisés sous forme de solutions micellaires au sein de ces spécialités et du caractère stérile de ces préparations.

**Tableau 14:** Concentrations en principes actifs des formulations F1, F2 et F3 et de la Flammazine®

Principes actifs	Flammazine (% m/m)	F1 (% m/m)	F2 (% m/m)	F3 (% m/m)
Sulfadiazine argentique	1	1	1	1
Palmitate de rétinyle	—	0,02	0,2745	0,55
Acétate de tocophérol	—	0,1	1	10
Palmitate d'ascorbyle	—	3	10	25

### Essais de développement galénique

Des essais de mise en forme galénique initiaux ont été effectués, dans l'objectif de permettre l'inclusion des différentes vitamines aux concentrations souhaitées dans les formulations tests F1, F2 et F3. Leurs compositions sont présentées dans le **tableau 15**.

**Tableau 15:** Composition des formulations F1, F2 et F3

<b>Composants</b>	<b>F1 (% m/m)</b>	<b>F2 (% m/m)</b>	<b>F3 (% m/m)</b>
Flammazine®	74,00	59,54	23,64
Palmitate de rétinyle 100 000 UI/mL*	2,00	10,00	20,00
Acétate de tocophérol 100 mg/2mL**	1,00	20,00	—
Acétate de tocophérol P = 97,2%***	—	—	9,53
Palmitate d'ascorbyle P = 99,4%	3,02	10,06	25,15
Sulfadiazine argentique	0,26	0,40	0,76
Eau	19,72	—	20,92

\* : densité mesurée = 1 g/mL

\*\* : densité mesurée = 1 g/mL

\*\*\* : densité = 0,953 g/mL

Ces essais ont conduit à la **supplémentation** systématique en **SSD matière première vrac** des *formulations tests F1, F2 et F3*, à dose adaptée pour chacune d'elle, du fait de la dilution systématique de l'émulsion commerciale Flammazine® induite par les supplémentations vitaminiques.

Ils ont également conduit à l'utilisation de **vitamine E** sous forme de **matière première vrac** pour la préparation de la **formulation F3**. Du fait de la haute concentration vitaminique souhaitée (TA 10 % m/m), l'utilisation de *vitamine E Nepalm* pour la fabrication de cette formulation s'est avérée impossible. En effet, un volume de 200 mL de la spécialité *Vitamine E Nepalm* contient la quantité de TA souhaitée dans 100 grammes de formulation à 10 % de TA m/m.

Enfin, l'ajout de solvant, à savoir de l'**eau P.P.I.**, au sein des formulations F1 et F3 s'est avéré nécessaire. L'objectif de cet apport était de permettre une **dispersion homogène à minima** d'un point de vue **macroscopique** des **mélanges complexes** que constituent les formulations tests en développement. En effet, la présence souhaitée d'AA-PAL, matière première vrac sous forme de poudre, en concentration importante dans les formulations a nécessité l'ajout de solvant. Dans le cas de la *formulation F2*, l'ajout d'un pourcentage volumique non négligeable de spécialités vitaminiques injectables a permis de passer outre cet apport de solvant supplémentaire, ce qui n'était pas le cas des *formulations F1* et *F3*. Le choix d'utilisation d'eau comme solvant a été justifié du fait d'une part, par le sens de l'émulsion H/E de la Flammazine® et d'autre part, par la volonté de ne pas utiliser un solvant dont les propriétés de biocompatibilité vis-à-vis des tissus brûlés n'avaient pas été étudiées et auraient pu provoquer une intolérance cutanée de la préparation.

Ces essais de mise en forme galénique ont été réalisés **sans garantir la stabilité des dispersions finales**, à raison de première part, de la non connaissance des compositions excipients quantitatives des spécialités utilisées, de seconde part, de l'importance quantitative de la supplémentation vitaminique effectuée fort probablement en mesure de perturber l'équilibre de la dispersion finale et de troisième part, des possibilités d'interactions des différents composants de la préparation entre eux, non évaluables analytiquement à ce stade de développement.

Le développement galénique de la préparation finale serait effectué à la connaissance des données d'efficacité produites par la réalisation des essais *ex-vivo*, ceux-ci permettant la détermination des concentrations vitaminiques souhaitées dans la formulation finale.

En l'absence de données de stabilité établies des *formulations F1, F2* et *F3* et en conformité avec le protocole pansement du CDB-PC qui stipule une réfection quotidienne des pansements à base de Flammazine® sur les brûlures, les formulations ont été fabriquées quotidiennement et extemporanément en Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC) de classe C, au sein de l'unité de production de l'UPCM de la PUI de l'HEH GH-Centre, pendant toute la durée des essais d'efficacité *ex-vivo*.

## Mode opératoire pour la fabrication des formulations F1, F2 et F3

Le RP, le TA, l'AA-PAL, la SSD et l'eau PPI étaient homogénéisés à l'aide d'un disperseur (Ultra-turrax® T25 digital) pendant 3 minutes dans un bêcher de 10 mL. La vitesse de mélange était progressivement augmentée jusqu'à atteindre la capacité maximale de l'appareil, puis le contenu du mélange était recueilli à l'aide d'une seringue Luer-Lock de 3 mL.

Parallèlement, la Flammazine® était prélevée à l'aide d'une seconde seringue Luer-Lock de 3 mL.

Puis un connecteur Luer-Lock était branché entre les deux seringues.

Les contenus de ces dernières étaient alors mélangés puis homogénéisés, pendant une durée de 3 minutes et par aspiration-refoulement en système clos. Ainsi, un jeu de pression manuel alterné consistant à appuyer successivement sur le piston d'une des deux seringues en guidant le mouvement du piston opposé était effectué. Une fois arrivé au maximum de l'avancée du piston de la première seringue, une pression sur le piston opposé était effectuée.

### v. Caractérisation macroscopique et microscopique des formulations

Une évaluation de l'aspect macroscopique ainsi qu'une observation microscopique de la Flammazine®, de la formulation F2 ainsi que des formulations *Fa*, *Fb*, *Fc* et *Fd*, présentées dans le **tableau 16**, ont été effectuées immédiatement après leur préparation ( $t = 0$ ) puis après 72 heures de conservation entre  $+2^{\circ}\text{C}$  et  $+8^{\circ}\text{C}$ , à l'abri de la lumière.

Les observations macroscopiques et microscopiques effectuées avaient pour objectifs respectifs de caractériser l'influence de (i) la dégradation de l'acide ascorbique sur la coloration des préparations et celle de (ii) l'AA-PAL sur la présence de cristaux en présence ou en absence d'argent.

L'analyse microscopique était effectuée suite au dépôt d'une pointe de formulation sur une lame électrostatique, à laquelle était rajoutée une goutte d'eau P.P.I. Une lamelle était alors déposée sur l'ensemble. Des photos numériques ont été capturées à l'aide d'une caméra couplée à un microscope optique. Les photos ont été analysées à l'aide du logiciel de traitement d'image *Motic Plus Image® version 2.0*.

**Tableau 16 : Composition des formulations Fa, Fb, Fc et Fd**

<b>Composants</b>	<b>Fa (% m/m)</b>	<b>Fb (% m/m)</b>	<b>Fc (% m/m)</b>	<b>Fd (% m/m)</b>
Flammazine®	90	80	-	-
Versatile® non riche	-	-	90	80
Acide L ascorbique 1 g / 5 mL	10	-	10	-
Palmitate d'ascorbyle P = 99,4%	-	20	-	20

Versatile® non riche : base crème de type H/E

Pour rappel, les compositions de la Flammazine® et de la formulation F2 sont détaillées supra, respectivement aux chapitres 2.3.1. et 2.5.1.

#### **vi. Etude d'efficacité *ex-vivo* des formulations supplémentées en vitamines versus Flammazine® sur la cicatrisation d'explants**

La **biopsie de peau humaine** a été délipidée dans un bain d'alcool stérile à 70 °C, puis rincée avec du PBS. Elle a été ensuite placée pendant 12 heures à 4°C dans un bain d'antibiotiques (pénicilline 200 UI/mL, gentamicine 40 µg/mL, amphotéricine B 2 µg/mL, diluées dans du DMEM). A partir de cette biopsie, 6 **explants** ont été prélevés.

Un **modèle de brûlure** sur explants, préalablement développé par *Olivia Gross et al*, *BTC/HCL* (résultats non publiés), a été appliqué à cet essai. Chacun des 6 explants a subi 5 brûlures circulaires du second degré d'un centimètre de diamètre.

Les explants ont été **maintenus en survie en interface Air/Liquide (A/L)**. Cette méthode de conservation consiste à déposer la peau sur une grille de support dans un milieu de culture, face épidermique vers le haut.

Cette technique permet de se rapprocher des conditions physiologiques en maintenant l'épiderme au contact avec l'air, favorisant d'une part la différenciation des kératinocytes et apportant d'autre part les nutriments nécessaires à la survie de l'explant, par absorption au niveau du derme (222).

Le milieu de culture utilisé était un milieu basique composé de 10 % de DMEM, de 10% de SVF et d'antibiotiques (pénicilline 100 UI/mL, gentamicine 20 µg/mL, amphotéricine B 1 µg/mL). Les explants ont été placés à l'étuve (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) et les milieux renouvelés tous les 3 jours sous hotte à flux laminaire type de II B localisée dans une ZAC de classe C.

Le **protocole** d'étude d'efficacité *ex-vivo* sur la cicatrisation cutanée des *formulations F1, F2 et F3* versus Flammazine® est présenté dans le **tableau 17**.

L'**application des formulations testées** sur les explants brûlés a été effectuée comme suit : pour obtenir une répétabilité des mesures intra-série, à savoir, sur une même biopsie de peau humaine, chacune des brûlures de l'ensemble des explants s'est vu affiliée à un groupe de traitement identique durant toute la durée de l'expérimentation. Ainsi, une brûlure par explant était traitée par la *formulation F1*, une par la *formulation F2*, une par la *formulation F3* ; une brûlure était traitée par Flammazine® et constituait le contrôle Flammazine® ; enfin la dernière brûlure constituait le contrôle de cicatrisation spontanée, aucune formulation n'était appliquée à sa surface.

Conformément au protocole pansement du CDB-PC disponible **en annexe 1**, la réfection du pansement de chaque brûlure était effectuée toutes les 24 heures.

Les brûlures traitées par préparations topiques se voyaient appliquer à leur surface et au niveau de leur bordure environ 0,3 g de formulation, préparée extemporanément dans le cas des groupes de traitement *F1, F2 et F3*. Les *formulations F1, F2 et F3* étaient appliquées, à la suite de leur re-homogénéisation pendant 1 minute, par démontage du système connecteur-seringues Luer Lock, puis par pression sur le piston d'une des deux seringues les contenant. La Flammazine® était prélevée et appliquée à l'aide d'une pipette stérile. Les formulations ont été appliquées sous hotte à flux laminaire type IIB en ZAC de classe C à l'aide des gants stériles.

Les résidus des formulations déposées la veille étaient éliminés quotidiennement de la surface des explants à l'aide de cotons tiges stériles et de compresses stériles imbibées de sérum physiologique.

**Tableau 17:** Protocole expérimental d'évaluation d'efficacité ex-vivo des formulations F1, F2 et F3 versus Flammazine®

N° de l'explant	Groupe de traitement	Condition de culture			Prélèvement	Coloration histologique
		Interface A/L milieu basique				
		Temps de culture avant prélèvement				
		5 jours	11 jours	15 jours		
1	Contrôle de cicatrisation spontanée				<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 explants prélevés à J5, à J11 et à J15.</li> <li>• Séparations des brûlures de chaque explant</li> <li>• Inclusion en paraffine de chaque brûlure</li> <li>• Hématoxyline éosine safran</li> </ul>	
	F1					
	F2					
	F3					
	Contrôle Flammazine®					
2	Contrôle de cicatrisation spontanée					
	F1					
	F2					
	F3					
	Contrôle Flammazine®					
3	Contrôle de cicatrisation spontanée					
	F1					
	F2					
	F3					
	Contrôle Flammazine®					
4	Contrôle de cicatrisation spontanée					
	F1					
	F2					
	F3					
	Contrôle Flammazine®					
5	Contrôle de cicatrisation spontanée					
	F1					
	F2					
	F3					
	Contrôle Flammazine®					
6	Contrôle de cicatrisation spontanée					
	F1					
	F2					
	F3					
	Contrôle Flammazine®					

Le **prélèvement** de 2 explants a été réalisé successivement aux cinquième, onzième et quinzième jours de l'expérience, correspondant au terme de l'expérimentation.

A chaque temps de prélèvement, les brûlures des explants prélevés ont été isolées et fixées au formol à 4% pendant 12 heures. Les étapes de déshydratation et de substitution ont été réalisées au sein de l'Unité d'Anatomopathologie de l'HEH GH-Centre.

Les échantillons ont par la suite été **inclus en paraffine**, puis coupés en lamelles de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (Microtom HM340E). Les coupes obtenues ont été déposées sur des lames électrostatiques, puis déparaffinés, réhydratés et **colorés** par **Hématoxyline Phloxine Safran** (HPS). La coloration HPS permet l'analyse des structures épithéliales en colorant les cytoplasmes en rose, les noyaux en bleu, le collagène en jaune et les muscles en rose-orange (223).

Les **hauteurs des épithéliums cicatriciels** cutanés ont été quantifiées à partir de photos numériques capturées à l'aide d'une caméra couplée à un microscope optique utilisé au grossissement x 20. Les photos ont été analysées à l'aide du logiciel de traitement d'image ImageJ®.

Les hauteurs épidermiques ont été mesurées selon deux modalités : (i) *stratum corneum* exclu et (ii) *stratum corneum* et épiderme ne présentant ni coloration éosinophile, ni coloration basophile exclus. Enfin, les hauteurs épidermiques par section histologique et pour chaque modalité, ont été évaluées par la réalisation de 5 mesures aléatoires, représentant un total de 10 mesures pour chaque groupe de traitement par temps d'analyse. Le *stratum corneum* a été exclu car il ne s'agit pas d'une couche cutanée composée de kératinocytes viables. Le rationnel d'exclusion selon la seconde modalité de mesure des strates kératinocytaires aux cytoplasmes non pigmentés par HPS est que les cytoplasmes kératinocytaires sur peau saine présentent une coloration violet clair.

Les **tests statistiques** ont été effectués en utilisant le logiciel XLSTAT® avec un risque de première espèce  $\alpha$  de 5%. Les tests utilisés étaient de type non paramétriques du fait de l'hétéroscédasticité des variances des échantillons analysés, préalablement mise en évidence par l'utilisation du test de Shapiro-Wilk. Ainsi, des tests de Friedman appariés suivi de tests de comparaisons multiples par paires de Nemeny ont été effectués en tant qu'alternative à l'ANOVA à un facteur. Le niveau de significativité statistique fixé était de 5%.

## vii. Développement analytique par chromatographie liquide

Comme vu au chapitre 2.2.3. supra, la réalisation d'une préparation pharmaceutique en vue de sa délivrance à un patient inclut l'évaluation de sa stabilité. C'est pourquoi, pour permettre l'étude de la stabilité (i) des principes actifs au sein des formulations lors du développement de la préparation cicatrisante et (ii) de la préparation pharmaceutique finale, un travail de développement analytique a été initié. Il devra à terme conduire à l'existence d'autant de méthodes de dosage indicatrices de stabilité que de principes actifs présents au sein de la préparation.

Une méthode de dosage **indicatrice de stabilité** doit permettre (i) de **séparer** le principe actif d'intérêt de la matrice des éventuels produits de dégradation et (ii) de **déterminer la teneur** en PA d'intérêt au sein de la préparation pharmaceutique à laquelle elle est associée.

La **chromatographie liquide à haute performance**, HPLC, est une technique analytique couramment utilisée qui permet la réalisation de telles études. L'HPLC est une technique analytique **quantitative, qualitative** et **séparative**. Ce type de chromatographie repose sur la séparation de composés envoyés par un injecteur à travers une aiguille dans un liquide (phase mobile) au sein duquel, sous l'action d'une pompe, à travers un solide divisé (phase stationnaire) disposé dans une colonne, les composés présenteront des interactions variables en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Ce système séparatif est suivi d'un système de détection; enfin, l'ensemble est piloté par un ordinateur permettant la commande du système chromatographique, ainsi que l'acquisition et le traitement des données.

Aujourd'hui, la majeure partie des **méthodes indicatrices de stabilité** s'effectue en chromatographie liquide en phase inverse, du fait d'une part, que la plupart des composés à analyser présente un caractère hydrophobe et d'autre part que le mode inverse nécessite l'utilisation de solvants hydrophiles (par exemple, l'eau dont l'utilisation présente le grand avantage d'être non toxique (108)).

On rappelle que les propriétés physico-chimiques du TA, du RP et de la SSD ont été présentées au chapitre 2.3. supra.

Les **longueurs d'ondes de travail**, ou longueurs d'onde d'absorbance maximale, ont été déterminées par analyse des spectres d'absorption de chaque molécule. Les spectres ont été obtenus par analyse de gammes de solutions diluées des différents PA, TA, RP et SSD, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, modèle 2401 de la marque Shimadzu®.

Concernant le TA, l'échantillon analysé était composé de TA pur, dilué dans un mélange de méthanol/isopropanol, 50 : 50, de façon à obtenir une concentration de TA de 50 µg/mL. Le spectre obtenu est disponible en **annexe 3**.

Concernant le palmitate de rétinyle (RP), l'échantillon analysé était composé de RP pur dilué dans un mélange de méthanol/isopropanol, 50 : 50, de façon à obtenir une concentration de RP de 20 µg/mL. Le spectre obtenu est disponible en **annexe 4**.

Concernant la sulfadiazine argentine (SSD), l'échantillon analysé était composé de SSD pure diluée dans du chlorure de sodium 0,9 %, de façon à obtenir une concentration de SSD de 20 µg/mL. Le spectre obtenu est disponible en **annexe 5**.

Le **système d'analyse** utilisé était un système HPLC doté d'une pompe quaternaire, modèle 1260 Infinity, couplée à un détecteur à barrettes de diode, commercialisé par la société Agilent Technologies (Santa Clara, États-Unis).

La **colonne** utilisée permettait la réalisation d'analyse chromatographique en phase inverse. Elle était de modèle Kinetex®, référence 00F-4262-E0, commercialisée par la société Phenomenex® (Torrance, Californie, États-Unis). Elle était composée de particules de 2,6 µm de diamètre. Leur chimie consistait en la présence de chaînes carbonées à 18 atomes de carbone, greffés sur silice rattachée à un support interne. Le diamètre des pores était de 100 Å. La géométrie de la colonne était de 150 x 4,6 mm.

Les résultats ont été collectés à l'aide des logiciels OpenLab UHPLC (*on line*) : contrôle des méthodes et des exécutions et OpenLab UHPLC (*off line*) : analyse des données. Ces logiciels ont été développés par la société Agilent Technologies (Santa Clara, États-Unis).

La **lampe à UV** utilisée pour les essais de photodégradations était de modèle UVA 365 nm VL-206.BL et a été fournie par la société Vilbert Loubet (Collégien, France).

## Conditions chromatographiques pour les dosages simultanés de l'acétate de tocophérol et du palmitate de rétinyle

Une fois la colonne sélectionnée, les solvants constituant la phase mobile du système HPLC ont dû être déterminés. La phase mobile devait être relativement polaire pour permettre la réalisation d'une détection chromatographique en phase inverse, tout en assurant la solubilisation des vitamines liposolubles que sont le TA et le RP.

Les **séparations chromatographiques** du TA et du RP ont toutes deux été effectuées en **régime isocratique** (composition de la phase mobile non modifiée au cours du temps) dans une **phase mobile** composée d'un mélange d'eau (voie A), de méthanol (voie B) et d'isopropanol (voie C). L'élution a été réalisée en utilisant les proportions de solvant suivantes : **eau/isopropanol/méthanol** 2 : 9,8 : 88,2, v/v/v. Le **débit** de la pompe était de 0,8 mL/min. A la suite de chaque injection, **l'aiguille** de l'injecteur était rincée pour éliminer les résidus d'analytes potentiellement présents sur l'aiguille avant l'injection suivante. Le liquide de rinçage de l'aiguille utilisé était un mélange isopropanol/méthanol 50 : 50 v/v. Le **volume d'injection** de l'échantillon était de 20 µL et la température de la colonne était fixée à 25 °C. La **détection UV** a été effectuée à l'aide du détecteur à barrettes de diodes aux longueurs d'onde de 280 nm (correspondant à l'absorbance maximale du TA) et de 325 nm (correspondant à la longueur d'onde d'absorbance maximale du RP).

L'ensemble des injections était précédé par une étape de **filtration** des solutions à travers des filtres en PolyTétraFluoroEthylène (PTFE) régénéré (Millex®, 0,22 µm, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne).

Les **temps de rétention** du TA et du RP étaient respectivement de 6,98 min ± 5% et 16,3 min ± 5%.

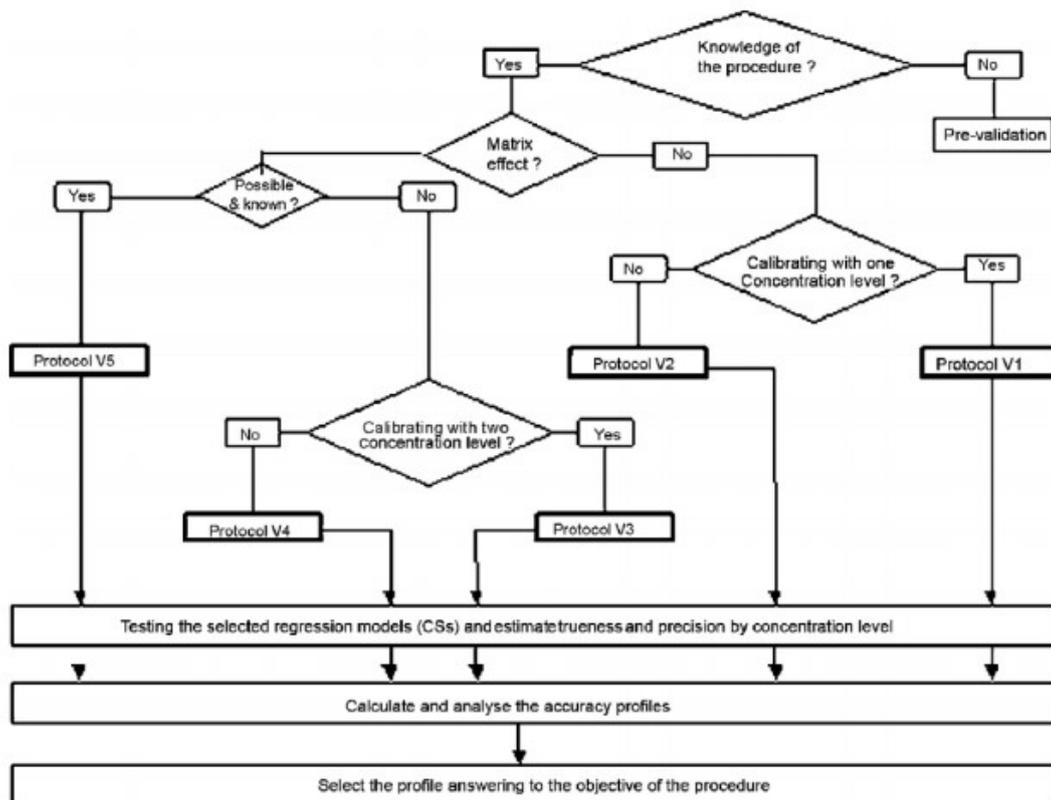
## Validation de la méthode de dosage du topheryl acetate

Les recommandations de la *Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques* (SFSTP) stipulent qu'un **éventuel effet matrice** doit être recherché et évalué avant toute validation de méthode afin de **cibler le meilleur protocole de validation** à appliquer (224).

La recherche et l'évaluation d'un **effet matrice** ont consisté à vérifier si le signal obtenu avec une solution standard pure de TA était comparable au signal obtenu avec un blanc matrice auquel était ajouté le TA à la même concentration. En effet, en l'absence d'effet matrice, les signaux doivent être comparables.

La **figure 34** présente l'algorithme décisionnel pour la sélection du protocole de validation après **recherche et évaluation d'un effet matrice** selon la SFSTP (224).

Le **tableau 18** présente les protocoles de validation proposés par la SFSTP, en fonction de cet éventuel effet (225).



**Figure 34** : Algorithme de sélection d'un protocole de validation selon Hubert et al

**Tableau 18 : Design des protocoles de validation V1 à V5 selon Hubert et al**

Standards	Concentration levels	Protocol				
		V1	V2	V3	V4	V5
CSs without matrix	Low		2		2	
	Mid	2	(2) <sup>a</sup>	2	(2) <sup>a</sup>	
	High	(2) <sup>b</sup>	2	(2) <sup>b</sup>	2	
CSs within matrix	Low				2	2
	Mid			2	(2) <sup>a</sup>	(2) <sup>a</sup>
	High			(2) <sup>b</sup>	2	2
	Additional					(2) <sup>c</sup>
VSs within matrix	Low	3	3	3	3	3
	Mid	3	3	3	3	3
	High	3	3	3	3	3
Minimum number of series		3	3	3	3	3
Total number of experiments (minimum)		33	45	39	63	45

Du fait de l'absence d'effet matrice, la validation analytique du dosage du TA a été effectuée selon le **protocole V2**, présenté supra.

La **validation analytique** a été réalisée (i) en accord avec les lignes directrices tant de l'**ICH Q2(R1)** consacrées aux méthodologies de validation des procédures analytiques, (ii) que de l'**ICH Q1A(R2)** consacrées aux essais de stabilité de nouveaux produits et substances médicamenteux et (iii) par construction du **profil d'exactitude** selon les recommandations de la **SFSTP**.

Les critères de validation définis par l'**ICH Q2(R1)** incluent l'évaluation de la spécificité, de la linéarité, de la précision (répétabilité, précision intermédiaire), des limites de détection et de quantification (226).

Les recommandations émises par l'**ICH Q1A(R2)** stipulent l'intérêt de la réalisation d'essais de **dégradation sous contrainte** incluant la photodégradation, l'oxydation, l'hydrolyse en condition acide et basique. Ces essais ont pour but (i) d'évaluer la stabilité intrinsèque de la molécule, (ii) de prédire les produits de dégradation probables de la molécule dans la forme pharmaceutique finale, (iii) d'assister à l'établissement des voies de dégradation du PA pour la réalisation d'une étude de stabilité et (iii) de valider la capacité de la méthode d'analyse comme à être indicatrice de stabilité (227).

La **spécificité** consiste à vérifier que le signal obtenu est caractéristique de la substance à analyser. Dans le cadre de la validation de la méthode de dosage du TA, la spécificité a été évaluée en injectant un échantillon de TA pur, un blanc pur et une solution issue de la filtration d'une suspension de formulation F2 dispersée dans un mélange de solvants de la phase mobile, une fois par jour pendant 3 jours afin de s'assurer de l'absence d'interférence au temps de rétention du TA. De plus, lors des essais de dégradation forcée, aucun produit de dégradation ne devait apparaître au temps de rétention du TA.

La **linéarité** d'une méthode est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en substance dosée. Elle a été vérifiée par la réalisation de 2 gammes de 3 niveaux par jour pendant 3 jours, selon les dilutions des **standards de calibration** (*Calibration Standards, CS*). Les calibrations sont réalisées sans matrice.

La **précision** exprime l'étroitesse d'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon. L'**exactitude** définit l'étroitesse d'accord entre la moyenne des résultats d'un essai et la valeur théorique attendue. Précision et exactitude ont été évaluées en passant trois échantillons de trois niveaux de concentration pendant trois jours, en présence de matrice. Les échantillons sont fabriqués selon les dilutions des **standards de validation** (*Validation Standards, VS*). L'**imprécision** a été évaluée par analyse de variance (ANOVA) et ne devait pas dépasser  $\pm 15 \%$ . Les taux de recouvrement devaient être inclus entre 85 % et 115 %.

La **répétabilité** a été évaluée en passant 3 niveaux de standards de validation, 3 fois par jour ( $n = 9$ ). Les coefficients de variation pour chaque niveau de concentration ont été calculés par ANOVA. Ceux-ci devaient être inférieurs à  $\pm 10\%$ .

La **reproductibilité** a été évaluée en passant 3 niveaux de standards de validation, 3 fois, sur 3 jours ( $n = 27$ ). Les coefficients de variation pour chaque niveau de concentration ont été calculés par analyse de variance (ANOVA). Ceux-ci devaient être inférieurs à  $\pm 10 \%$ .

La **limite de quantification** permet de déterminer la plus faible quantité détectable et quantifiable avec précision. Celle-ci était donnée par le profil d'exactitude. La limite de quantification pouvait également être calculée selon la formule :

$$LQ=10\sigma/P$$

$\sigma$  : Écart-type de l'ordonnée à l'origine des gammes d'étalonnage.

P : moyenne des pentes des gammes d'étalonnage.

La **limite de détection** permet de déterminer la valeur la plus faible détectable mais non quantifiable. Elle était calculée selon la formule :

$$LD=3,3 \sigma/P$$

Des **standards de calibration** de TA ont été préparés par dissolution de **TA pur** dans un mélange de solvants de type méthanol/isopropanol 50 : 50, v/v.

Des **standards de validation** de TA ont été préparés par dispersion de **formulation F2** dans un mélange de solvants de type méthanol/isopropanol 50 : 50, v/v.

**Tableau 19** : Concentrations des standards utilisés pour la validation de la méthode de dosage de l'acétate de tocophérol

<b>Solution</b>	<b>Acétate de tocophérol (µg/mL)</b>
Standards de calibration	<i>Par dilution de TA pur</i>
Bas	25
Moyen	70
Haut	125
Standards de validation	<i>Par dispersion de la formulation F2</i>
Bas	45
Moyen	75
Haut	100

Enfin, des solutions standard de TA et des suspensions filtrées de formulation F2 (TA 1%) ont été soumises à des essais de **dégradation forcée** :

- par augmentation de la température de l'échantillon à 60°C pendant 30 minutes,
- en condition acide, en ajoutant une solution de HCl 0,05 M à 25 °C pendant 1 minute,
- en condition basique, en ajoutant une solution de NaOH 0,05 M à 25 °C pendant 1 minute,
- en condition oxydante, en ajoutant une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3% à 25 °C pendant 10 minutes,
- en condition photodégradante, par exposition aux rayonnements UVA ( $\lambda = 365$  nm) pendant 2 heures.

### **Développement de la méthode de dosage du palmitate de rétinyle**

Des **solutions standards** de RP ont été préparées par dissolution de RP pur dans un mélange de solvants de type méthanol/isopropanol 50 : 50, v/v.

Des **suspensions de formulation F2** ont été préparées par dispersion de **formulation F2** (RP 0,2745 %) dans un mélange de solvants de type méthanol/isopropanol 50 : 50, v/v.

La spécificité du système et l'influence de la matrice sur la détection du RP ont toutes deux été déterminées à partir d'injections répétées de (i) solutions standards de RP et de (ii) suspensions filtrées de formulation F2, afin de quantifier un éventuel effet matrice et de s'assurer de l'absence d'interférence au temps de rétention du RP.

Des solutions standards de RP et des suspensions de formulation F2 (RP 0,2745 %) ont été soumises à des essais de **dégradation forcée** :

- par augmentation de la température de l'échantillon à 60°C pendant 30 minutes,
- en condition acide, en ajoutant une solution de HCl 0,05 M à 25 °C pendant 1 minute,
- en condition basique, en ajoutant une solution de NaOH 0,05 M à 25 °C pendant 1 minute,
- en condition oxydante, en ajoutant une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3% à 25 °C pendant 10 minutes,
- en condition photodégradante, par émission de rayonnement UVA ( $\lambda = 365$  nm) pendant 50 minutes.

## Conditions chromatographiques pour le dosage de la sulfadiazine argentique

La **séparation chromatographique** de la SSD a été effectuée en **régime isocratique** dans une **phase mobile** composée d'un mélange d'eau (voie A), de méthanol (voie B) et d'isopropanol (voie C). L'élution a été effectuée en utilisant les proportions de solvant suivantes : **eau/isopropanol/méthanol** 50 : 5 : 45, v/v/v. Le **débit** de la pompe était de 0,8 mL/min. Un **rinçage de l'aiguille** de l'injecteur était effectué à la suite de chaque injection dans le but d'éliminer les résidus d'analytes potentiellement présents sur l'aiguille avant l'injection suivante. Le liquide de rinçage de l'aiguille utilisé était un mélange isopropanol/méthanol 50 : 50 v/v. Le **volume d'injection** de l'échantillon était de 20 µL et la température de la colonne était fixée à 25 °C. La **détection UV** a été effectuée à l'aide du détecteur à barrettes de diodes à la longueur d'onde de 254 nm (correspondant à l'absorbance maximale de la SSD).

L'ensemble des injections était précédé par une étape de **filtration** des solutions à travers des filtres en **cellulose régénérée** (Millex®, 0,22 µm, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne).

Le **temps de rétention** de la SSD était de 1,84 min ± 5%.

## Développement de la méthode de dosage de la sulfadiazine argentique

Des **solutions standards** de SSD ont été préparées par dissolution de SSD pure dans du sérum physiologique.

Des **suspensions de Flammazine®** ont été préparées par dispersion de **Flammazine®** (SSD 1%) dans du chlorure de sodium 0,9 %.

La spécificité du système et l'influence de la matrice sur la détection de la SSD ont toutes deux été déterminées à partir d'injections répétées de (i) solutions standards de SSD et de (ii) suspensions filtrées de Flammazine®, afin de quantifier un éventuel effet matrice et de s'assurer de l'absence d'interférence au temps de rétention de la SSD.

Des solutions standards de SSD et des suspensions de **Flammazine®** ont été soumises des essais de **dégradation forcée** :

- par augmentation de la température de l'échantillon à 60°C pendant 30 minutes,

- en condition acide, en ajoutant une solution de HCl 1 M à 60 ° C pendant 30 minutes,
- en condition basique, en ajoutant une solution de NaOH 1 M à 60 ° C pendant 30 minutes,
- en condition oxydante, en ajoutant une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3% à 25 °C pendant 100 minutes,
- en condition photodégradante, par émission de rayonnement UVA ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) pendant 810 minutes.

### **Analyses statistiques effectuées dans le cadre de la validation analytique**

Tous les tests statistiques ont été réalisés au moyen du logiciel Excel® (Microsoft Office, USA, 2016) avec un risque  $\alpha$  de 5%.

### **2.5.2. Résultats**

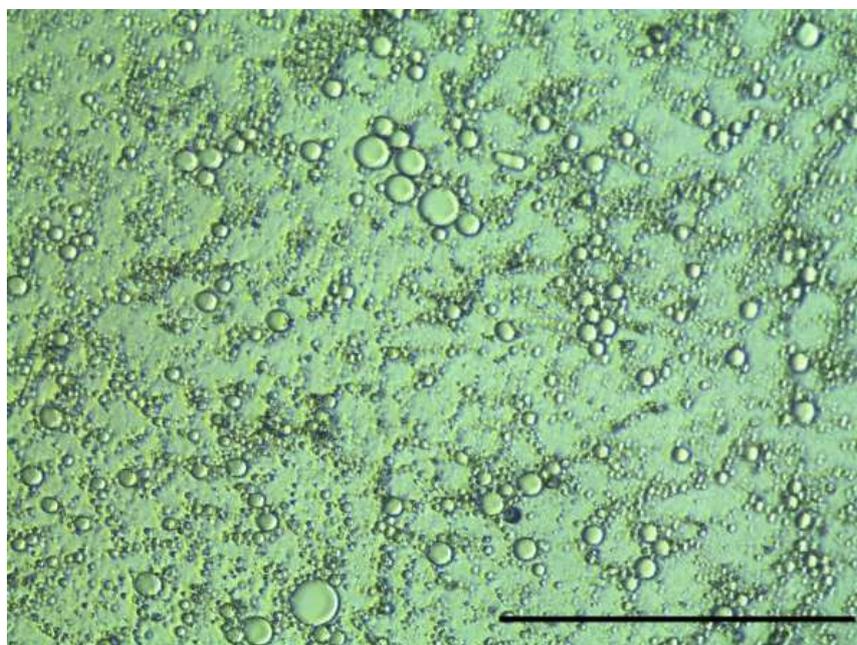
La supplémentation en vitamines A, C et E (sous forme respectivement de RP, AA-PAL et TA) de préparations topiques à 1 % de SSD inhibe le retard de réépithélialisation induit par la SSD, au quinzième jour d'expérimentation sur des brûlures d'explants de peau humaine brûlés et maintenus en survie ( $p < 0,05$ ). Néanmoins, les épithéliums cicatriciels des brûlures traitées par supplémentation vitaminique présentaient des kératinocytes d'aspect atypique par défaut de coloration cytoplasmique sur coupes histologiques colorées par Hématoxyline Phloxine Safran.

### i. Caractérisation macroscopique et microscopique des formulations

La caractérisation macroscopique ainsi que l'évaluation microscopique de la présence de cristaux dans les formulations aux temps  $t = 0$  et après 72 heures de conservation entre  $+2^{\circ}\text{C}$  et  $+8^{\circ}\text{C}$ , à l'abri de la lumière sont présentées dans le **tableau 20**.

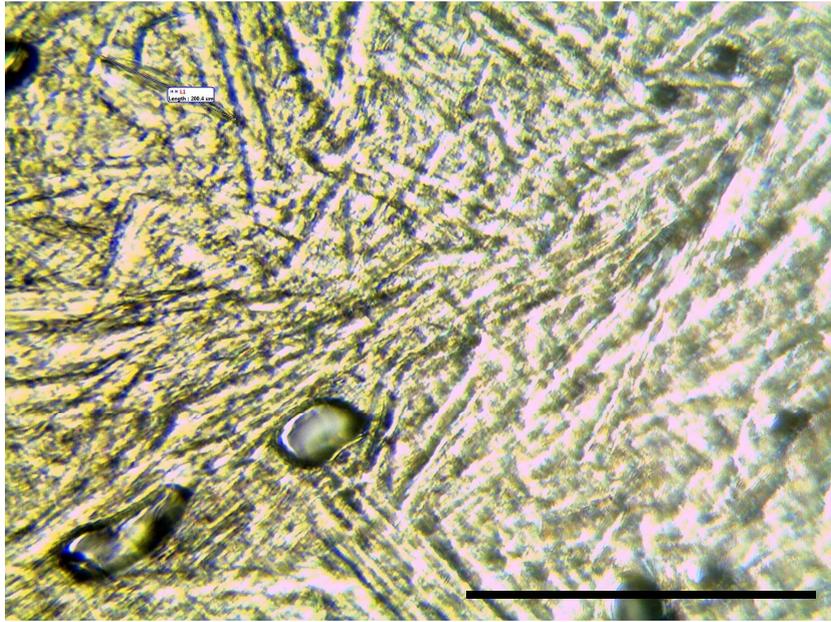
Ces essais ont permis d'affirmer que (i) lorsqu'ils étaient présents, les cristaux observés présentaient un **aspect similaire**, (ii) ces cristaux étaient en réalité des **agrégats d'AA-PAL non dissouts** : en effet, ils étaient visibles dès le temps  $t = 0$  au sein de la formulation Fd (mélange Versatile® non riche + AA-PAL), (iii) la modification de la coloration des formulations était causée à minima par l'oxydation de la vitamine C, qu'elle soit sous forme d'ALA ou d'AA-PAL.

Les cristaux observés dans les formulations contenant de l'AA-PAL étaient de grande taille ( $\sim 100\ \mu\text{m}$ , cf **figures 37 et 38**). Ils ne correspondaient donc pas à des particules de SSD non dissoutes, dont la Pharmacopée Américaine exige un diamètre inférieur à  $10\ \mu\text{m}$  dans le cas de la MPUP vrac (112).



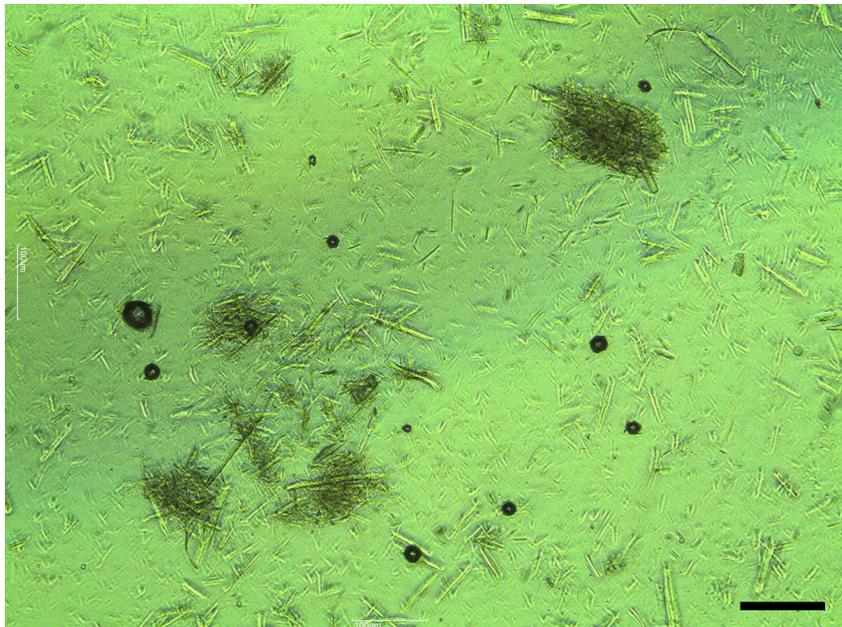
**Figure 35** : Observation au microscope de la Flammazine® à  $t = 0$

Barre d'échelle :  $50\ \mu\text{m}$



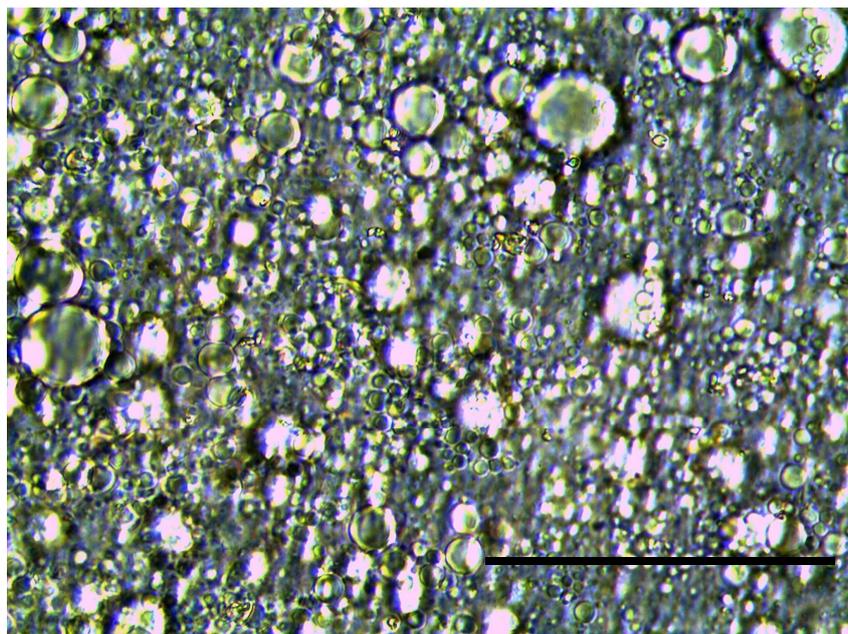
**Figure 36** : Présence de cristaux au sein de la formulation Fd

Barre d'échelle : 100  $\mu$ m



**Figure 37** : Présence de cristaux au sein de la formulation F2 à t = 72 heures

Barre d'échelle : 100  $\mu$ m



**Figure 38** : Absence de cristaux au sein de la formulation Fc à t = + 72 heures

Barre d'échelle : 50  $\mu$ m

**Tableau 20** : Evaluation macroscopique et microscopique des formulations

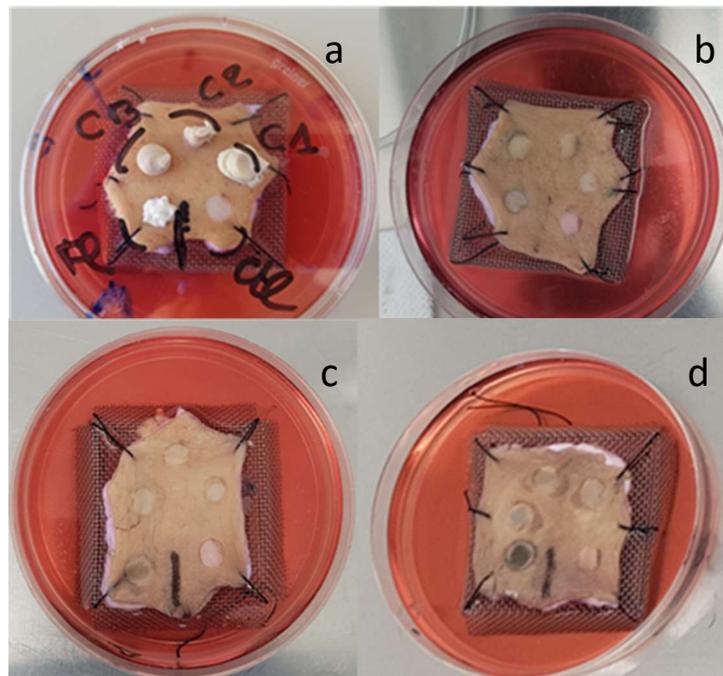
	Couleur de la préparation		Présence de cristaux au microscope	
	t =0	t = 72 heures	t =0	t = 72 heures
<b>Formulation F1</b>	Blanc jaune	Gris beige	+	+
<b>Formulation F2</b>	Blanc jaune	Gris beige	+	+
<b>Formulation F3</b>	Blanc jaune	Gris beige	+	+
<b>Flammazine</b>	Blanc jaune	Gris beige	-	-
<b>Formulation Fa</b>	Blanc jaune	Gris beige	-	-
<b>Formulation Fc</b>	Blanc jaune	Gris beige	-	-
<b>Formulation Fd</b>	Blanc jaune	Gris beige	+	+

## ii. Etude d'efficacité ex-vivo des formulations supplémentées en vitamines versus Flammazine® sur la cicatrisation d'explants

### Aspect macroscopique

Un changement de coloration des *formulations F1, F2 et F3*, initialement de couleur crème, a été observé. Ce dernier était caractérisé par un **brunissement** global des préparations et associé à un noircissement de la préparation au niveau de la zone en contact de la plaie. Ces phénomènes se produisaient pendant l'intervalle de temps compris entre l'application des préparations au jour n et la réfection de l'application au jour n+1.

Au cours de l'expérimentation, des modifications de l'aspect macroscopique des explants ont été mises en évidence. Elles étaient caractérisées par (i) un affaissement du derme contre la grille de support, (ii) une coloration grisâtre de l'épiderme de surface non brûlé, (iii) au niveau des brûlures traitées par les *formulations F1, F2 et F3* et du contrôle de cicatrisation spontanée, l'apparition d'un aspect de surface initialement brillant puis opaque et enfin, (iii) concernant les brûlures traitées par Flammazine®, un noircissement.



**Figure 39** : aspect macroscopique d'explants de peau humaine brûlés et maintenus en survie en interface air/liquide (a) aux premiers, (b) cinquième, (c) onzième et (d) quinzième jours de l'expérimentation

## Analyses histologiques

Des analyses histologiques ont été menées afin d'observer l'architecture globale des explants et de quantifier la réépithélialisation des zones brûlées au cours de l'expérimentation. Les photographies des coupes histologiques de brûlures d'explants de peau humaine colorées par HPS, grossissement x 20, sont présentées dans le **tableau 21**.

**Au cinquième jour de l'expérimentation**, les brûlures du groupe *contrôle cicatrisation spontanée* montrent un épiderme fin, peu différencié (violet foncé), d'épaisseur régulière et ne présentant pas de couche cornée en desquamation. Cette structure témoigne d'un état d'épidermisation rapide d'une brûlure du second degré. Le derme est coloré en jaune-orangé par la présence de collagène. Il contient de nombreux noyaux cellulaires (violet foncé) et est richement vascularisé.

Les brûlures des groupes *formulation F1, F2, F3* et *contrôle Flammazine®* sont exemptes d'épiderme. Cette structure est le témoin de brûlures de second degré détergées. Le derme présente une structure similaire au groupe contrôle cicatrisation spontanée.

**Au onzième jour de l'expérimentation**, les brûlures du groupe *contrôle cicatrisation spontanée* présentent l'architecture attendue d'une peau saine, à l'exception d'une jonction dermo-épidermique faisant voir peu de crêtes, témoin d'une peau récemment cicatrisée. L'épiderme est différencié, on observe bien une couche basale, une couche spinieuse encore paucicellulaire, une couche granuleuse et une couche cornée desquamante (en violet clair). Une augmentation du nombre d'assises cellulaires en comparaison du cinquième jour de l'expérience est visible. On note toutefois un léger défaut de coloration du cytoplasme des kératinocytes basaux et supra basaux.

Les deux brûlures du groupe *F1* présentent un aspect hétérogène. En effet, l'une d'elles montre un épiderme fin, peu différencié et sans *stratum corneum*, tandis que l'autre apparaît largement différenciée. Il est à noter dans cette dernière que, bien que des noyaux cellulaires soient présents dans les kératinocytes des couches épidermiques intermédiaires, de nombreuses cellules au sein de ces couches comportent une caractéristique non attendue : leur cytoplasme n'est pas coloré en violet clair, tel que prévisible lors de l'utilisation d'une coloration HPS sur épiderme sain (cf **figure 40**). Par ailleurs, on note la présence de pigments bruns au niveau de la couche basale et de sa couche proximale.

La caractérisation des brûlures du groupe *F2* est identique à celle du groupe *F1*.

Le groupe *F3* est composé de 2 brûlures disposant d'épidermes différenciés incluant pour chacun une couche desquamante. Quelques cellules présentent, tel que décrit pour les groupes *F1* et *F2*, un défaut de coloration. On note également la présence de pigments bruns.

Les deux brûlures du groupe Flammazine® présentent également un stade de cicatrisation distinct. La première dispose d'un épiderme fin mais différencié incluant un *stratum corneum* et la présence de pigments bruns aux niveaux de la couche basale et de la couche épineuse. La seconde brûlure montre seulement quelques rares assises cellulaires d'aspect non distinguable.

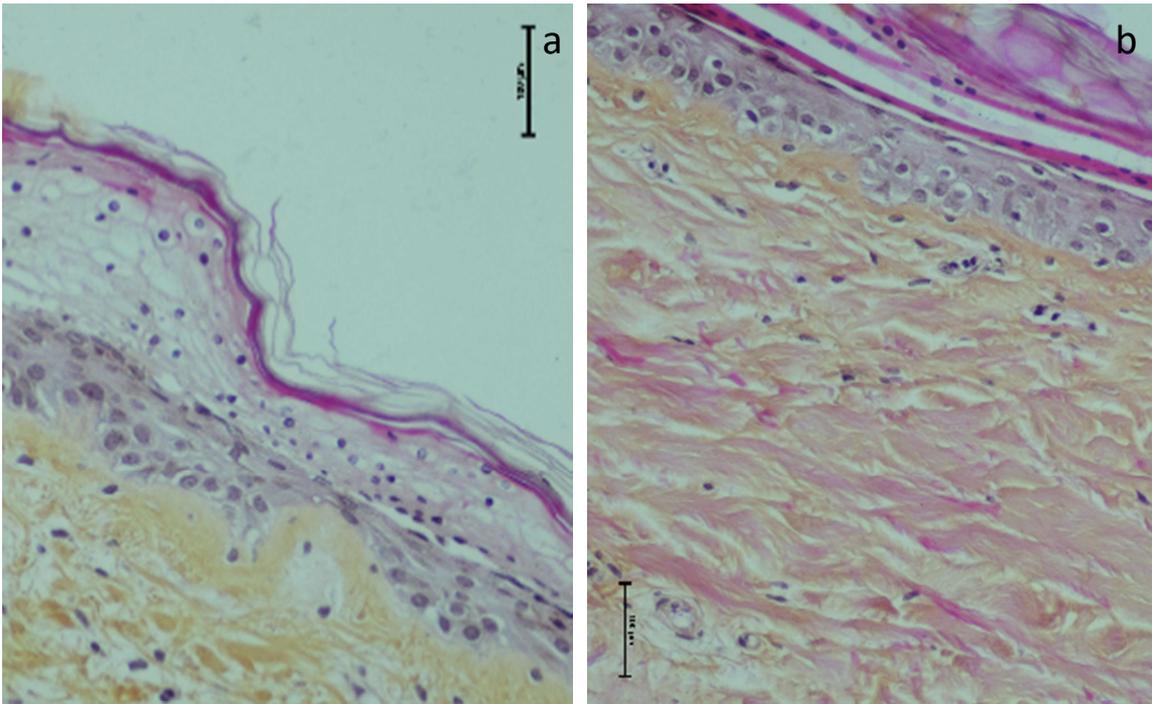
**Au quinzième jour de l'expérimentation**, les brûlures des groupes *contrôle cicatrisation spontanée*, *F1*, *F2*, *F3* présentent des épidermes fins et différenciés. L'existence de défaut de coloration est moins perceptible qu'au onzième jour à l'exception d'une des brûlures du groupe *F2*.

Les coupes histologiques d'une des brûlures du groupe *contrôle cicatrisation spontanée* ainsi que les deux brûlures du groupe *F1* présentent des épidermes qui se détachent du derme, signe de fragilité.

Les brûlures du groupe Flammazine® présentent pour l'une l'absence de *stratum corneum* et pour l'autre un *stratum corneum* fin. On note la persistance de la pigmentation cytoplasmique brune des couches basales et épineuses (cf **figure 41**).

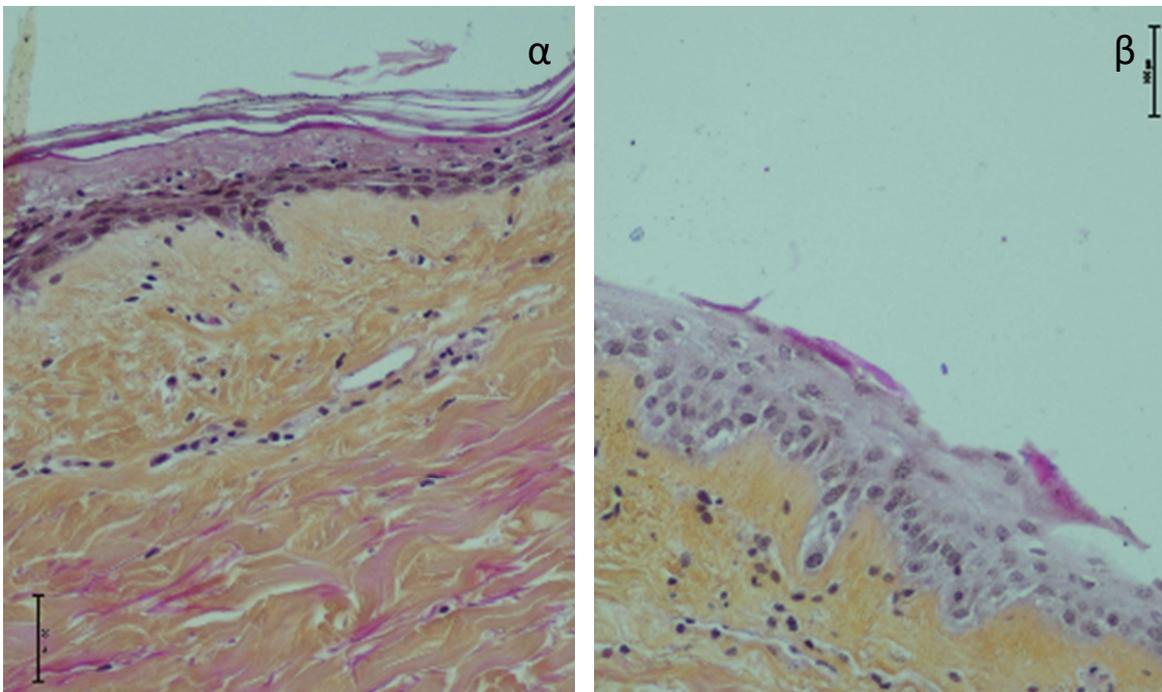
**Tableau 21** : photographies des coupes histologiques des brûlures d'explants de peau humaine, par groupes de traitement et en fonction du nombre de jours de l'expérimentation, coloration HPS (grossissement x20)

Groupes de traitement	5 <sup>ème</sup> jour d'expérimentation					11 <sup>ème</sup> jour d'expérimentation					15 <sup>ème</sup> jour d'expérimentation				
	Contrôle cicatrisation spontanée	Formulation F1	Formulation F2	Formulation F3	Contrôle Flamazine®	Contrôle cicatrisation spontanée	Formulation F1	Formulation F2	Formulation F3	Contrôle Flamazine®	Contrôle cicatrisation spontanée	Formulation F1	Formulation F2	Formulation F3	Contrôle Flamazine®



**Figure 40 :** (a) Défaut de coloration par HPS des kératinocytes supra basaux sur coupe histologique issue d'une brûlure traitée par la formulation F1 en comparaison (b) d'une brûlure groupe contrôle cicatrisation spontanée au 11<sup>ème</sup> jour d'expérimentation

Barre d'échelle : 100 µm



**Figure 41 :** (α) Présence d'une pigmentation cytoplasmique brune au niveau des couches basales et épineuses du groupe Flammazine® en comparaison (β) du groupe contrôle cicatrisation spontanée au 15<sup>ème</sup> jour d'expérimentation

Barre d'échelle : 100 µm

## Influence du jour d'expérimentation sur la hauteur épidermique des brûlures

Les résultats de mesure des épaisseurs épidermiques sont présentés respectivement dans les **figures 43 et 44** et les **tableaux 22 et 23**.

Deux types de mesure ont été effectués :

- *stratum corneum* exclu,
- *stratum corneum* et kératinocytes non colorés par HPS exclus.

L'évolution des épaisseurs épidermiques au cours de l'expérimentation est corrélée au nombre d'assises kératinocytaires; elle est le témoin de la cicatrisation des brûlures.

On observe dans la **figure 42** présentant les épaisseurs épidermiques mesurées avec comme unique couche épidermique exclu le *stratum corneum*:

- Pour les groupes *contrôle cicatrisation spontanée*, *formulations F1, F2* et le *contrôle Flammazine®*, une épaisseur épidermique maximale mesurée au onzième jour de l'expérimentation.
- Pour le groupe *formulation F3*, des hauteurs épidermiques plus importantes au terme de l'expérimentation.

Il est à noter que les épaisseurs épidermiques entre les onzième et quinzième jours d'expérimentation sont comparables pour l'ensemble des groupes, à l'exception du groupe F3, dont les coupes histologiques attestent d'un nombre important de cellules au cytoplasme clair, non pris en compte dans cette mesure.

**Tableau 22** : Epaisseur épidermique maximale des brûlures au cours de l'expérimentation selon la modalité de mesure *stratum corneum* exclu

Groupe de traitement	Epaisseur épidermique moyenne maximale ( $\mu\text{m}$ )	Jour
CCS	69,630 $\pm$ 42,217	15
F1	91,763 $\pm$ 76,004	11
F2	94,608 $\pm$ 64,370	11
F3	59,924 $\pm$ 13,991	15
CF	31,428 $\pm$ 14,676	11

CCS : contrôle cicatrisation spontanée

CF : contrôle Flammazine®

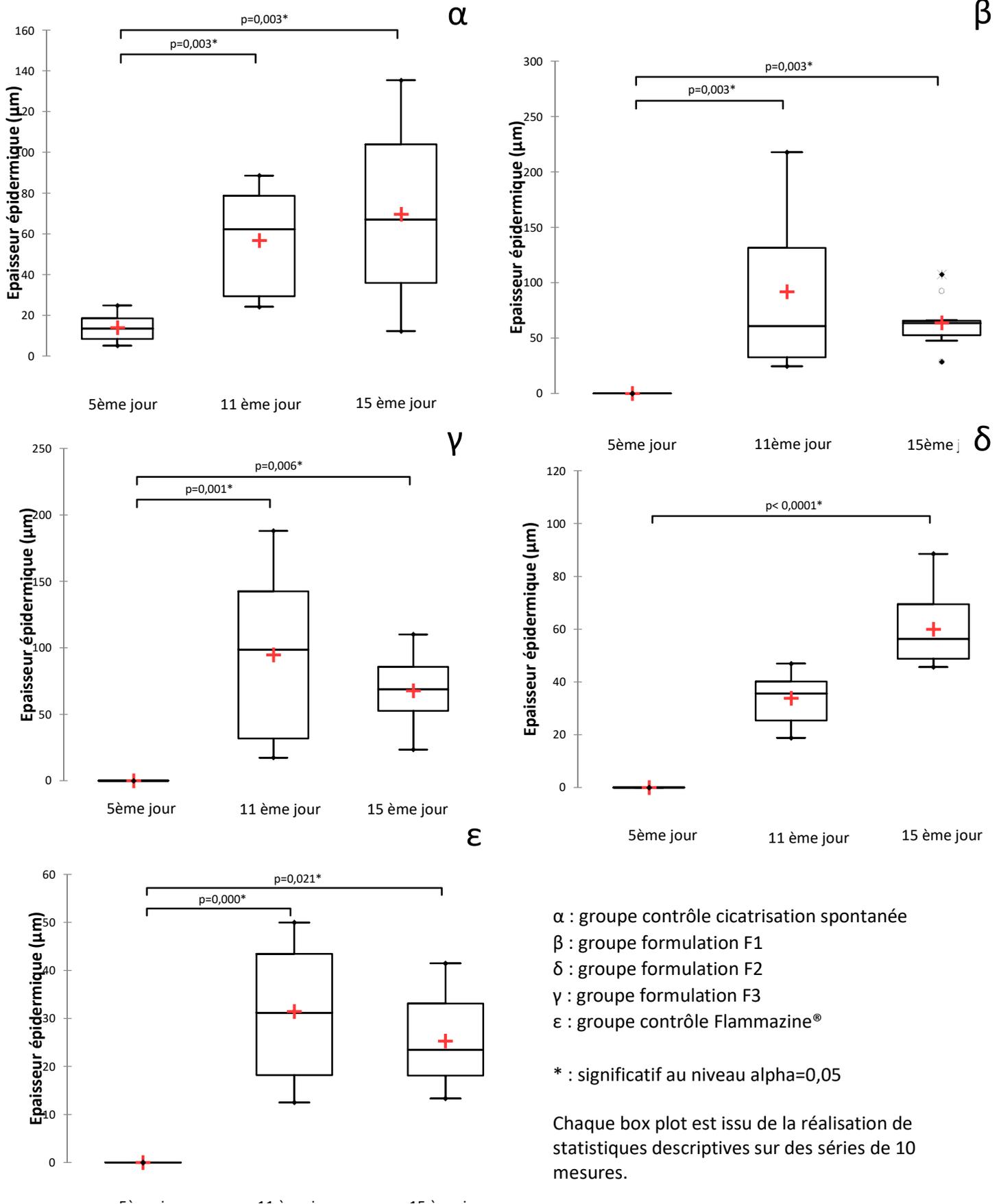
On observe dans la **figure 43** présentant les épaisseurs épidermiques mesurées *stratum corneum* et *kératinocytes au cytoplasme non coloré par HPS exclus* :

- Pour les groupes *formulations F1, F2* et le *contrôle Flammazine®*, une épaisseur épidermique maximale mesurée au onzième jour de l'expérimentation.
- Pour les groupes *contrôle cicatrisation spontanée* et *formulation F3*, des hauteurs épidermiques plus importantes au terme de l'expérimentation.

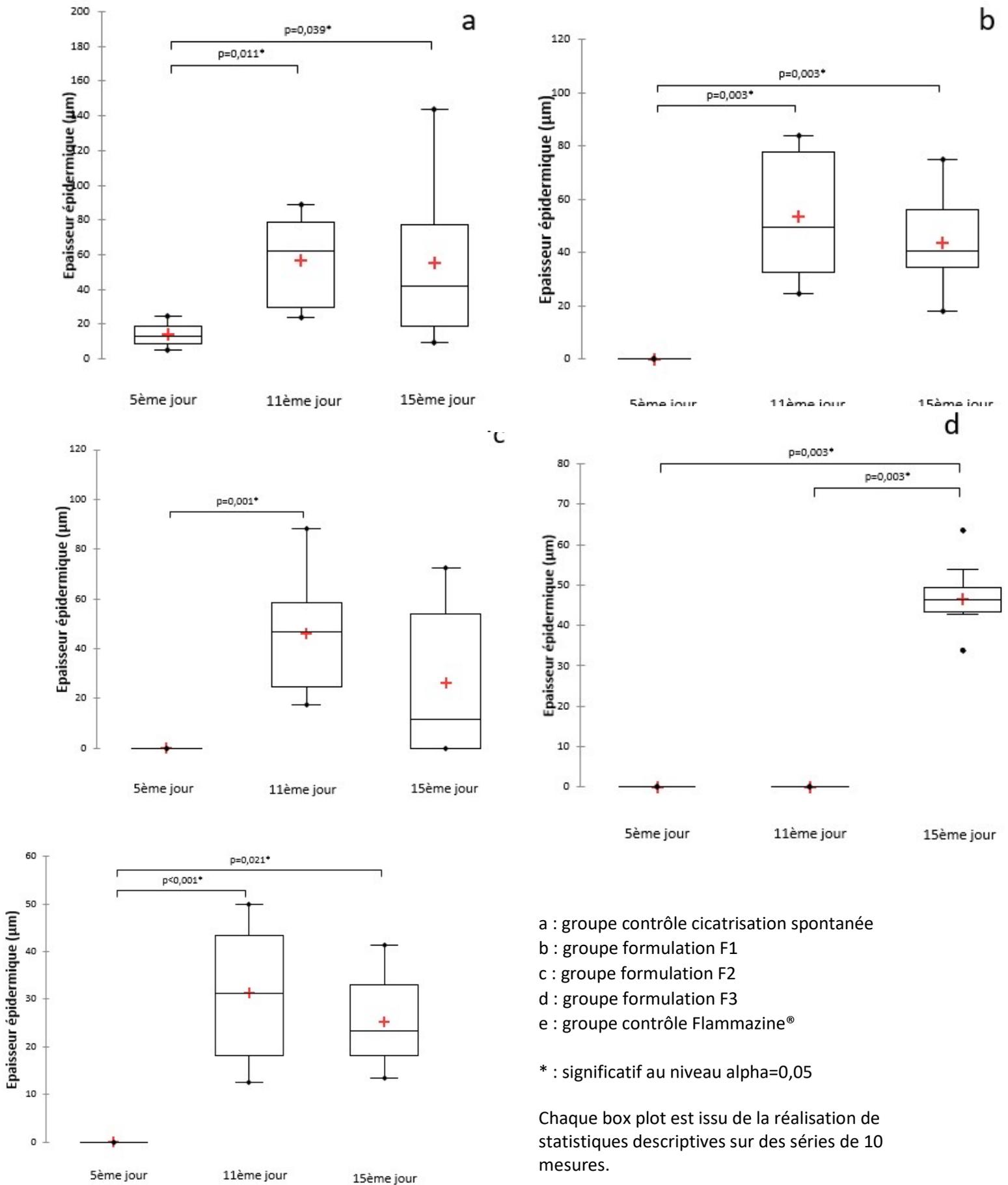
Il doit être relevé qu'il n'existe pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) dans les épaisseurs épidermiques, aux onzième et quinzième jours d'expérimentation, pour l'ensemble des groupes, à l'exception du groupe *formulation F3*, pour lequel cette modalité de mesure conduit à objectiver des hauteurs épidermiques nulles après cinq et onze jours d'expérimentation.

**Tableau 23** : *Epaisseur épidermique maximale des brûlures au cours de l'expérimentation selon la modalité de mesure stratum corneum exclu et kératinocytes non colorés par HPS exclus*

Groupe de traitement	Epaisseur épidermique moyenne maximale ( $\mu\text{m}$ )	Jour
CCS	56,748 $\pm$ 26,019	11
F1	53,440 $\pm$ 25,447	11
F2	46,098 $\pm$ 24,204	11
F3	46,435 $\pm$ 8,799	15
CF	31,428 $\pm$ 14,676	11



**Figure 42 :** Epaisseur épidermique des brûlures, stratum corneum exclu, au cours de l'expérimentation, en fonction du groupe de traitement



**Figure 43 :** Epaisseur épidermique des brûlures, stratum corneum et strates kératinocytaires présentant un cytoplasme non coloré exclus, au cours de l'expérimentation et en fonction du groupe de traitement

## **Influence des traitements testés sur la cicatrisation cutanée**

Seront présentées dans les **figures 45 et 46** les hauteurs épidermiques par type de formulation et par jour de prélèvement d'explant, selon les modalités de mesures précisées supra.

Il en ressort que la **supplémentation en vitamines A, C et E d'une préparation topique à 1% de SSD améliore significativement la cicatrisation d'explants de peau humaine** maintenus en survie en interface air/liquide en comparaison du groupe traité par Flammazine® au terme de 15 jours d'expérimentation, **selon la modalité de mesure excluant seulement le *stratum corneum* ( $p < 0,05$ ).**

### **Selon la modalité de mesure *stratum corneum* exclu :**

Après cinq jours d'expérimentation, le groupe *contrôle cicatrisation spontanée* présente une réépithélialisation significativement supérieure aux groupes *F1, F2, F3* et *contrôle Flammazine®*.

Après onze jours d'expérimentation, les groupes de traitement, bien que présentant des tendances de réépithélialisation distinctes, s'avèrent comparables ( $p > 0,05$ ).

Après quinze jours d'expérimentation, les groupes *formulations F1, F2, F3* et *contrôle cicatrisation spontanée* présentent une réépithélialisation significativement comparable et supérieure au contrôle Flammazine®.

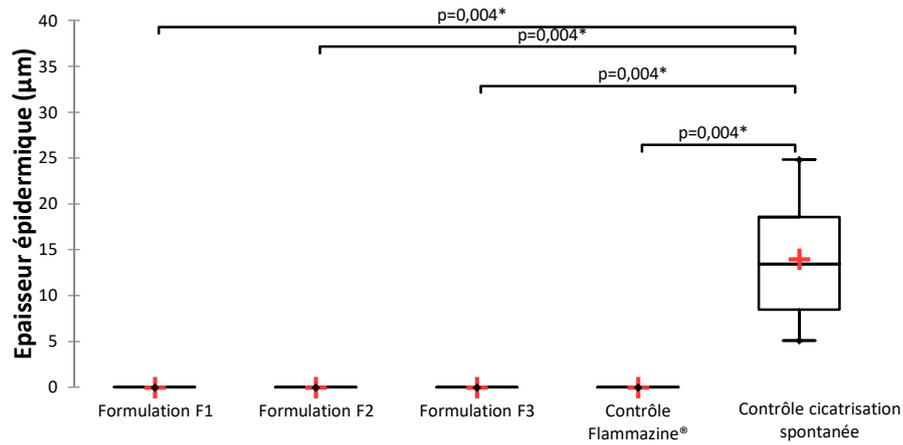
### **Selon la modalité de mesure *stratum corneum* et kératinocytes au cytoplasme non coloré par HPS exclus :**

Après cinq jours d'expérimentation, le groupe *contrôle cicatrisation spontanée* présente une réépithélialisation significativement supérieure aux groupes *F1, F2, F3* et *contrôle Flammazine®* ( $p < 0,05$ ).

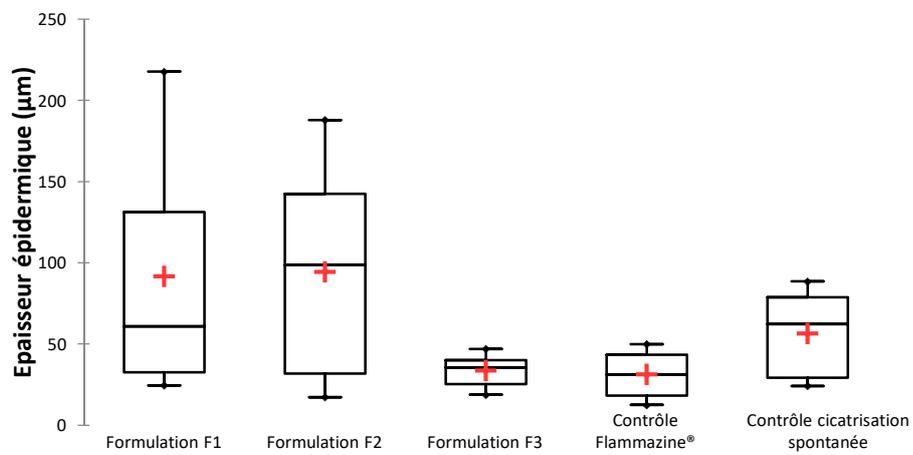
Après onze jours d'expérimentation, les groupes de traitement, bien que présentant des tendances de réépithélialisation distinctes en faveur du groupe *contrôle cicatrisation spontanée* suivi du groupe *F1*, s'avèrent comparables ( $p > 0,05$ ).

Après quinze jours d'expérimentation, l'ensemble des groupes s'avèrent également comparables, bien que le groupe *contrôle cicatrisation spontanée* présente une tendance à la réépithélialisation supérieure aux autres groupes.

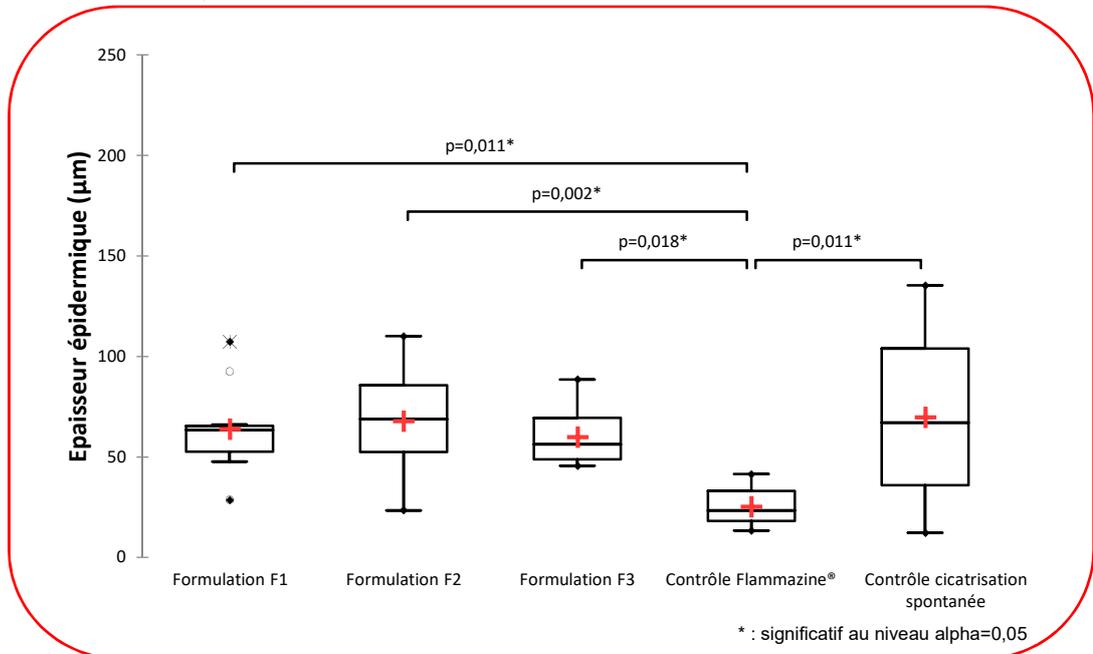
### 5ème jour d'expérimentation



### 11ème jour d'expérimentation

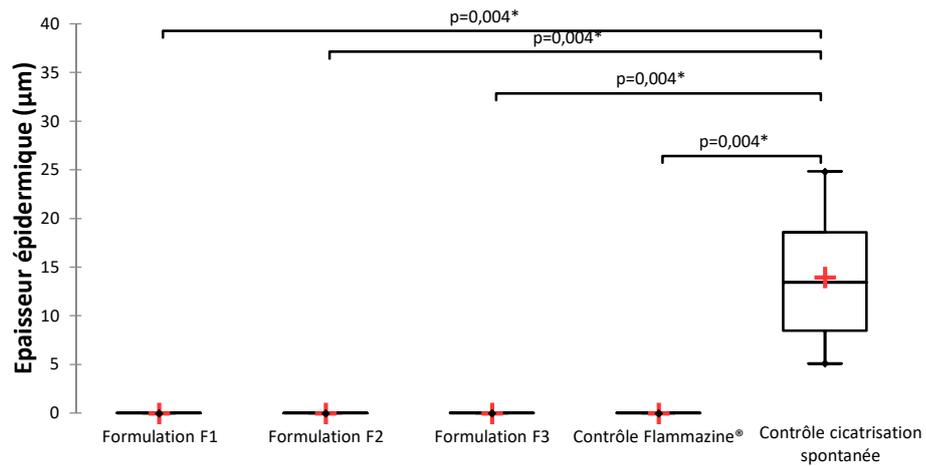


### 15ème jour d'expérimentation

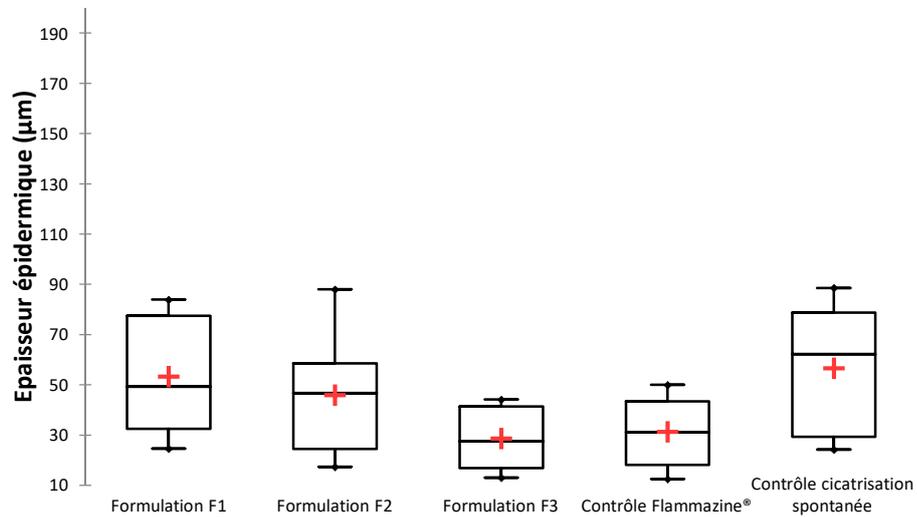


**Figure 44** : Effet du groupe de traitement sur la réépithétisation cutanée aux différents temps d'analyse selon la modalité de mesure stratum corneum exclu

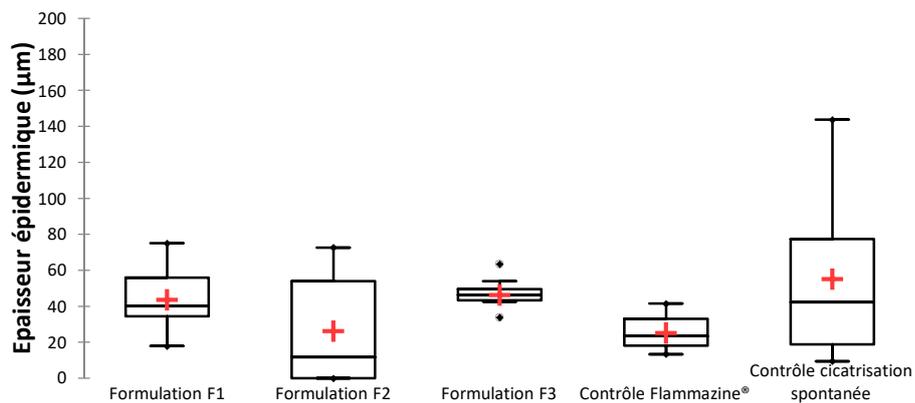
### 5ème jour d'expérimentation



### 11ème jour d'expérimentation



### 15ème jour d'expérimentation



**Figure 45 :** Effet du groupe de traitement sur la réépithétisation cutanée aux différents temps d'analyse selon la modalité de mesure stratum corneum et kératinocytes non colorés par HPS exclus

### iii. Validation de la méthode de dosage de l'acétate de tocophérol

La validation de la méthode de dosage du TA a été menée en conformité avec les recommandations ICH, selon le protocole V2 de la SFSTP.

Les valeurs des aires des pics (*Areas under curve*, AUC) correspondant au TA sont reportées dans les **tableaux 24 et 25**.

**Tableau 24** : Aires des pics des standards de calibration de l'acétate de tocophérol

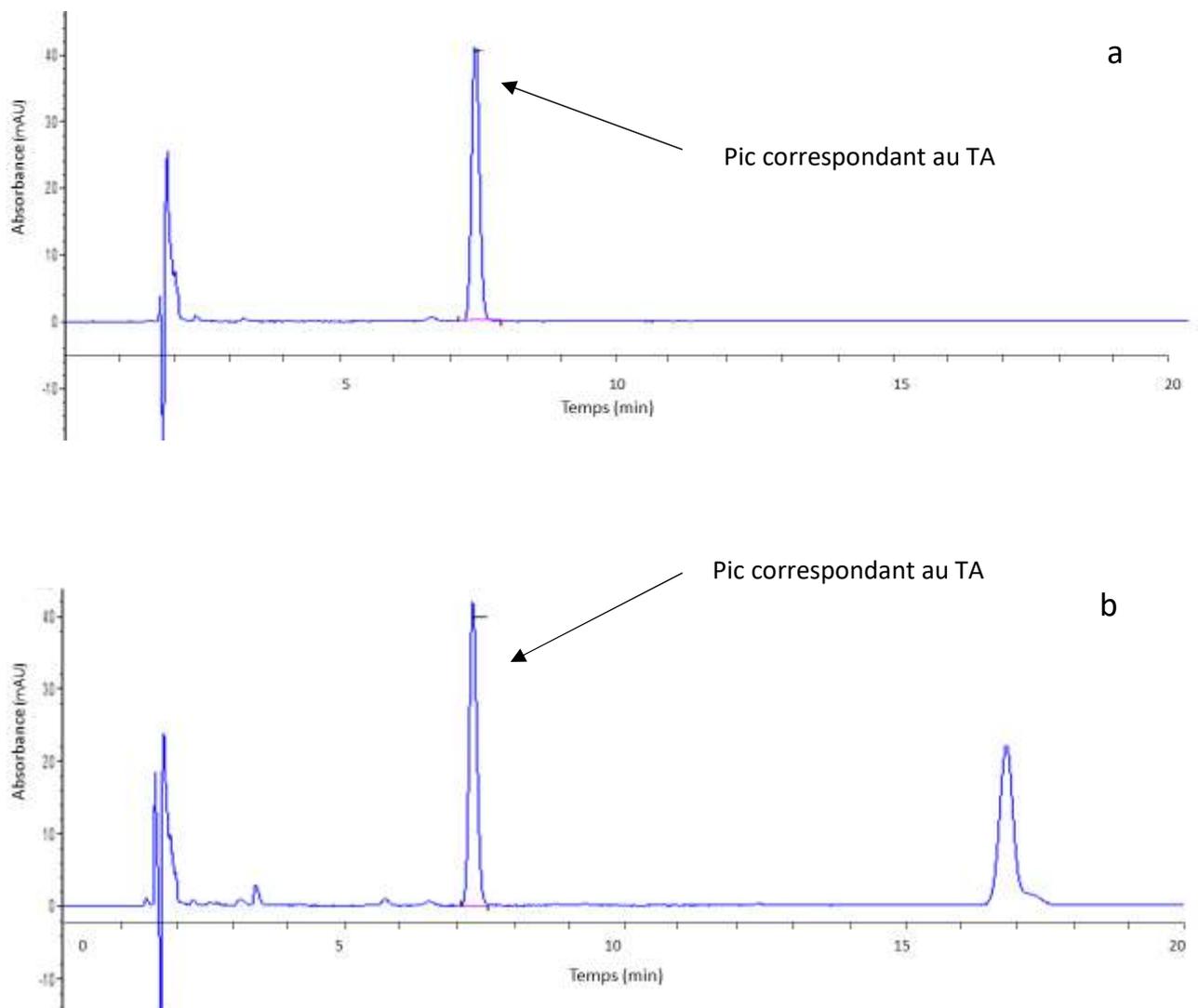
Niveaux	Jour	Concentration théorique (µg/mL)	AUC Analyte	
			Réponse 1	Réponse 2
<b>CS1</b> (Standard de Calibration 1)	1	25,00	142,50	142,50
	2	25,00	140,70	141,50
	3	25,00	151,20	150,10
<b>CS2</b> (Standard de Calibration 2)	1	71,43	409,50	408,90
	2	71,43	420,20	419,00
	3	71,43	420,50	419,00
<b>CS3</b> (Standard de Calibration 3)	1	125,00	696,90	696,10
	2	125,00	726,00	725,30
	3	125,00	736,10	734,60

**Tableau 25** : Aires des pics des standards de validation de l'acétate de tocophérol

Niveaux	Jour	Concentration théorique (µg/mL)	AUC Analyte		
			Réponse 1	Réponse 2	Réponse 3
<b>VS1</b> (Standard de Validation 1)	1	45,00	221,70	222,80	220,90
	2	45,00	250,80	250,60	250,50
	3	45,00	235,30	236,00	233,90
<b>VS2</b> (Standard de Validation 2)	1	75,00	367,20	367,00	366,20
	2	75,00	404,00	404,20	403,00
	3	75,00	402,60	402,60	401,50
<b>VS3</b> (Standard de Validation 3)	1	100,00	486,10	485,00	485,20
	2	100,00	507,50	506,10	507,30
	3	100,00	525,80	525,80	525,80

La spécificité de la méthode est illustrée par la **figure 46**, où une séparation complète a été remarquée en présence de matrice.

Les chromatogrammes (a) des solutions de TA pures et (b) de TA en présence de matrice (formulation F2, TA 1 %) n'ont montré aucune interférence entre le principe actif et la matrice. De plus, le spectre UV du TA était pur à 99,9 % témoignant de l'absence de co-élution d'un excipient à ce temps de rétention.



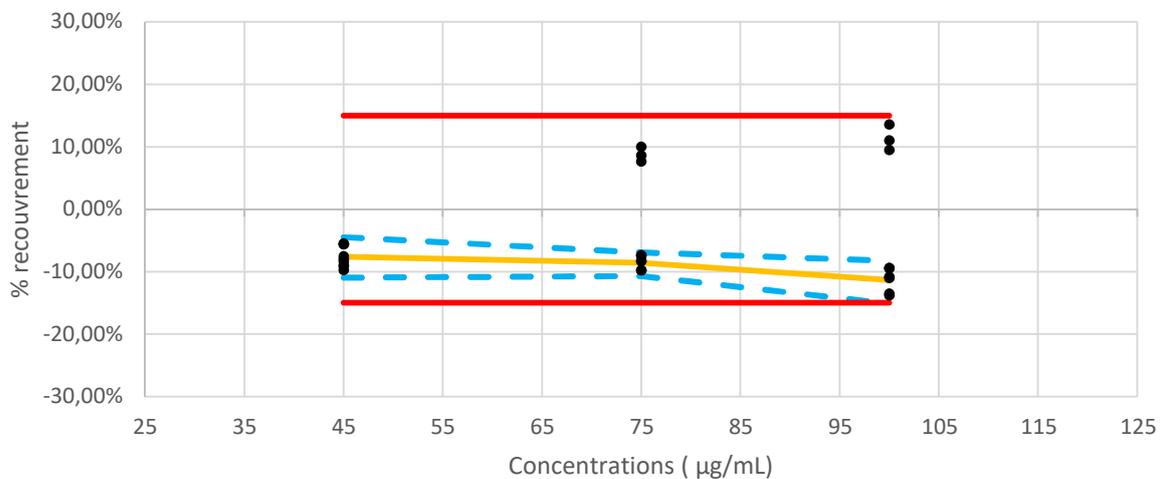
**Figure 46 :** Chromatogrammes (a) d'une solution d'acétate de tocophérol pure et (b) d'une suspension de formulation F2 (1 % TA m/m) filtrée

**Tableau 26 : Paramètres de validation pour le dosage de l'acétate de tocophérol**

R <sup>2</sup> n = 6, 4 ddl (> 95%)	Précision (< ±15%)	Recouvrement (85 – 115%)	Répétabilité (< 15%)			Reproductibilité (< 15%)		
			VS1	VS2	VS3	VS1	VS2	VS3
			0,9997	- 9,81	90,82	2,05	1,31	2,38

La **limite de détection** et la **limite de quantification** étaient respectivement de 2,87 µg/mL et de 8,70 µg/mL.

Le profil d'exactitude a été construit conformément aux exigences de la norme ISO 5725, il montre une précision comprise entre 85 et 115%, cf. **figure 47**. Les bornes de l'intervalle de tolérance (en bleu) étaient bien comprises à l'intérieur des limites d'acceptabilité (en rouge).



**Figure 47 : Profil d'exactitude de la méthode de dosage de l'acétate de tocophérol**

- Limites d'acceptabilité  $\lambda$  (15 %)
- Intervalle de tolérance  $\beta$
- Concentrations moyennes des standards de validation (SV)

Concernant les essais de **dégradation forcée**, dans les milieux basiques, acides, en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et après exposition aux rayonnements UV, la surface du pic de TA diminuait parallèlement à l'augmentation des produits de dégradation, qui se sont avérés séparés du pic de TA. La méthode de dosage développée est donc **indicatrice de stabilité**.

Le **tableau 27** présente les essais de dégradation forcée effectués ainsi que (i) les temps de rétention (Tr), (ii) les aires des pics (AUC) et (iii) les pourcentages correspondants à l'aire du pic de TA témoin, pour les différents Produits de Dégradation (PD).

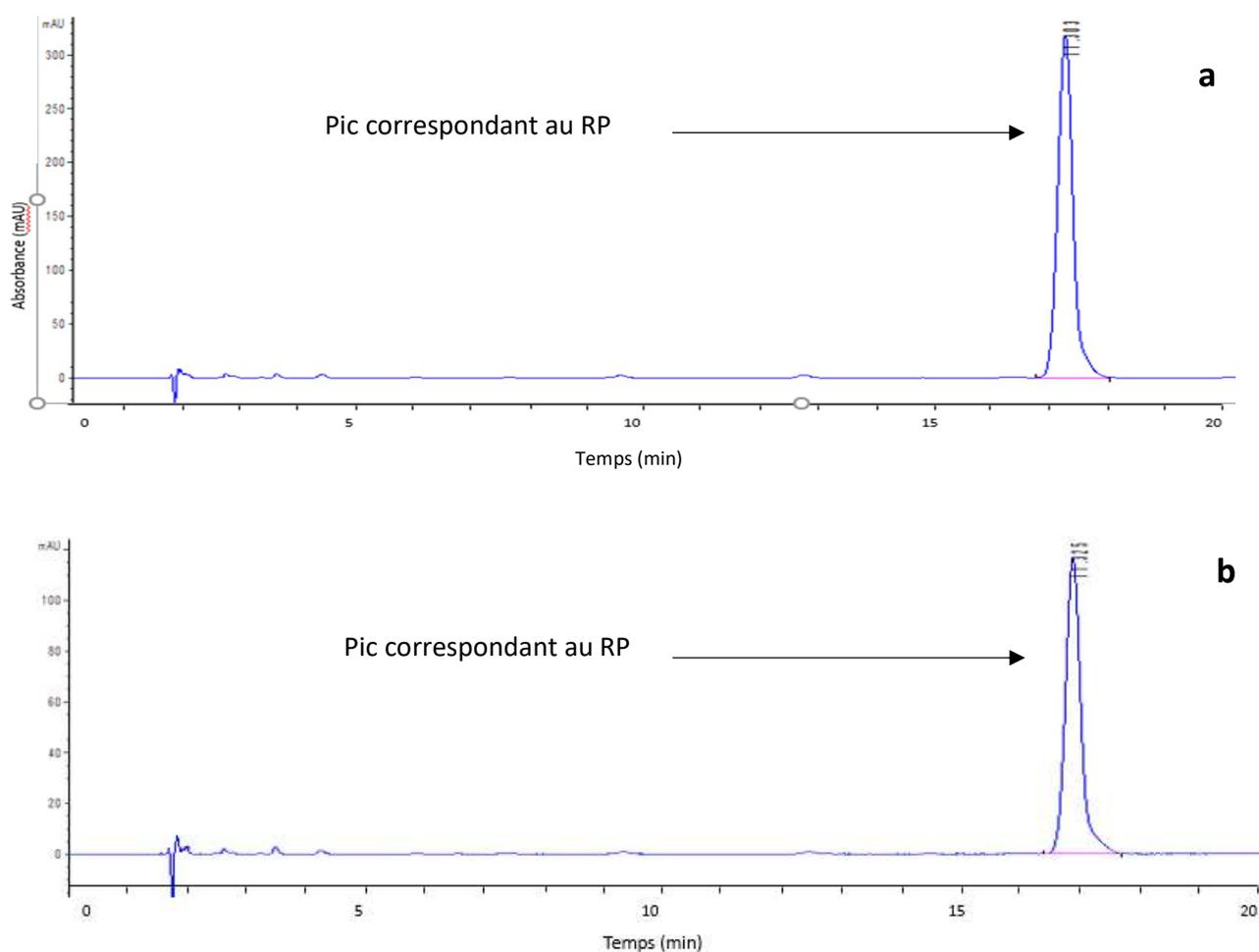
**Tableau 27:** Essais de dégradations forcées pour le développement d'une méthode de dosage de l'acétate de tocophérol indicatrice de stabilité

	Molécules	Tr (min)	AUC	% AUC témoin	
<b>Conditions de dégradation</b>	<b>Témoin</b>	TA	7,156	3560,34	100
		TA	7,156	2571,58	72,22849503
	<b>T° 60°C 30 min</b>	PD	1,799	948,18	26,63172618
		PD	2,398	44,93	1,261958128
		PD	3,022	78,24	2,197542931
		PD	3,332	390,08	10,95625699
		TA	7,178	1379,8	38,75472567
	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % 10 min</b>	PD	1,743	1247,5	35,03878843
		PD	1,839	586,89	16,48409983
		PD	1,964	103	2,892982131
		PD	2,104	79,64	2,236865019
	<b>UV 2 h</b>	TA	7,018	4667,15	87
		PD	1,777	1617,94	17,66
		PD	1,944	1059,11	19,8
	<b>HCl 0,05 N 1 min</b>	TA	7,194	350,98	9,858047265
		PD	1,683	736,32	20,6811709
		PD	1,732	1523,05	42,77821781
		PD	1,792	628,63	17,65645978
		PD	1,826	416,101	11,68711415
		PD	1,847	313,92	8,817135442
		PD	1,908	222,46	6,248279659
		PD	2,092	1201,19	33,73806996
	<b>NaOH 0,05 N 1 min</b>	PD	3,508	52,63	1,478229607
		TA	7,191	323,01	9,072448137
		PD	1,689	370	10,39226591
		PD	1,726	459,07	12,89399327
		PD	1,763	1297,28	36,4369695
PD		1,865	410,62	11,53316818	
PD		1,902	519	14,57725948	
PD		2,049	503,07	14,1298303	

#### iv. Dosage du palmitate de rétinyle

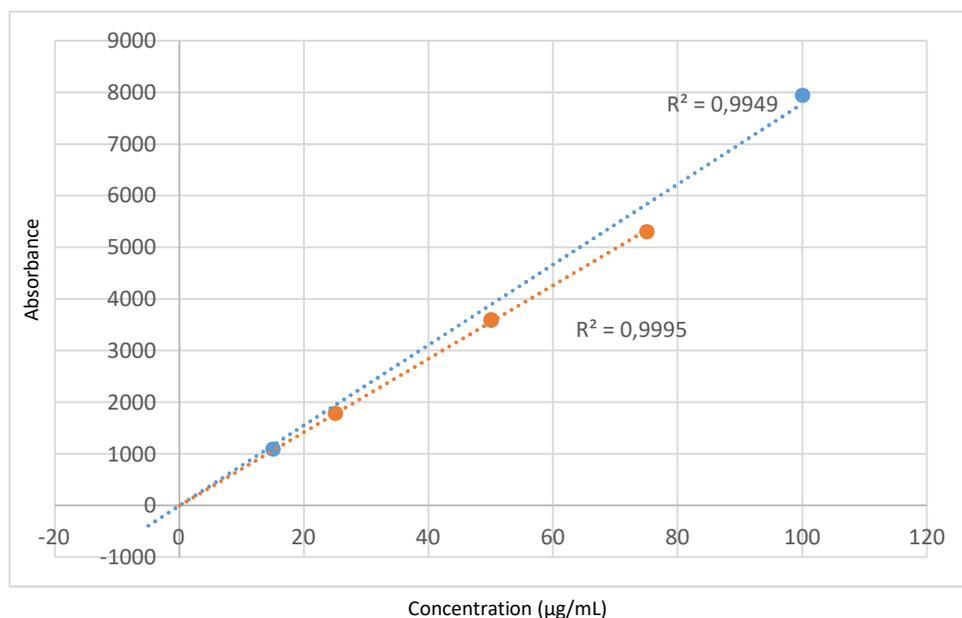
La spécificité de la méthode est illustrée par la **figure 48**, où une séparation complète a été remarquée en présence de matrice.

Les chromatogrammes (a) des solutions de RP pures et (b) de RP en présence de matrice (formulation F2, RP 0,2745 %) n'ont montré aucune interférence entre le principe actif et la matrice. De plus, le spectre UV du RP était pur à 99,9 %, témoignant de l'absence de co-élution d'un excipient à ce temps de rétention



**Figure 48** : Chromatogrammes (a) d'une solution de palmitate de rétinyle pure et (b) d'une suspension de formulation F2 (0,2745 % palmitate de rétinyle m/m) filtrée

La méthode de dosage du palmitate de rétinyle n'a pas pu être validée selon le protocole V2. La **figure 49** illustre les différences de réponses obtenues entre les solutions de RP pures et les solutions de RP en présence de matrice, conduisant à des droites d'étalonnage distinctes.



**Figure 49** : Courbes d'étalonnage divergentes d'une gamme issue de solutions de palmitate de rétinyle pures versus issue de suspensions de formulation F2 filtrées (palmitate de rétinyle 0,2745 %)

- Points de gammes et courbe d'étalonnage obtenus par analyse de solutions de palmitate de rétinyle pures
- Points de gammes et courbe d'étalonnage obtenus par analyse de suspensions de formulation F2 filtrées (palmitate de rétinyle 0,2745 %)

Concernant les essais de **dégradation forcée**, dans les milieux basiques, acides, en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et après exposition aux rayonnements UV, la surface du pic de RP diminuait parallèlement à l'augmentation des produits de dégradation, qui se sont avérés séparés du pic de RP. La méthode de dosage, une fois validée, sera **indicatrice de stabilité**.

Le **tableau 28** présente les essais de dégradation forcée effectués ainsi que (i) les temps de rétention (Tr), (ii) les aires des pics (AUC) et (iii) les pourcentages correspondants à l'aire du pic de RP témoin des différents Produits de Dégradation (PD).

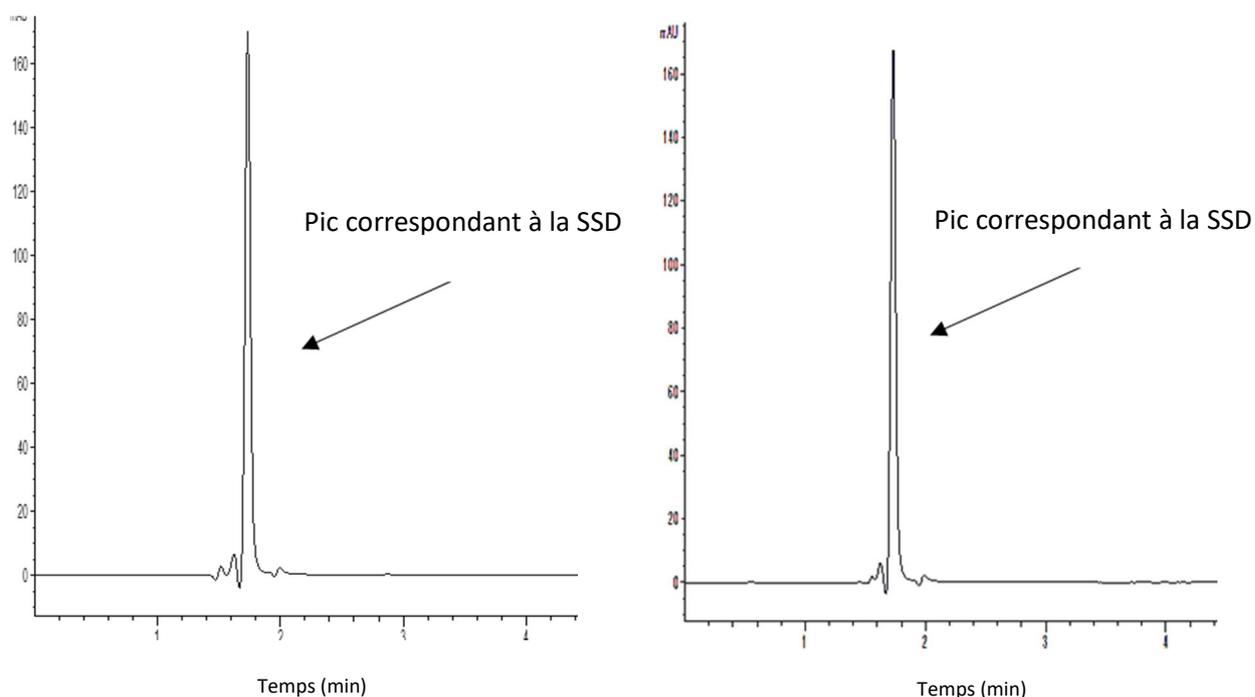
**Tableau 28** : Essais de dégradations forcées pour le développement d'une méthode de dosage du palmitate de rétinyl indicatrice de stabilité

	Molécules	Tr (min)	AUC	% AUC témoin	
<b>Témoin</b>	RP	16,401	11099,4	100	
<b>Conditions de dégradation</b>	<b>T° 60° C 30 min</b>	RP	16,415	11284,4	101,6667568
	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %</b>	RP	16,386	1219,288	10,98517037
		PD	pas à $\lambda$ max= 325,4 nm		
	<b>UV 50 min</b>	RP	16,383	3239,87	29,18959583
		PD	2,383	154,11	1,38845343
		PD	3,292	381,97	3,44135719
		PD	3,387	343,93	3,098635962
	<b>HCl 0,05 N 1 min</b>	RP	16,406	107,57	0,969151486
		PD	pas à $\lambda$ max= 325,4 nm		
	<b>NaOH 0,05 N 1 min</b>	RP	16,403	86,48	0,779141215
		PD	pas à $\lambda$ max= 325,4 nm		

#### v. Dosage de la sulfadiazine argentique

La spécificité de la méthode est illustrée par la **figure 50**, où une séparation complète a été remarquée en présence de matrice.

Les chromatogrammes (a) des solutions de SSD pures et (b) de SSD en présence de matrice (Flammazine<sup>®</sup>, 1 % SSD) n'ont montré aucune interférence entre le principe actif et la matrice. De plus, le spectre UV de la SSD était pur à 99,9 %, témoignant de l'absence de co-élution d'un excipient à ce temps de rétention.

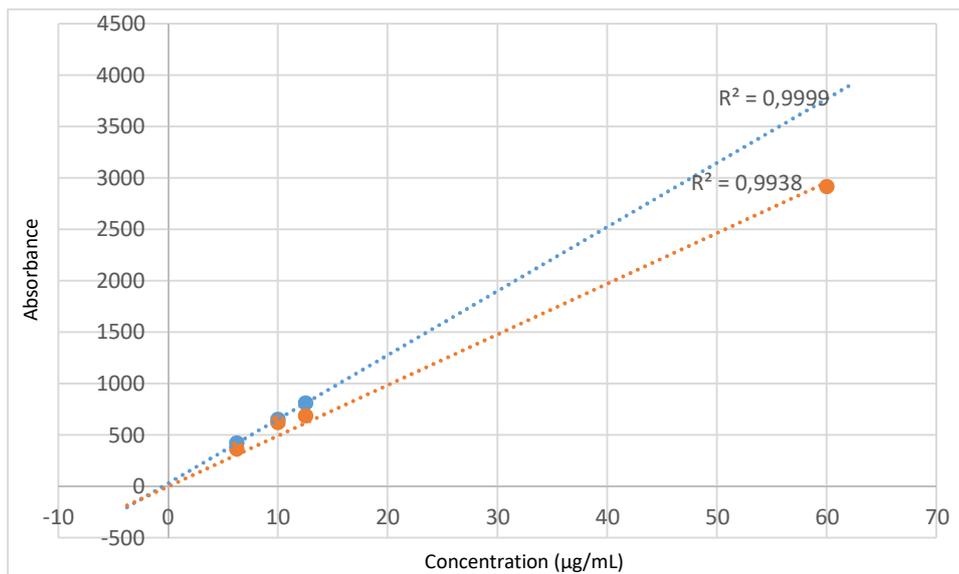


**Figure 50** : chromatogrammes (a) d'une solution de sulfadiazine argentique pure et (b) d'une suspension de Flammazine®(1 % sulfadiazine argentique) filtrée

Du fait soit (i) de la présence d'un effet matrice, soit (ii) d'un artefact d'effet matrice dû à la retenue d'une fraction de SSD par les filtres utilisés au préalable de la mise en vial des suspensions de Flammazine®, la méthode de dosage de la sulfadiazine n'a pas pu être validée selon le protocole V2. La **figure 51** illustre les différences de réponses obtenues entre la SSD pure et la SSD en présence de matrice, conduisant à des droites d'étalonnage distinctes.

Concernant les essais de **dégradation forcée**, dans les milieux basiques, acides, en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et après exposition aux rayonnements UV, la surface du pic de SSD diminuait parallèlement à l'augmentation des produits de dégradation, qui se sont avérés séparés du pic de SSD. La méthode de dosage, une fois validée, sera **indicatrice de stabilité**.

Le **tableau 29** présente les essais de dégradation forcée effectués ainsi que (i) les temps de rétention (Tr), (ii) les aires des pics et (iii) les pourcentages correspondants à l'aire du pic de SSD témoin des différents Produits de Dégradation (PD).



**Figure 51** : Courbes d'étalonnage divergentes d'une gamme issue de solutions de sulfadiazine argentique pures versus issue de suspensions de Flammazine® filtrées (sulfadiazine argentique 1,00 %)

- Points de gammes obtenus par analyse de solutions de sulfadiazine argentique pures
- Points de gammes obtenus par analyse de suspensions de Flammazine® filtrées (sulfadiazine argentique 1,00 %)

**Tableau 29:** Essais de dégradation forcée pour le développement d'une méthode de dosage de la SSD indicatrice de stabilité

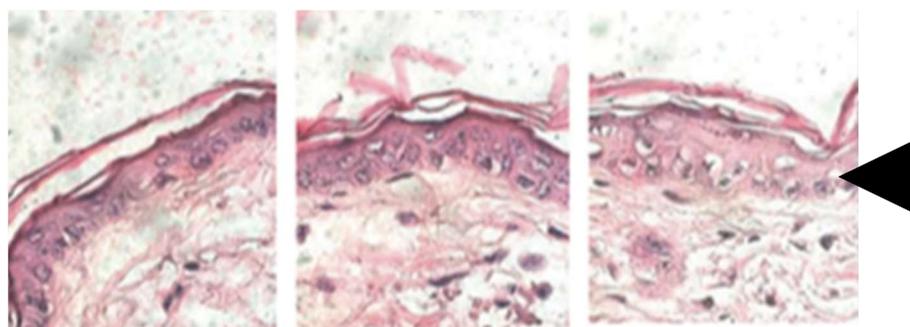
	Molécules	Tr (min)	AUC	% AUC témoin	
<b>Témoin</b>	SSD	1,946	818,8	100	
<b>Conditions de dégradation</b>	<b>T° 60°C 30 min</b>	SSD	1,947	771	94,16218857
		PD	pas à $\lambda$ max= 254,4 nm		
	<b>H2O2 3 %</b>	SSD	1,949	572,39	69,90595994
		PD	1,719	3797,08	463,7371764
		PD	3,835	21,29	2,600146556
	<b>UV 13,5h</b>	SSD	1,947	508,48	62,10063508
		PD	1,643	99,69	12,17513434
		PD	1,668	38,49	4,700781632
		PD	1,799	23,36	2,852955545
		PD	2,686	54,38	6,641426478
		PD	3,832	11,42	1,394723986
		PD	4,344	33,99	4,151196873
	<b>HCl 1 N 30 min 60°C</b>	SSD	1,949	830,41	100
		SSD	1,952	461,44	56,3556424
		PD	1,645	13,05	1,593795799
		PD	1,686	35,44	4,328285296
	<b>NaOH 1 N 30 min 60°C</b>	PD	1,75	28	3,419638495
		PD	2,08	10	1,221299463
		PD	2,314	52,11	6,3641915
		PD	3	10,84	1,323888617

### 2.5.3. Discussion

La supplémentation en vitamines A, C et E (sous forme respectivement de RP, AA-PAL et TA) de préparations topiques à 1 % de SSD inhibe le retard de réépithélialisation induit par la SSD au quinzième jour d'expérimentation sur des brûlures d'explants de peau humaine maintenus en survie ( $p < 0,05$ ). Néanmoins, les épithéliums cicatriciels des brûlures traitées par supplémentation vitaminique dans cette première série d'essais *ex-vivo* ont présenté des kératinocytes d'aspect atypique par défaut de coloration cytoplasmique sur coupes histologiques colorées par Hématoxyline Phloxine Safran. Une méthode de dosage du TA indicatrice de stabilité a été développée et validée.

Bien que l'étiologie de l'atypie de coloration observée au sein des brûlures traitées par les formulations en développement ne puisse être affirmée à ce jour, elle est sujette à des hypothèses. Ce défaut pourrait être le reflet (i) d'une intégration lipidique sous forme de vacuoles au sein des kératinocytes ou encore (ii) d'une souffrance cellulaire. *C. Chan et al* reprenaient en 2014 la notion de défaut de coloration des vacuoles lipidiques par la coloration HPS (228).

Il est à noter que *Campos et al* concluent à l'efficacité d'un traitement topique par acide tétra-isopalmitoyl-ascorbique (*tetra-isopalmitoyl ascorbic acid*, IPAA), induisant une épaisseur accrue de l'épiderme viable chez la souris, en présence d'un défaut de coloration kératinocytaire de localisation cytoplasmique, similaire à nos résultats (cf. figure c page suivante). Ce défaut n'est toutefois pas énoncé par les auteurs (229).



**Figure 52 :** Coupes histologiques de peau de souris (a) contrôle, traitées par (b) véhicule seul et (c) traitées par IPAA d'après Campos et al

← Défaut de coloration cytoplasmique

Le protocole d'évaluation d'efficacité *ex-vivo* des formulations en développement devra dans le futur être complété par une coloration topographique spécifique des lipides *Oil Red O*, afin de clarifier cette atypie de coloration. En effet, un test de viabilité cellulaire au MTT semble difficilement applicable à ce modèle.

Par ailleurs, des analyses topographiques, mais également immunohistologiques permettant d'une part, d'évaluer l'efficacité des formulations testées sur les différentes phases de la cicatrisation incluant les phases proliférative et de remodelage et d'autre part, de préciser l'efficacité des formulations au niveau dermique, devront être effectuées.

La validité du modèle d'explants de peau brûlée utilisé dans ce travail a été démontrée par l'augmentation des épaisseurs épidermiques des brûlures des explants au cours de l'expérimentation, traduisant une cicatrisation des brûlures et donc une viabilité des explants en culture. Les épaisseurs épidermiques maximales étaient observées soit au onzième, soit au quinzième jour d'expérimentation, démontrant toutefois une perte de viabilité au cours du temps.

Dans cette première série d'essais d'efficacité *ex-vivo*, deux modalités de mesures des hauteurs épidermiques ont été prises en compte. Selon la modalité de mesure *stratum corneum et kératinocytes présentant des atypies de coloration* exclus, le groupe contrôle cicatrisation spontanée ainsi que les formulations supplémentées en vitamines (ie. formulations F1, F2 et F3) présentaient une réépithélialisation comparable au contrôle Flammazine®. Bien que cette modalité permette de souligner l'importance quantitative des states kératinocytaires non colorées par HPS, elle conduit à des conclusions discordantes avec celles proposées par *Maghsoudi et al*, *Fraser et al* et *Cho Lee et al*, qui considèrent la SSD comme responsable d'un retard de cicatrisation (230) (122) (130).

Par ailleurs, il est à noter que la répétition de ce protocole d'essais d'efficacité *ex-vivo* devrait être réalisée sur un total de 3 biopsies provenant de 3 donneurs distincts, afin de permettre l'exclusion de l'effet de la variabilité interindividuelle sur les résultats analytiques.

On note également dans cette première série d'essais, l'absence d'effet dose-réponse attendu des suppléments vitaminiques sur la réépithélialisation cutanée. Ce résultat semble en lien avec des problématiques de solubilité et de stabilité.

Des agrégats d'AA-PAL non dissouts étaient présents au sein des formulations en développement. Ces agrégats ont constitué une fraction non disponible d'AA-PAL à l'exception d'une faible part de cette dernière, potentiellement dissoute dans l'exsudat à posteriori de l'application. On rappelle que l'état solubilisé est nécessaire à l'activité pharmacologique. L'AA-PAL est pratiquement insoluble dans l'eau, il est également peu soluble dans les huiles (e.g. 1 partie pour 1670 dans l'huile de graine de coton); il est toutefois facilement soluble dans l'éthanol. Ces données s'avèrent néanmoins problématiques dans le cadre de travaux futurs car l'utilisation de solvants alcooliques n'est pas envisageable dans notre cas, ces derniers étant mal tolérés sur les brûlures. Une réévaluation soit (i) des concentrations d'AA-PAL, soit (ii) de la nature du dérivé de la vitamine C incorporées au sein des formulations en développement devra être effectuée.

Les caractérisations macroscopiques et microscopiques des formulations en développement ont mis en évidence un changement de leur coloration en 72 heures. *Jurkovic et al* rapportent que l'oxydation de la vitamine C et de ses esters est repérée dans les formulations par une coloration jaunâtre qui s'accroît avec le temps (217).

Les formulations F1, F2, et F3 ont été préparées par mélange simple de spécialités commerciales complexes (i.e. Flammazine®, vitamine A Nepalm®, vitamine E Nepalm®), de MPUP (i.e. AA-PAL, SSD, TA) et de solvant. L'existence de réactions inter-moléculaires entre les dérivés vitaminiques et des ions argent ne peut être exclue.

En effet, les vitamines antioxydantes A, C, E même sous formes estérifiées, et à des degrés de sensibilité variables pour chacune d'entre elles, présentent intrinsèquement une réactivité vis à des ions métalliques (194) (213) (214). *Rowe et al* spécifient que l'AA-PAL présente une incompatibilité avec les ions métalliques traces (214). Selon *Spiclin et al*, l'AA-PAL, du fait de ses propriétés tensioactives, se positionne en émulsion à l'interface eau-huile, tête hydrophile en phase aqueuse et queue hydrophobe en phase huileuse. Il est sensible à l'oxydation dans ces conditions, et ce de manière plus marquée quand le sens de l'émulsion est de type huile dans eau, ce qui est ici notre cas. Ces données devront être prises en considération lors des futurs travaux de développement de la préparation anti-infectieuse et cicatrisante.

La SCCS précise que la chaleur et les métaux traces accélèrent la décomposition du RP par l'oxygène et la lumière (194).

Concernant le TA, ce dérivé vitaminique apparaît au vu de la littérature, et en conformité avec nos résultats expérimentaux, être le plus stable des 3 dérivés incorporés dans les formulations en développement.

Quant au développement analytique par HPLC, une méthode de dosage du TA indicatrice de stabilité a été développée et validée selon le protocole V2 proposé par la SFSTP, en utilisant comme standards de validation des dispersions filtrées de formulation F1.

La méthode de dosage du RP n'a pu être validée selon le protocole V2 de la SFSTP. Les différences de réponses observées entre les standards de calibration et les standards de validation de RP peuvent être expliquées soit (i) par la présence d'un effet matrice, soit (ii) par la dégradation du RP au sein de la formulation F2, (iii) soit encore par la retenue d'une fraction de RP par les filtres utilisés au préalable de la mise en vial des suspensions de formulation F2.

La réponse à l'hypothèse la plus probable au vu des données de la littérature que constitue l'instabilité du RP au sein des formulations en développement, pourra être fournie par le protocole suivant : des suspensions de formulation F2 filtrées (concentration en RP à  $t = 0$  connue : 0,2745 %) devront être analysées à différents temps à posteriori de la fabrication de la formulation F2 (e.g.  $t = 0$ ,  $t = 24$  heures,  $t = 48$  heures,  $t = 72$  heures et  $t = 96$  heures).

La méthode de dosage de la SSD n'a pu être validée selon le protocole V2 de la SFSTP. La différence de réponse observée entre les standards de calibration et les standards de validation de la SSD peut être expliquée soit (i) par la présence d'un effet matrice, (ii) soit par la retenue d'une fraction de SSD par les filtres utilisés au préalable de la mise en vial des suspensions de Flammazine®. Cette dernière hypothèse s'avère compatible avec le coefficient de partage octanol-eau de la sulfadiazine argentique (0,39), qui suggère sa présence dans des proportions non négligeables au sein des deux phases de l'émulsion Flammazine®. Il est à noter que l'hypothèse d'une instabilité de la SSD au sein même de la spécialité commerciale Flammazine® ne peut être raisonnablement retenue du fait de l'importance de la durée de conservation stipulée par son fabriquant.

Enfin, la mise au point d'une méthode de dosage du dérivé de vitamine C incorporé dans la préparation en développement devra dans le futur être élaborée.

Les problématiques de mise en forme pharmaceutique soulevées par les travaux expérimentaux présentés dans ce mémoire, peuvent être mises en parallèle aux difficultés rencontrées par les industriels et les PUI concernant la formulation des préparations de nutrition artificielle. En effet, les patients éligibles à la nutrition artificielle nécessitent des apports en vitamines et en oligo-éléments (e.g. métaux traces). Ces problématiques d'incompatibilités ont donc largement été étudiées. *Ferguson et al* rapportent dans l'article « *A review of stability issues associated with vitamins in parenteral nutrition* » la complexité d'intégration de ces molécules dans les poches de nutrition parentérale du fait de leur fragilité et leur réactivité. Selon ces auteurs, parmi l'ensemble des vitamines, les vitamines A et E sont celles pour lesquelles les problématiques de stabilité en mélange de nutrition artificielle s'avèrent les plus complexes (231).

Nous proposons dans le cadre de travaux futurs, deux axes de mise en forme galénique distincts.

Le premier est en lien avec les procédures d'administration usuelles de nutrition parentérale, où les apports de nutriments à l'état élémentaire, de vitamines et d'oligo-éléments proviennent de contenants séparés et sont mélangés via un circuit en dérivation uniquement au lit du patient avant de lui être administrés. Ainsi, la préparation topique cicatrisante et anti-infectieuse pourrait être en réalité composée de deux préparations distinctes, l'une contenant les dérivés vitaminiques et l'autre contenant la SSD, le mélange étant reconstitué extemporanément au lit du malade. Il est à noter que la présence d'interactions intermoléculaires entre les dérivés vitaminés et la SSD se déroulant au contact de la plaie ne pourra être exclue; l'étude de leur impact cutané devra être approfondie. La réalisation d'essais d'efficacité d'*ex-vivo* sur explants de peau humaine selon les modalités précisées supra ainsi que la réalisation d'une étude de biodisponibilité des préparations sur cellules de diffusion pourront constituer des éléments de réponse à cette problématique.

La seconde stratégie de mise en forme se rapproche quant à elle des solutions choisies par les industries pharmaceutiques dans le cas de la nutrition entérale, par les industries agro-alimentaires, ou encore par l'industrie cosmétique, qui proposent sur le marché de nombreuses formules semi-solides complexes incluant dans leur composition des vitamines.

La SSD, le RP, l'AA-PAL et le TA possédant des coefficients de partage octanol-eau respectivement de 0,39, 10,12, 9,6 et 6,0, une mise sous forme de systèmes dispersés liquide/liquide permettant l'intégration des vitamines dans une phase distincte de la SSD ne peut être proposée.

Une stratégie de vectorisation vitaminique semble donc plus adaptée. La littérature offre un large panel d'exemples de vectorisations vitaminiques A, C et E, en corrélation avec la diversité des possibilités offertes par ces micro et nanotechnologies.

Au total, le choix parmi ces stratégies devant être effectué au regard de la faisabilité de ces dernières et des coûts qui y sont associés, la formulation de deux préparations distinctes semble à privilégier.

### 2.5.6. Conclusion

Dans le but de développer une préparation topique anti-infectieuse et cicatrisante pour le traitement des brûlures actuellement prises en charge par Flammazine®, trois types de formulations à 1% de SSD composées de suppléments vitaminiques qualitativement fixes (dérivés esterifiés des vitamines A, C et E, correspondant respectivement au RP, à l'AA-PAL et au TA) mais quantitativement variables (gamme basse F1, gamme moyenne F2, gamme haute F3) ont été mises au point, puis ont fait l'objet d'une première série d'essais d'efficacité *ex-vivo*.

Des explants de peau humaine, issus d'un donneur unique, ont été (i) brûlés, (ii) répartis en 5 groupes de traitement (F1, F2, F3, contrôle Flammazine® et contrôle cicatrisation spontanée) et (iii) maintenus en survie en interface air/liquide. Au terme de 15 jours d'expérimentation, les brûlures traitées par les formulations co-supplémentées en SSD et en vitamines (i.e. formulations F1, F2 et F3) ainsi que les brûlures contrôle cicatrisation spontanée présentaient une réépithélisation supérieure aux brûlures traitées par SSD seule ( $p < 0,05$ ). Toutefois, des kératinocytes d'aspect atypique ont été mis en évidence, par coloration standard Hématoxyline Phloxine Safran, au sein des épidermes néoformés des brûlures traitées par co-supplémentation. Ces kératinocytes présentaient un défaut de coloration cytoplasmique dont l'étiologie ne peut à ce jour être affirmée, bien qu'étant sujette à des hypothèses. Ce défaut pourrait être le reflet (i) d'une intégration lipidique sous forme de vacuoles au sein des kératinocytes ou encore (ii) d'une souffrance cellulaire. Les conséquences sur l'évaluation finale du bénéfice attendu sur la cicatrisation de la préparation en développement rendent indispensables l'exploration future de cette atypie de coloration.

On remarque dans cette première série d'essais, l'absence d'effet dose-réponse des co-supplémentations vitaminiques A, C et E sur la réépithélialisation cutanée. Ce résultat semble en lien avec des problématiques de dissolution de l'AA-PAL et de stabilité des formulations testées, inhérentes à la réactivité intermoléculaire des vitamines antioxydantes avec la SSD au sein des formulations préparées ici par dispersion simple.

Le développement d'une préparation anti-infectieuse et cicatrisante à 1 % de SSD co-supplémentée en vitamines A, C et E devra donc faire l'objet de travaux futurs incluant soit (i) une mise en forme pharmaceutique en vue de la compartimentation distincte des vitamines *versus* SSD au sein d'une même préparation (i.e. vectorisation), soit (ii) la formulation et le conditionnement distincts de deux émulsions, l'une constituée d'une combinaison vitaminique A, C et E et l'autre composée de la SSD. Le mélange de ces deux préparations serait alors seulement effectué extemporanément, au lit du malade.

Une méthode de dosage du TA indicatrice de stabilité, par chromatographie liquide haute performance, a été développée et validée. Parallèlement, deux méthodes indicatrices de stabilité pour le dosage du RP et de la SSD sont en cours de développement. Enfin, une méthode de dosage du dérivé de la vitamine C incorporé dans la préparation en développement devra être mise au point.

Ces premiers travaux expérimentaux concernant le développement d'une préparation anti-infectieuse et cicatrisante pour le traitement des brûlures actuellement prises en charge par Flammazine® constituent une preuve de concept de l'intérêt de la supplémentation en vitamines A, C et E d'une préparation topique à 1 % de SSD. Ils nécessitent toutefois des travaux futurs de mise en forme galénique, indispensables à la stabilité des différents principes actifs au sein de la préparation finale. Ils seront suivis d'évaluations en série d'efficacité *ex-vivo* des préparations en développement, pour permettre de caractériser les effets cutanés de ces préparations et de déterminer les concentrations vitaminiques efficaces à incorporer au sein de la préparation finale. Enfin, la poursuite du développement des méthodes de dosage permettra l'étude de la stabilité de la préparation définitive, celle-ci devra être également associée à une évaluation de l'activité antibiotique de la SSD en présence des dérivés vitaminiques.

Ces travaux s'avèrent en effet indispensables pour garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité d'une telle préparation, avant d'envisager son évaluation en pratique clinique.

---

## Conclusion générale

---

La brûlure correspond à une destruction de la peau, principale barrière de protection de l'organisme. Elle résulte de l'action d'un agent thermique, chimique, électrique ou encore de radiations ionisantes. La brûlure s'accompagne d'un état de stress oxydatif proportionnel à sa gravité; primitivement local, ce stress oxydatif est amplifié dans le cadre de la cascade inflammatoire au niveau systémique. Une augmentation de la production de radicaux libres, responsable d'effets délétères locaux et à distance du tissu brûlé est associée à une consommation d'antioxydants.

La prise en charge des brûlés est conditionnée par la recherche de signes de gravité incluant l'étendue et la profondeur des lésions. Chez le brûlé grave, l'infection représente la première cause de mortalité, la prévention du risque infectieux constitue donc une priorité.

La spécialité pharmaceutique Flammazine® est une préparation topique de type crème huile dans eau contenant 1% de sulfadiazine argentique. Au contact de la plaie, la sulfadiazine argentique se dissocie, libérant dans l'exsudat des ions argent qui interagissent avec les éventuels microorganismes mais également avec les tissus traités par cette préparation. En effet, la cytotoxicité kératinocytaire, fibroblastique et leucocytaire de la sulfadiazine argentique, démontrée *in vitro*, peut conduire *in vivo* à un retard de cicatrisation et à des phénomènes de cicatrisation pathologiques (i.e. cicatrices hypertrophiques). Toutefois, en l'absence d'alternatives thérapeutiques ayant clairement démontré leur supériorité dans la prévention et le traitement local de l'infection chez le brûlé grave, la Flammazine® demeure en France depuis bientôt cinquante ans le traitement de première intention dans cette indication.

Cette étude de développement pharmaceutique initiée sur demande médicale avait pour objectifs la mise au point et l'évaluation de l'efficacité d'une préparation topique anti-infectieuse et cicatrisante à 1 % de sulfadiazine argentique, destinée au traitement des brûlures actuellement prises en charges par Flammazine®.

Ce travail reposait sur l'hypothèse que l'application sur les brûlures d'une préparation topique à 1 % de sulfadiazine argentique supplémentée en vitamines optimiserait leur cicatrisation.

L'étude de l'intérêt pharmacothérapeutique de la préparation en développement a conduit à compléter une préparation à 1 % de sulfadiazine argentique en vitamines A, C et E, en raison de leurs propriétés antioxydantes et pharmacodynamiques sur les fibroblastes et les kératinocytes. L'incorporation des vitamines A, C et E sous forme estérifiées (i.e. palmitate de rétinyle, palmitate d'ascorbyle et acétate d'alpha-tocophérol) a été justifiée par la meilleure stabilité de ces principes actifs dans les formulations pharmaceutiques, leur bioconversion cutanée, ou le cas échéant par leur efficacité sur la cicatrisation.

Trois types de formulations à 1% de sulfadiazine argentique contenant des suppléments vitaminiques qualitativement fixes mais quantitativement variables (gamme basse F1, gamme moyenne F2, gamme haute F3) ont été mises au point, puis ont fait l'objet d'une première série d'essais d'efficacité *ex-vivo*. Des explants de peau humaine, issus d'un donneur unique, ont été (i) brûlés, (ii) répartis en 5 groupes de traitement (F1, F2, F3, contrôle Flammazine® et contrôle cicatrisation spontanée) et (iii) maintenus en survie en interface air/liquide.

Parallèlement, des méthodes de dosage par chromatographie liquide haute performance ont été développées pour permettre l'étude de la stabilité de la préparation finale selon les méthodes ICH.

Au terme de quinze jours d'expérimentation, les brûlures traitées par les formulations à 1 % de sulfadiazine argentique supplémentées en vitamines (i.e. formulations F1, F2 et F3) tout comme les brûlures contrôle cicatrisation spontanée, présentaient une réépithélisation supérieure aux brûlures traitées par sulfadiazine argentique seule ( $p < 0,05$ ). Cependant, les brûlures traitées par les formulations F1, F2 et F3 comportaient des kératinocytes d'aspect atypique, du fait d'un défaut de coloration cytoplasmique par Hématoxyline Phloxine Safran. Les conséquences de cette atypie sur le bénéfice attendu de la préparation en développement rendent indispensables son exploration future.

On note également dans cette première série d'essais, l'absence d'effet dose-réponse des suppléments vitaminiques sur la réépithélialisation cutanée. Ce résultat semble en lien avec des problématiques de stabilité et de mise en forme pharmaceutique.

Enfin, une méthode de dosage indicatrice de stabilité du TA par chromatographie liquide haute performance a été développée et validée. Parallèlement, deux méthodes indicatrices de stabilité pour le dosage du RP et de la SSD sont en cours de développement.

Les premiers résultats du développement d'une préparation topique anti-infectieuse et cicatrisante exposés dans ce mémoire soulignent le potentiel thérapeutique de ce projet et ont esquissé les axes d'études pré-cliniques nécessaires pour le mener à bien. La poursuite du développement de méthodes analytiques devra être associée à des travaux de mise en forme galénique, indispensables à la stabilité de la préparation finale. Ils seront suivis d'évaluations en série d'efficacité *ex-vivo*, pour permettre de caractériser les effets cutanés de ces préparations et de déterminer les concentrations vitaminiques efficaces à incorporer au sein de la préparation finale. Enfin, des études de stabilité et d'évaluation de l'activité antibiotique sur la préparation définitive devront être conduites.

Ces travaux s'avèrent en effet indispensables pour garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité d'une telle préparation, avant d'envisager son évaluation en pratique clinique.

**Le Président du Jury  
(Nom et signature)**

BIRSE  
JP

**VU ET PERMIS D'IMPRIMER**  
Lyon, le 11/10/2018

**Vu, La Directrice de l'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon  
Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon**



**Professeur Christine VINCIGUERRA**



---

## Bibliographie

---

1. Le codage des causes externes de morbidité et mortalité dans le PMSI : les causes de brûlures Anne Pasquereau et al, Congrès EMOIS, Nancy, 21 mars 2013.
2. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol EJD*. août 2002;12(4):390-9; quiz 400-1.
3. Dréno B. Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. /data/revues/01519638/v136sS6/S015196380972527X/ [Internet]. 19 nov 2009 [cité 7 janv 2017]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/232246>
4. Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie (3<sup>e</sup> Éd.) MARTINI Marie-Claude [Internet]. Librairie Lavoisier. [cité 7 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/introduction-a-la-dermopharmacie-et-a-la-cosmetologie-3-ed/martini/descriptif-9782743012700>
5. Reichrath J, Lehmann B, Carlberg C, Varani J, Zouboulis CC. Vitamins as hormones. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab*. févr 2007;39(2):71-84.
6. Kubryak OV, Umriukhin AE, Emeljanova IN, Antipova OS, Guseva AL, Pertsov SS, et al. Increased  $\beta$ -endorphin level in blood plasma as an indicator of positive response to depression treatment. *Bull Exp Biol Med*. sept 2012;153(5):758-60.
7. La réaction inflammatoire [Internet]. [cité 7 oct 2018]. Disponible sur: <http://tp-svt.pagesperso-orange.fr/inflammation.htm>
8. Shetty S. Keratinization and its Disorders. *Oman Med J*. sept 2012;27(5):348-57.
9. Elias PM. The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol*. avr 2007;29(1):3-14.
10. Dupasquier F. Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré [Internet] [phdthesis]. Université Claude Bernard - Lyon I; 2011 [cité 14 janv 2017]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00830801/document>
11. Prost-Squarcioni C. Histologie de la peau et des follicules pileux. *MS Médecine Sci*. 2006;22(2):131-7.

12. Fenner J, Clark RAF. Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin [Internet]. 2016 [cité 15 janv 2017]. Disponible sur: [https://www.researchgate.net/publication/303415331\\_Anatomy\\_Physiology\\_Histology\\_and\\_Immunohistochemistry\\_of\\_Human\\_Skin](https://www.researchgate.net/publication/303415331_Anatomy_Physiology_Histology_and_Immunohistochemistry_of_Human_Skin)
13. Woo S-H, Lumpkin EA, Patapoutian A. Merkel cells and neurons keep in touch. Trends Cell Biol. févr 2015;25(2):74-81.
14. M. Adé-Damino. Membrane basale, lame basale, lame réticulaire [Internet]. [cité 15 janv 2017]. Disponible sur: <https://www.unifr.ch/anatomy/assets/files/elearning/fr/epithel/epithel06.html>
15. Démarchez M. Le derme. Biologie de la peau [Internet]. <http://biologiedelapeau.fr>. 2017 [cité 15 janv 2017]. Disponible sur: <http://biologiedelapeau.fr/>
16. Prost-Squarcioni et al. Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes. Structures des annexes cutanées. 2005; Annales de dermatologie et venerologie(132):855-48.
17. Masson E. Physiologie de la sécrétion sudorale [Internet]. EM-Consulte. [cité 14 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/65371/physiologie-de-la-secretion-sudorale>
18. Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine [Internet]. [cité 4 févr 2017]. Disponible sur: <http://dictionnaire.academie-medecine.fr/?q=brulure>
19. Hettiaratchy S, Dziewulski P. Pathophysiology and types of burns. BMJ. 10 juin 2004;328(7453):1427-9.
20. Grey JE, Enoch S, Harding KG. Wound assessment. BMJ. 2 févr 2006;332(7536):285-8.
21. OMS | Brûlures [Internet]. [cité 27 nov 2016]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/fr/>
22. Hospitalisations pour brûlures à partir des données du Programme de médicalisation des systèmes d'information / 2014 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil [Internet]. [cité 30 janv 2017]. Disponible sur: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2014/Hospitalisations-pour-brulures-a-partir-des-donnees-du-Programme-de-medicalisation-des-systemes-d-information>
23. Wassermann D. Critères de gravité des brûlures. Épidémiologie, prévention, organisation de la prise en charge. <Httpwwwem-Premiumcomdocelecuniv-Lyon1frdatarevues036981140050000201002711> [Internet]. 28 mai 2008 [cité 30 janv 2017].

- 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/article/163950/resultatrecherche/1>
24. American Burn Association [Internet]. [cité 23 janv 2017]. Disponible sur: [http://www.ameriburn.org/resources\\_factsheet.php](http://www.ameriburn.org/resources_factsheet.php)
  25. OMS | Brûlures [Internet]. WHO. [cité 14 avr 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/fr/>
  26. Zielins ER, Brett EA, Luan A, Hu MS, Walmsley GG, Paik K, et al. Emerging drugs for the treatment of wound healing. *Expert Opin Emerg Drugs*. 3 avr 2015;20(2):235-46.
  27. Sparkes BG. Immunological responses to thermal injury. *Burns J Int Soc Burn Inj*. mars 1997;23(2):106-13.
  28. Berger MM. Antioxidant micronutrients in major trauma and burns: evidence and practice. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr*. oct 2006;21(5):438-49.
  29. Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care [Internet]*. 2015 [cité 14 janv 2017];19. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464872/>
  30. Nisanci M, Eski M, Sahin I, Ilgan S, Isik S. Saving the zone of stasis in burns with activated protein C: an experimental study in rats. *Burns J Int Soc Burn Inj*. mai 2010;36(3):397-402.
  31. Tan J-Q, Zhang H-H, Lei Z-J, Ren P, Deng C, Li X-Y, et al. The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats. *Burns J Int Soc Burn Inj*. déc 2013;39(8):1551-6.
  32. Deniz M, Borman H, Seyhan T, Haberal M. An effective antioxidant drug on prevention of the necrosis of zone of stasis: N-acetylcysteine. *Burns J Int Soc Burn Inj*. mars 2013;39(2):320-5.
  33. Casanova D, Voinchet V, Berret M, Magalon G. Brûlures : prise en charge et indications thérapeutiques. [Httpwwwem-Premiumcomdocelecuniv-Lyon1frdatatraitesap15-18864](http://www.em-premium.com.docelec.univ-Lyon1frdatatraitesap15-18864) [Internet]. [cité 7 janv 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/article/8347/resultatrecherche/3>
  34. Medical Illustration Portfolio : Science Source : Medical Illustration Source Book [Internet]. [cité 29 janv 2017]. Disponible sur: <http://medillsb.com/ArtistPortfolioLarge.aspx?IID=190716&AID=5322>
  35. Robins EV. Burn shock. *Crit Care Nurs Clin North Am*. juin 1990;2(2):299-307.

36. Atiyeh BS, Gunn SW, Hayek SN. State of the Art in Burn Treatment. *World J Surg.* 1 févr 2005;29(2):131-48.
37. Al-Jawad FH, Sahib AS, Al-Kaisy AA. Role of Antioxidants in the Treatment of Burn Lesions. *Ann Burns Fire Disasters.* 31 déc 2008;21(4):186-91.
38. Berger MM, Cavadini C, Bart A, Mansourian R, Guinchard S, Bartholdi I, et al. Cutaneous copper and zinc losses in burns. *Burns J Int Soc Burn Inj.* oct 1992;18(5):373-80.
39. Cuthbertson DP, Fell GS, Smith CM, Tilstone WJ. Metabolism after injury. I. Effects of severity, nutrition, and environmental temperature on protein potassium, zinc, and creatine. *Br J Surg.* déc 1972;59(12):926-31.
40. Hunt DR, Lane HW, Beesinger D, Gallagher K, Halligan R, Johnston D, et al. Selenium depletion in burn patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* déc 1984;8(6):695-9.
41. Vinha PP, Martinez EZ, Vannucchi H, Marchini JS, Farina JA, Jordao AA, et al. Effect of acute thermal injury in status of serum vitamins, inflammatory markers, and oxidative stress markers: preliminary data. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc.* avr 2013;34(2):e87-91.
42. Farina JA, Rosique MJ, Rosique RG. Curbing Inflammation in Burn Patients. *Int J Inflamm.* 20 mai 2013;2013:e715645.
43. Le Floch R, Naux E, Arnould JF. L'infection bactérienne chez le patient brûlé. *Ann Burns Fire Disasters.* 30 juin 2015;28(2):94-104.
44. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev.* avr 2006;19(2):403-34.
45. D'Avignon LC, Hogan BK, Murray CK, Loo FL, Hospenthal DR, Cancio LC, et al. Contribution of bacterial and viral infections to attributable mortality in patients with severe burns: an autopsy series. *Burns J Int Soc Burn Inj.* sept 2010;36(6):773-9.
46. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J Int Med Res.* 1 oct 2009;37(5):1528-42.
47. Cicatrisation et brûlure [Internet]. [cité 29 janv 2017]. Disponible sur: [http://www.sffpc.org/index.php?pg=connaiss\\_biologie2](http://www.sffpc.org/index.php?pg=connaiss_biologie2)
48. Benson A, Dickson WA, Boyce DE. Burns. *BMJ.* 18 mars 2006;332(7542):649-52.
49. FMPMC-PS - Histologie : organes, systèmes et appareils - Niveau PCEM2 - DCEM1 [Internet]. [cité 29 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/POLY.Chp.5.6.html>

50. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 15 mai 2008;453(7193):314-21.
51. Clark RA. Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin*. oct 1993;11(4):647-66.
52. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg*. juill 1998;25(3):321-40.
53. Senet P. Physiologie de la cicatrisation cutanée. [Httpwwwem-Premiumcomdocelecuniv-Lyon1frdatatraitesde298-47992](http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/dataset/traitements/298-47992) [Internet]. 4 juin 2007 [cité 8 janv 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/article/62145/resultatrecherche/1>
54. Li J, Zhang Y-P, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*. 1 janv 2003;60(1):107-14.
55. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 4 avr 1997;276(5309):75-81.
56. G Captier. Les brûlures en phase aïgue [Internet]. [cité 31 janv 2016]. Disponible sur: [http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle\\_2/MIF/Ressources\\_locales/Urgences/MIF\\_201\\_cours\\_externe\\_brulure.pdf](http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_2/MIF/Ressources_locales/Urgences/MIF_201_cours_externe_brulure.pdf)
57. d'urgence M. Brulures graves PEC [Internet]. *Mandragore Medecine d'Urgence*. 2017 [cité 7 oct 2018]. Disponible sur: <https://mandragoremedecine.com/brulures-graves/>
58. morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar - Recherche Google [Internet]. [cité 6 févr 2017]. Disponible sur: [https://www.google.fr/search?q=morphological+and+immunochemical+differences+between+keloid+and+hypertrophic+scar&rlz=1C1CHFX\\_frFR535FR535&oq=morphological+and+immunoche&aqs=chrome.1.69i57j0l2.23875j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.fr/search?q=morphological+and+immunochemical+differences+between+keloid+and+hypertrophic+scar&rlz=1C1CHFX_frFR535FR535&oq=morphological+and+immunoche&aqs=chrome.1.69i57j0l2.23875j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8)
59. Ingen-Housz-Oro S, Benjoar M-D. Brûlures superficielles : physiopathologie, clinique, traitement. [Httpwwwem-Premiumcomdocelecuniv-Lyon1frdatatraitestmtm-55123](http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/dataset/traitements/55123) [Internet]. 21 janv 2010 [cité 26 déc 2016]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/article/240266/resultatrecherche/4>
60. Enoch S, Roshan A, Shah M. Emergency and early management of burns and scalds. *BMJ*. 8 avr 2009;338:b1037.
61. Ryan CM, Schoenfeld DA, Thorpe WP, Sheridan RL, Cassem EH, Tompkins RG. Objective estimates of the probability of death from burn injuries. *N Engl J Med*. 5 févr 1998;338(6):362-6.
62. Hettiaratchy S, Papini R. Initial management of a major burn: II—assessment and resuscitation. *BMJ*. 8 juill 2004;329(7457):101-3.

63. Sheppard NN, Hemington-Gorse S, Shelley OP, Philp B, Dziewulski P. Prognostic scoring systems in burns: a review. *Burns J Int Soc Burn Inj.* déc 2011;37(8):1288-95.
64. Muehlberger T, Ottomann C, Toman N, Daigeler A, Lehnhardt M. Emergency pre-hospital care of burn patients. *Surg J R Coll Surg Edinb Irel.* avr 2010;8(2):101-4.
65. Alsbjörn B, Gilbert P, Hartmann B, Kaźmierski M, Monstrey S, Palao R, et al. Guidelines for the management of partial-thickness burns in a general hospital or community setting--recommendations of a European working party. *Burns J Int Soc Burn Inj.* mars 2007;33(2):155-60.
66. Committee IPG, Ahuja RB, Gibran N, Greenhalgh D, Jeng J, Mackie D, et al. ISBI Practice Guidelines for Burn Care. *Burns.* 1 août 2016;42(5):953-1021.
67. Société Française et Francophone des Plaies et Cicatrisations. soins-locaux-brules-suivis-ambulatoire.pdf.
68. Osmosoft, apaise et soulage les brûlures et les coups de soleil [Internet]. Osmosoft. [cité 8 sept 2018]. Disponible sur: <http://www.osmosoft.fr/>
69. Notice patient - BIAFINE, émulsion pour application cutanée - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 8 sept 2018]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?typedoc=N&specid=69931588>
70. Résumé des caractéristiques du produit - DEXERYL, crème - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 8 sept 2018]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=62334028&typedoc=R>
71. VIDAL - CICATRYL pom en sachet-dose - Synthèse [Internet]. [cité 8 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/Medicament/cicatryl-3816.htm>
72. De Souza BA, Furniss D, Olaofe G, Jawad M. Vaseline and burns. *BMJ.* 29 nov 2003;327(7426):1289.
73. DUODERM Extra Mince - e-Pansement [Internet]. [cité 8 sept 2018]. Disponible sur: <https://e-pansement.fr/dispositifs/duoderm-extra-mince>
74. Acticoat - e-Pansement [Internet]. [cité 8 sept 2018]. Disponible sur: <https://e-pansement.fr/dispositifs/acticoat>
75. Bargues L, Leclerc T, Donat N, Jault P. Conséquences systémiques des brûlures étendues. *Réanimation.* déc 2009;18(8):687-93.

76. Adjepong M, Agbenorku P, Brown P, Oduro I. The role of antioxidant micronutrients in the rate of recovery of burn patients: a systematic review. *Burns Trauma* [Internet]. 3 août 2016;4. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4971700/>
77. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient - McClave - 2016 - *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 13 sept 2018]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1177/0148607115621863>
78. Muller MJ, Herndon DN. The challenge of burns. *The Lancet*. 22 janv 1994;343(8891):216-20.
79. Dhennin C. Traitement local des brûlures. [Httpwwwem-Premiumcomdocelecuniv-Lyon1frdatareviews036981140050000201002747](http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/data/reviews/036981140050000201002747) [Internet]. 28 mai 2008 [cité 1 févr 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/article/163949/resultatrecherche/1>
80. Pr F.Brayer, Dr d. Vouliame, H. Bencharaa, R. Akkal, E. Laniel. Protocole pansement. Centre des Brûlés de Lyon Pierre Colson, Hospices Civils de Lyon; 2017.
81. Ziegler B, Hirche C, Horter J, Kiefer J, Grützner PA, Kremer T, et al. In view of standardization Part 2: Management of challenges in the initial treatment of burn patients in Burn Centers in Germany, Austria and Switzerland. *Burns J Int Soc Burn Inj*. mars 2017;43(2):318-25.
82. Honari S. Topical therapies and antimicrobials in the management of burn wounds. *Crit Care Nurs Clin North Am*. mars 2004;16(1):1-11.
83. Guibert M, Chaouat M, Boccara D, Marco O, Lavocat R, Alameri O, et al. Effet paradoxal du type d'excision sur la prise et le délai de cicatrisation des greffes expansées pour le traitement des brûlures aiguës: a propos de 1129 cas. *Ann Burns Fire Disasters*. 30 juin 2016;29(2):130-4.
84. Casanova D, Voinchet V, Berret M, Magalon G. Brûlures : prise en charge et indications thérapeutiques. :12.
85. Brychta P. European practice guidelines for burn care: Minimum level of burn care provision in Europe. In: Jeschke MG, Kamolz L-P, Sjöberg F, Wolf SE, éditeurs. *Handbook of Burns* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2012 [cité 1 sept 2018]. p. 97-102. Disponible sur: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-7091-0348-7\\_6](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-7091-0348-7_6)
86. Kumar N. *Management of Burns*. 2004;7.
87. Société Française et Francophone des Plaies et Cicatrisations. Les brûlures [Internet]. [cité 2 sept 2018]. Disponible sur: <http://www.sffpc.org/index.php>

88. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns J Int Soc Burn Inj.* mars 2007;33(2):139-48.
89. Garner JP, Heppell PSJ. Cerium nitrate in the management of burns. *Burns J Int Soc Burn Inj.* août 2005;31(5):539-47.
90. Dai T, Huang Y-Y, Sharma SK, Hashmi JT, Kurup DB, Hamblin MR. Topical Antimicrobials for Burn Wound Infections. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 1 juin 2010;5(2):124-51.
91. Heyneman A, Hoeksema H, Vandekerckhove D, Pirayesh A, Monstrey S. The role of silver sulphadiazine in the conservative treatment of partial thickness burn wounds: A systematic review. *Burns J Int Soc Burn Inj.* nov 2016;42(7):1377-86.
92. Silverstein P, Heimbach D, Meites H, Latenser B, Mazingo D, Mullins F, et al. An open, parallel, randomized, comparative, multicenter study to evaluate the cost-effectiveness, performance, tolerance, and safety of a silver-containing soft silicone foam dressing (intervention) vs silver sulfadiazine cream. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc.* déc 2011;32(6):617-26.
93. Antiseptics for Burns [Internet]. [cité 11 sept 2018]. Disponible sur: /CD011821/WOUNDS\_antiseptics-burns
94. Barajas-Nava LA, López-Alcalde J, Roqué i Figuls M, Solà I, Bonfill Cosp X. Antibiotic prophylaxis for preventing burn wound infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 6 juin 2013;(6):CD008738.
95. Marx DE, Barillo DJ. Silver in medicine: The basic science. *Burns.* déc 2014;40, Supplement 1:S9-18.
96. Vinsonneau C, Benyamina M. Prise en charge initiale du grand brûlé. *Réanimation.* déc 2009;18(8):679-86.
97. All. Les greffes cutanées en chirurgie et traitement des plaies [Internet]. [cité 9 sept 2018]. Disponible sur: <http://www.cicatrisation.info/fr/methodes-therapeutiques/aspects-chirurgicaux/greffe-cutanee.html>
98. Hermans MHE. Porcine xenografts vs. (cryopreserved) allografts in the management of partial thickness burns: is there a clinical difference? *Burns J Int Soc Burn Inj.* mai 2014;40(3):408-15.
99. Auxenfans C, Menet V, Catherine Z, Shipkov H, Lacroix P, Bertin-Maghit M, et al. Cultured autologous keratinocytes in the treatment of large and deep burns: a retrospective study over 15 years. *Burns J Int Soc Burn Inj.* févr 2015;41(1):71-9.

100. All. Le pansement dans la médecine moderne : prescriptions et innovations [Internet]. [cité 10 sept 2018]. Disponible sur: <http://www.cicatrisation.info/fr/methodes-therapeutiques/le-pansement/choix-et-prescription.html>
101. Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, Trompier F, et al. Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* févr 2010;18(1):50-8.
102. Ezure T, Amano S. Increased subcutaneous adipose tissue impairs dermal function in diet-induced obese mice. *Exp Dermatol.* oct 2010;19(10):878-82.
103. Navsaria HA, Ojeh NO, Moiemmen N, Griffiths MA, Frame JD. Reepithelialization of a full-thickness burn from stem cells of hair follicles micrografted into a tissue-engineered dermal template (Integra). *Plast Reconstr Surg.* mars 2004;113(3):978-81.
104. Rochet JM, Hareb F. Brûlure et rééducation. [Httpwwwem-Premiumcomdocelecuniv-Lyon1frdatarevues036981140050000201002784](http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/data/revues/036981140050000201002784) [Internet]. 28 mai 2008 [cité 4 févr 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/article/163956>
105. Centre des brûlés de Lyon Pierre Colson | Hospices Civils de Lyon [Internet]. [cité 11 sept 2018]. Disponible sur: <http://www.chu-lyon.fr/fr/centre-des-brules-de-lyon-pierre-colson>
106. FRIPHARM - FRIPHARM [Internet]. [cité 12 sept 2018]. Disponible sur: [https://clarolineconnect.univ-lyon1.fr/icap\\_website/view/1538](https://clarolineconnect.univ-lyon1.fr/icap_website/view/1538)
107. Bonnes pratiques de préparation - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: [https://www.anism.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-preparation/\(offset\)/5](https://www.anism.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-preparation/(offset)/5)
108. Sautou V, Société française de pharmacie clinique, Groupe d'évaluation et de recherche sur la protection en atmosphère contrôlée. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. Partie 1, Partie 1., Clermont-Ferrand]; [Pau: SFCP ; GERPA; 2013.
109. Fox C. Silver sulfadiazine used in the treatment of burns [Internet]. US3761590A, 1973 [cité 1 sept 2018]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US3761590/en>
110. Fox CL, Modak SM. Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 1974;5(6):582-8.

111. Handbook of Chemistry and Physics : Soil Science [Internet]. [cité 1 sept 2018]. Disponible sur: [https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1951/03000/Handbook\\_of\\_Chemistry\\_and\\_Physics.18.aspx](https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1951/03000/Handbook_of_Chemistry_and_Physics.18.aspx)
112. USP Monographs: Silver Sulfadiazine [Internet]. [cité 25 sept 2018]. Disponible sur: [http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_m78960.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m78960.html)
113. BACTRAZINE\* CREAM [Internet]. [cité 1 sept 2018]. Disponible sur: <http://home.intekom.com/pharm/smith-ne/bactrazn.html>
114. Résumé des Caractéristiques du Produit Flammazine, crème, 1% sulfadiazine argentique [Internet]. [cité 11 sept 2018]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0291812.htm>
115. Russell AD, Hugo WB. Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem.* 1994;31:351-70.
116. Slawson RM, Lee H, Trevors JT. Bacterial interactions with silver. *Biol Met.* 1990;3(3-4):151-4.
117. Lansdown ABG. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care.* avr 2002;11(4):125-30.
118. Warriner R, Burrell R. Infection and the chronic wound: a focus on silver. *Adv Skin Wound Care.* oct 2005;18 Suppl 1:2-12.
119. Résumé des Caractéristiques du Produit [Internet]. [cité 1 sept 2018]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0291812.htm>
120. Finley PJ, Norton R, Austin C, Mitchell A, Zank S, Durham P. Unprecedented Silver Resistance in Clinically Isolated Enterobacteriaceae: Major Implications for Burn and Wound Management. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2015;59(8):4734-41.
121. Jr CLF, Modak SM. Antibacterial composition comprising silver sulfadiazine and sodium piperacillin [Internet]. US4535078A, 1985 [cité 11 sept 2018]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US4535078/en>
122. Fraser JF, Cuttle L, Kempf M, Kimble RM. Cytotoxicity of topical antimicrobial agents used in burn wounds in Australasia. *ANZ J Surg.* mars 2004;74(3):139-42.
123. McCauley RL, Linares HA, Pelligrini V, Herndon DN, Robson MC, Heggors JP. In vitro toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts. *J Surg Res.* mars 1989;46(3):267-74.

124. Cooper ML, Laxer JA, Hansbrough JF. The cytotoxic effects of commonly used topical antimicrobial agents on human fibroblasts and keratinocytes. *J Trauma*. juin 1991;31(6):775-82; discussion 782-784.
125. L. McCauley R, Li Y, Poole B, J. Evans M, Robson M, P. Heggers J, et al. Differential Inhibition of human based keratinocyte growth to silver sulfadiazine and mafenid acetate. *J Surg Res*. 1 avr 1992;52:276-85.
126. Smoot EC, Kucan JO, Roth A, Mody N, Debs N. In vitro toxicity testing for antibacterials against human keratinocytes. *Plast Reconstr Surg*. mai 1991;87(5):917-24.
127. Lee A-RC, Moon HK. Effect of topically applied silver sulfadiazine on fibroblast cell proliferation and biomechanical properties of the wound. *Arch Pharm Res*. 1 oct 2003;26(10):855-60.
128. Zapata-Sirvent RL, Hansbrough JF. Cytotoxicity to human leukocytes by topical antimicrobial agents used for burn care. *J Burn Care Rehabil*. avr 1993;14(2 Pt 1):132-40.
129. Qian L-W, Fourcaudot AB, Leung KP. Silver Sulfadiazine Retards Wound Healing and Increases Hypertrophic Scarring in a Rabbit Ear Excisional Wound Model. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc*. févr 2017;38(1):e418-22.
130. Cho Lee A-R, Leem H, Lee J, Park KC. Reversal of silver sulfadiazine-impaired wound healing by epidermal growth factor. *Biomaterials*. août 2005;26(22):4670-6.
131. Fu PP, Xia Q, Boudreau MD, Howard PC, Tolleson WH, Wamer WG. Physiological role of retinyl palmitate in the skin. *Vitam Horm*. 2007;75:223-56.
132. European Pharmacopoeia Online 9.2 [Internet]. [cité 3 févr 2017]. Disponible sur: <http://online6.edqm.eu.docelec.univ-lyon1.fr/ep902/mobile/#documentPage>
133. Advanced Nutrition Human Metabolism by Jack Smith Sareen Gropper - AbeBooks [Internet]. [cité 1 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.abebooks.com/book-search/title/advanced-nutrition-human-metabolism/author/jack-smith-sareen-gropper/>
134. introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie - Recherche Google [Internet]. [cité 26 déc 2016]. Disponible sur: [https://www.google.fr/webhp?sourceid=chrome-instant&rlz=1C1CHFX\\_frFR535FR535&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=introduction%20%C3%A0%20la%20dermopharmacie%20et%20%C3%A0%20la%20cosm%C3%A9tologie](https://www.google.fr/webhp?sourceid=chrome-instant&rlz=1C1CHFX_frFR535FR535&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=introduction%20%C3%A0%20la%20dermopharmacie%20et%20%C3%A0%20la%20cosm%C3%A9tologie)

135. Berbis P. Rétinoïdes : mécanismes d'action. [Httpwwwem-Premiumcomdocelecuniv-Lyon1frdatarevues01519638v137sS3S0151963810700363](http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/data/revues/01519638v137sS3S0151963810700363) [Internet]. 4 janv 2011 [cité 3 févr 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com.docelec.univ-lyon1.fr/article/278454/resultatrecherche/5>
136. Burgess C. Topical vitamins. *J Drugs Dermatol JDD*. juill 2008;7(7 Suppl):s2-6.
137. Berbis P. Rétinoïdes. *EMC - Dermatol*. janv 2009;4(2):1-16.
138. Kim H-J, Bogdan NJ, D'Agostaro LJ, Gold LI, Bryce GF. Effect of Topical Retinoic Acids on the Levels of Collagen mRNA During the Repair of UVB-Induced Dermal Damage in the Hairless Mouse and the Possible Role of TGF- $\beta$  as a Mediator. *J Invest Dermatol*. 1 mars 1992;98(3):359-63.
139. Rolewski SL. Clinical review: topical retinoids. *Dermatol Nurs*. oct 2003;15(5):447-50, 459-65.
140. Rai K, Courtemanche AD. Vitamin A assay in burned patients. *J Trauma*. mai 1975;15(5):419-24.
141. Aida T, Murata J, Asano G, Kanda Y, Yoshino Y. Effects of polypropenoic acid on thermal injury. *Br J Exp Pathol*. juin 1987;68(3):351-8.
142. Unsworth AJ, Flora GD, Sasikumar P, Bye AP, Sage T, Kriek N, et al. RXR Ligands Negatively Regulate Thrombosis and Hemostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(5):812-22.
143. Yuen DE, Stratford AF. Vitamin A activation of transforming growth factor-beta1 enhances porcine ileum wound healing in vitro. *Pediatr Res*. juin 2004;55(6):935-9.
144. Varani J, Warner RL, Gharaee-Kermani M, Phan SH, Kang S, Chung JH, et al. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol*. mars 2000;114(3):480-6.
145. Wicke C, Halliday B, Allen D, Roche NS, Scheuenstuhl H, Spencer MM, et al. Effects of steroids and retinoids on wound healing. *Arch Surg Chic Ill* 1960. nov 2000;135(11):1265-70.
146. Dematte MF, Gemperli R, Salles AG, Dolhnikoff M, Lanças T, Saldiva PHN, et al. Mechanical evaluation of the resistance and elastance of post-burn scars after topical treatment with tretinoin. *Clin Sao Paulo Braz*. 2011;66(11):1949-54.
147. Viera MH, Amini S, Valins W, Berman B. Innovative Therapies in the Treatment of Keloids and Hypertrophic Scars. *J Clin Aesthetic Dermatol*. mai 2010;3(5):20-6.

148. Rittié L, Varani J, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Retinoid-induced epidermal hyperplasia is mediated by epidermal growth factor receptor activation via specific induction of its ligands heparin-binding EGF and amphiregulin in human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* avr 2006;126(4):732-9.
149. Landrier J-F. Vitamine E et physiologie du tissu adipeux. *Ol Corps Gras Lipides.* mars 2011;18(2):83-7.
150. Nachbar F, Korting HC. The role of vitamin E in normal and damaged skin. *J Mol Med Berl Ger.* janv 1995;73(1):7-17.
151. Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J.* mai 2014;14(2):e157-65.
152. Traber MG, Kayden HJ. Tocopherol distribution and intracellular localization in human adipose tissue. *Am J Clin Nutr.* sept 1987;46(3):488-95.
153. Traber MG, Leonard SW, Traber DL, Traber LD, Gallagher J, Bobe G, et al.  $\alpha$ -Tocopherol adipose tissue stores are depleted after burn injury in pediatric patients. *Am J Clin Nutr.* déc 2010;92(6):1378-84.
154. Traber MG. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:347-62.
155. Hobson R. Vitamin E and wound healing: an evidence-based review. *Int Wound J.* juin 2016;13(3):331-5.
156. Bowry VW, Ingold KU, Stocker R. Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem J.* 1 déc 1992;288(Pt 2):341-4.
157. Pierpaoli E, Cirioni O, Barucca A, Orlando F, Silvestri C, Giacometti A, et al. Vitamin E supplementation in old mice induces antimicrobial activity and improves the efficacy of daptomycin in an animal model of wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* sept 2011;66(9):2184-5.
158. Mawang CI, Lim YY, Ong KS, Muhamad A, Lee SM. Identification of  $\alpha$ -tocopherol as a bioactive component of *Dicranopteris linearis* with disrupting property against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* nov 2017;123(5):1148-59.
159. Mingjian Z, Qifang W, Lanxing G, Hong J, Zongyin W. Comparative observation of the changes in serum lipid peroxides influenced by the supplementation of vitamin E in burn patients and healthy controls. *Burns.* 1 févr 1992;18(1):19-21.
160. Houwing R, Overgoor M, Kon M, Jansen G, van Asbeck BS, Haalboom JR. Pressure-induced skin lesions in pigs: reperfusion injury and the effects of vitamin E. *J Wound Care.* janv 2000;9(1):36-40.

161. Musalmah M, Fairuz AH, Gapor MT, Ngah WZW. Effect of vitamin E on plasma malondialdehyde, antioxidant enzyme levels and the rates of wound closures during wound healing in normal and diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2002;11 Suppl 7:S448-451.
162. Gottschlich M. Fat-Soluble Vitamins and Wound Healing. In 2006. p. 149-71.
163. Nguyen TT, Cox CS, Traber DL, Gasser H, Redl H, Schlag G, et al. Free radical activity and loss of plasma antioxidants, vitamin E, and sulfhydryl groups in patients with burns: the 1993 Moyer Award. *J Burn Care Rehabil.* déc 1993;14(6):602-9.
164. Machlin LJ, Filipski R, Nelson J, Horn LR, Brin M. Effects of a prolonged vitamin E deficiency in the rat. *J Nutr.* juill 1977;107(7):1200-8.
165. Naziroğlu M, Kökçam I, Yılmaz S. Beneficial effects of intraperitoneally administered alpha-tocopheryl acetate on the levels of lipid peroxide and activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in skin, blood and liver of thermally injured guinea pigs. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* févr 2003;16(1):36-45.
166. Wu D, Meydani M, Beharka AA, Serafini M, Martin KR, Meydani SN. In vitro supplementation with different tocopherol homologues can affect the function of immune cells in old mice. *Free Radic Biol Med.* 15 févr 2000;28(4):643-51.
167. Vitamin E activates CRABP-II gene expression in cultured human fibroblasts, role of protein kinase C - Gimeno - 2004 - FEBS Letters - Wiley Online Library [Internet]. [cité 14 sept 2018]. Disponible sur: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2004.05.073>
168. De Pascale MC, Bassi AM, Patrone V, Villacorta L, Azzi A, Zingg J-M. Increased expression of transglutaminase-1 and PPARgamma after vitamin E treatment in human keratinocytes. *Arch Biochem Biophys.* 15 mars 2006;447(2):97-106.
169. Zampieri N, Zuin V, Burro R, Ottolenghi A, Camoglio FS. A prospective study in children: Pre- and post-surgery use of vitamin E in surgical incisions. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* sept 2010;63(9):1474-8.
170. Moores J. Vitamin C: a wound healing perspective. *Br J Community Nurs.* déc 2013;Suppl:S6, S8-11.
171. Actifs et additifs en cosmétologie (3e éd.) [Internet]. Librairie Lavoisier. [cité 28 mars 2017]. Disponible sur: <https://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/actifs-et-additifs-en-cosmetologie-3e-ed/martini/descriptif-9782743022624>
172. Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem.* avr 2004;11(8):1041-64.

173. Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol.* janv 1994;102(1):122-4.
174. Pullar JM, Carr AC, Vissers MCM. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients* [Internet]. 12 août 2017 [cité 14 sept 2018];9(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5579659/>
175. Weber SU, Thiele JJ, Cross CE, Packer L. Vitamin C, uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure. *J Invest Dermatol.* déc 1999;113(6):1128-32.
176. Nusgens BV, Humbert P, Rougier A, Colige AC, Haftek M, Lambert CA, et al. Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. *J Invest Dermatol.* juin 2001;116(6):853-9.
177. Humbert PG, Haftek M, Creidi P, Lapière C, Nusgens B, Richard A, et al. Topical ascorbic acid on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: double-blind study vs. placebo. *Exp Dermatol.* juin 2003;12(3):237-44.
178. Lin J-Y, Selim MA, Shea CR, Grichnik JM, Omar MM, Monteiro-Riviere NA, et al. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J Am Acad Dermatol.* juin 2003;48(6):866-74.
179. Shindo Y, Witt E, Han D, Packer L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol.* avr 1994;102(4):470-5.
180. Davidson JM, LuValle PA, Zoia O, Quaglini D, Giro M. Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J Biol Chem.* 3 janv 1997;272(1):345-52.
181. Kameyama K, Sakai C, Kondoh S, Yonemoto K, Nishiyama S, Tagawa M, et al. Inhibitory effect of magnesium l-ascorbyl-2-phosphate (VC-PMG) on melanogenesis in vitro and in vivo. *J Am Acad Dermatol.* 1 janv 1996;34(1):29-33.
182. Pasonen-Seppänen S, Suhonen TM, Kirjavainen M, Suihko E, Urtti A, Miettinen M, et al. Vitamin C enhances differentiation of a continuous keratinocyte cell line (REK) into epidermis with normal stratum corneum ultrastructure and functional permeability barrier. *Histochem Cell Biol.* oct 2001;116(4):287-97.
183. Marionnet C, Vioux-Chagnoleau C, Pierrard C, Sok J, Asselineau D, Bernerd F. Morphogenesis of dermal-epidermal junction in a model of reconstructed skin: beneficial effects of vitamin C. *Exp Dermatol.* août 2006;15(8):625-33.

184. Tebbe B, Wu S, Geilen CC, Eberle J, Kodelja V, Orfanos CE. L-ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1 $\alpha$  and IL-6 in cultured human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol.* mars 1997;108(3):302-6.
185. Epigénétique [Internet]. Inserm. [cité 14 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/epigenetique>
186. Graves C, Saffle J, Cochran A. Actual burn nutrition care practices: an update. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc.* févr 2009;30(1):77-82.
187. Barbosa E, Faintuch J, Machado Moreira EA, Gonçalves da Silva VR, Lopes Pereima MJ, Martins Fagundes RL, et al. Supplementation of vitamin E, vitamin C, and zinc attenuates oxidative stress in burned children: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc.* oct 2009;30(5):859-66.
188. Yun IS, Yoo H-S, Kim YO, Rah DK. Improved scar appearance with combined use of silicone gel and vitamin C for Asian patients: a comparative case series. *Aesthetic Plast Surg.* déc 2013;37(6):1176-81.
189. Sarpooshi HR, Mortazavi F, Vaheb M, Tabarayee Y. The Effects of Topical Vitamin C Solution on Burn Wounds Granulation: A Randomized Clinical Trial. *J Biomed [Internet].* 2016 [cité 15 sept 2018];1(4). Disponible sur: <http://jbiomedicine.com/en/articles/8301.html>
190. Pielesz A, Biniás D, Bobiński R, Sarna E, Paluch J, Waksmańska W. The role of topically applied l-ascorbic acid in ex-vivo examination of burn-injured human skin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 5 oct 2017;185:279-85.
191. Deritter E. Vitamins in Pharmaceutical Formulations. *J Pharm Sci.* oct 1982;71(10):1073-96.
192. Gianeti MD, Gaspar LR, Bueno de Camargo Júnior F, Berardo Gonçalves Maia Campos PM. Benefits of Combinations of Vitamin A, C and E Derivatives in the Stability of Cosmetic Formulations. *Molecules.* 22 févr 2012;17(2):2219-30.
193. Pharmacopée européenne 9e Edition | EDQM - Direction européenne de la qualité du médicament [Internet]. [cité 1 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.edqm.eu/fr/9e-edition-de-pharmacopee-europeenne>
194. Archive ouverte HAL - Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) - Final version of the Opinion on Vitamin A (retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate) in cosmetic products [Internet]. [cité 17 sept 2018]. Disponible sur: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01500113>

195. Ramos-e-Silva M, Celem LR, Ramos-e-Silva S, Fucci-da-Costa AP. Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. *Clin Dermatol*. 1 nov 2013;31(6):750-8.
196. Boehnlein J, Sakr A, Lichtin JL, Bronaugh RL. Characterization of esterase and alcohol dehydrogenase activity in skin. Metabolism of retinyl palmitate to retinol (vitamin A) during percutaneous absorption. *Pharm Res*. août 1994;11(8):1155-9.
197. Yan J, Wamer WG, Howard PC, Boudreau MD, Fu PP. Levels of retinyl palmitate and retinol in the stratum corneum, epidermis, and dermis of female SKH-1 mice topically treated with retinyl palmitate. *Toxicol Ind Health*. mai 2006;22(4):181-91.
198. Recherche : RETINOL (VIT A) - VIDAL eVIDAL [Internet]. [cité 17 sept 2018]. Disponible sur: [https://evidal-vidal-fr.docelec.univ-lyon1.fr/recherche.html?q=RETINOL%20\(VIT%20A\)](https://evidal-vidal-fr.docelec.univ-lyon1.fr/recherche.html?q=RETINOL%20(VIT%20A))
199. Manela-Azulay M, Bagatin E. Cosmeceuticals vitamins. *Clin Dermatol*. sept 2009;27(5):469-74.
200. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin Interv Aging*. déc 2006;1(4):327-48.
201. Tolleson WH, Cherng S-H, Xia Q, Boudreau M, Yin JJ, Wamer WG, et al. Photodecomposition and phototoxicity of natural retinoids. *Int J Environ Res Public Health*. avr 2005;2(1):147-55.
202. Carlotti ME, Rossatto V, Gallarate M. Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation. *Int J Pharm*. 20 juin 2002;240(1-2):85-94.
203. Guaratini T, Gianeti MD, Campos PMBGM. Stability of cosmetic formulations containing esters of vitamins E and A: chemical and physical aspects. *Int J Pharm*. 11 déc 2006;327(1-2):12-6.
204. Nabi Z, Tavakkol A, Dobke M, G Polefka T. Bioconversion of Vitamin E Acetate in Human Skin. *Curr Probl Dermatol*. 1 févr 2001;29:175-86.
205. Safety Assessment of Ethers and Esters of Ascorbic Acid as Used in Cosmetics | Cosmetic Ingredient Review [Internet]. [cité 16 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.cir-safety.org/supplementaldoc/safety-assessment-ethers-and-esters-ascorbic-acid-used-cosmetics-0>
206. Marusich WL, Ackerman G, Reese WC, Bauernfeind JC. Relative Activity of D- and DL- $\alpha$ -Tocopheryl Acetate Based on Plasma Levels. *J Anim Sci*. 1 janv 1968;27(1):58-67.

207. Baschong W, Artmann C, Hueglin D, Roeding J. Direct evidence for bioconversion of vitamin E acetate into vitamin E: an ex vivo study in viable human skin. *J Cosmet Sci.* juin 2001;52(3):155-61.
208. Kuriyama K, Shimizu T, Horiguchi T, Watabe M, Abe Y. Vitamin E ointment at high dose levels suppresses contact dermatitis in rats by stabilizing keratinocytes. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* oct 2002;51(10):483-9.
209. Thiele JJ, Hsieh SN, Ekanayake-Mudiyanselage S. Vitamin E: critical review of its current use in cosmetic and clinical dermatology. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al.* juill 2005;31(7 Pt 2):805-13; discussion 813.
210. Baumann LS, Spencer J. The effects of topical vitamin E on the cosmetic appearance of scars. *Dermatol Surg.* avr 1999;25(4):311-4.
211. Palmieri B, Gozzi G, Palmieri G. VITAMIN E ADDED SILICONE GEL SHEETS FOR TREATMENT OF HYPERTROPHIC SCARS AND KELOIDS. *Int J Dermatol.* juill 1995;34(7):506-9.
212. Stanizzi A, Bottoni M, Torresetti M, Campanati A, Di Benedetto G. Topical use of  $\alpha$ -tocopherol acetate in delayed wound healing. *Int Wound J.* 1 déc 2015;12(6):746-7.
213. VITAMIN E-ACETATE CARE [Internet]. VITAMIN E-ACETATE CARE. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.carecreations.basf.com/product-formulations/products/products-detail/VITAMIN%20E-ACETATE%20CARE/30499500>
214. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, Association AP, Press P. Handbook of pharmaceutical excipients. Vol. 6. Pharmaceutical press London; 2009.
215. Segall AI, Moyano MA. Stability of vitamin C derivatives in topical formulations containing lipoic acid, vitamins A and E. *Int J Cosmet Sci.* déc 2008;30(6):453-8.
216. Remington JP, Gennaro AR. Remington's pharmaceutical sciences. Easton, Pa.: Mack Pub. Co.; 1990.
217. Stamford NPJ. Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. *J Cosmet Dermatol.* déc 2012;11(4):310-7.
218. Pinnell SR, Yang H, Omar M, Monteiro-Riviere N, DeBuys HV, Walker LC, et al. Topical L-ascorbic acid: percutaneous absorption studies. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al.* févr 2001;27(2):137-42.
219. Jurkovic P, Sentjurc M, Gasperlin M, Kristl J, Pecar S. Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* juill 2003;56(1):59-66.

220. Austria R, Semenzato A, Bettero A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. *J Pharm Biomed Anal.* mars 1997;15(6):795-801.
221. Spiclin P, Gasperlin M, Kmetec V. Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *Int J Pharm.* 17 juill 2001;222(2):271-9.
222. Noblesse E, Cenizo V, Bouez C, Borel A, Gleyzal C, Peyrol S, et al. Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J Invest Dermatol.* mars 2004;122(3):621-30.
223. Hinsinger J. Les colorations histologiques: colorations de routine et colorations spéciales. :48.
224. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part II. *J Pharm Biomed Anal.* 21 sept 2007;45(1):70-81.
225. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon P-A, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part III. *J Pharm Biomed Anal.* 21 sept 2007;45(1):82-96.
226. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology : ICH [Internet]. [cité 17 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>
227. Stability Testing of New Drug Substances and Products : ICH [Internet]. [cité 23 sept 2018]. Disponible sur: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html>
228. Chan JKC. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol.* févr 2014;22(1):12-32.
229. Maia Campos PMBG, Gianeti MD, Camargo FB, Gaspar LR. Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: stability studies and in vivo efficacy. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* nov 2012;82(3):580-6.
230. Maghsoudi H, Monshizadeh S, Mesgari M. A Comparative Study of the Burn Wound Healing Properties of Saline-Soaked Dressing and Silver Sulfadiazine in Rats. *Indian J Surg.* janv 2011;73(1):24-7.
231. Ferguson TI, Emery S, Price-Davies R, Cosslett AG. A review of stability issues associated with vitamins in parenteral nutrition. *E-SPEN J.* avr 2014;9(2):e49-53.

# Annexe 1 : Protocole pansement du Centre des Brûlés de Lyon

Pierre Colson

 Hôpitaux de Lyon  Groupement Hospitalier Centre	<b>PROTOCOLE PANSEMENT</b> <b>Centre des Brûlés de Lyon Pierre Colson</b>		
	 Hospices Civils de Lyon	 voire santé, notre engagement	Version n° 1.1 – juillet 2017
<b>Rédacteurs</b> : Pr F. Braye, Dr D. Voulliaume, H. Bencharaa , R. Akkal, E. Laniel	<b>Relecture par</b> : Pr F. Braye, Dr D. Voulliaume, J.C. Dumes		
<b>Destinataires</b> : équipes médicale et paramédicale	<b>Validation par</b> : Pr F. Braye, Dr D. Voulliaume		

## SOMMAIRE

<b>Principes généraux</b>	<b>2</b>
<b>Prise en charge initiale</b>	<b>3</b>
<b>Visage</b>	<b>4</b>
<b>Premier pansement post-greffe</b>	<b>5</b>
<b>Zone de prélèvement</b>	<b>6</b>
<b>Dermes artificiels</b>	<b>7</b>
<b>Culture d'épiderme</b>	<b>8</b>

## LES PRINCIPES GENERAUX

**Références :** guidelines de l'EBA et de l'ABA

Ces référentiels soulignent que l'aspect le plus important de la prise en charge des brûlures est le nettoyage afin d'éviter la formation d'un biofilm.

Le pansement est la principale mesure d'isolement pour une plaie ; il doit être suffisamment épais pour éviter de s'imbiber en surface.

**Fréquence :** pansement à renouveler toutes les 24 heures.

**Le protocole comporte :**

- Lavage avec Bétadine scrub® ou Hibiscrub® savon (en cas d'allergie avérée à l'iode) et sérum physiologique.
- Si le patient se douche seul ou est douché par l'aide-soignante, il convient de compléter la douche Bétadine par une asepsie à l'aide de compresses stériles imbibées de Bétadine scrub et de sérum physiologique.
- Découper les peaux, phlyctènes si nécessaire.
- Effectuer un savonnage simple, si une détersion appuyée est prescrite, l'analgésie sera adaptée le lendemain.
- Application de compresses imbibées de Flammazine® en évitant de réaliser des circulaires car risque de compression notamment pour les membres.
- Compresses
- Bandes (Velpau® ou Nylex®) à appliquer en épi afin d'éviter les constriction qui peuvent être source d'ischémie distale.
- Pour les pansements de mains brûlées profondément et œdématiées : appliquer la Jelonet® sur les brûlures puis plonger la main dans un sac stérile contenant de la Flammazine® : c'est la méthode du pansement main sac.

NB : surélever MS et MI pour diminuer l'œdème et favoriser le retour veineux.

**Suivi**

- Evaluation de la douleur pendant le geste pour adaptation éventuelle du traitement antalgique
- Réévaluation à 48heures par un chirurgien.

## PRISE EN CHARGE INITIALE

*Ce protocole pansement s'applique à la fois à la phase de déhocage et post déhocage*

**Fréquence** : pansement à renouveler toutes les 24 heures.

### **Personnel nécessaire à la réalisation du pansement :**

- Si SCB (Surface Corporelle Brûlée) inférieure à 50 % :
  - o 2 IDE
  - o 1 ASD, dépose le matériel sur les chariots de pansement, complète au besoin, aide au service du pansement et aux mobilisations.
- Si SCB supérieure à 50 % :
  - o 3 IDE, 2 IDE pour le pansement et 1 IDE pour le remplissage et surveillance
  - o 1 ASD, dépose le matériel sur les chariots de pansement, complète au besoin, aide au service du pansement et aux mobilisations.

### **Préparation des chariots :**

- 1 chariot pour la phase de nettoyage des plaies :
  - o 2 cupules → 1 remplie de Bétadine scrub diluée au 1/3 avec du sérum physiologique.  
→ 1 contenant du sérum physiologique.
  - o Compresse de lavage
- 1 chariot pour la phase de réfection du pansement
  - o Jelonet® ou compresses de Flammazine®
  - o Compresse sèche
  - o Les bandes non stériles seront posées dans un 2eme temps ou à part afin d'éviter le contact avec le matériel stérile.

### **Technique :**

- o Evaluation de la douleur pour adaptation éventuelle du traitement antalgique
- Le patient est installé sur 3 champs stériles.
- Les IDE sont habillés d'une charlotte, un masque et un tablier pour débiter le pansement.
- 1 IDE procède au découpage d'un éventuel pansement avec des gants non stérile pendant que la 2eme IDE avec des gants stériles prépare les compresses de Flammazine®
- Les IDE mettent un sarrau stérile ainsi que des gants stériles pour terminer l'ablation du pansement au plus près des plaies
- Le 1er champ est ôté et les gants stériles changés.
- Le patient est pesé et mesuré
- Les 2 IDE procèdent au lavage des plaies, percent les phlyctènes.
- Le 2<sup>ème</sup> champ est ôté et les gants stériles changés.
- Les 2 IDE procèdent au recouvrement des plaies en appliquant les compresses imbibées de Flammazine®
- Recouvrir de compresses sèches en plusieurs épaisseurs.
- Si brûlure au visage appliquer de la Jelonet® imprégnées de Fucidine® (cf. protocole visage)
- Terminer par les bandes en prenant soin d'éviter les constrictions qui peuvent être source d'ischémie distale.
- Installer le patient en surélevant les MS et MI pour diminuer l'œdème.

## VISAGE

**Fréquence** : pansement à renouveler toutes les 24 heures.

**Le protocole comporte :**

- Mise en place de bouchons d'oreille.
- Lavage avec Bétadine scrub® ou Hibiscrub® savon (en cas d'allergie avérée à l'iode) et sérum physiologique.
- Pansement Fucidine® pommade.
- Pour la région péri oculaire, application de pommade de vitamine A® dans l'attente de prescription de par les ophtalmologues,

## PREMIER PANSEMENT POST-GREFFE

**Principes :** les objectifs du pansement sur les zones greffées sont d'immobiliser, de protéger contre les traumatismes et la surinfection.

**Fréquence :** le premier pansement est réalisé autour du 5eme jour, puis toutes les 48h, sur prescription du chirurgien.

**Personnel :**

2 IDE

1 ASD, *dépose le matériel sur les chariots de pansement, complète au besoin et aide aux mobilisations.*

**Préparation des chariots :**

- 1 chariot pour la phase de nettoyage des plaies :
  - o 2 cupules → 1 remplie de Bétadine scrub diluée au 1/3 avec du sérum physiologique.  
→ 1 contenant du sérum physiologique.
  - o Compresses de lavage
- 1 chariot pour la phase de réfection du pansement
  - o Jelonet®
  - o Ôte agrafes
  - o Compresses sèches
  - o Les bandes non stériles seront posées dans un 2eme temps ou à part afin d'éviter le contact avec le matériel stérile.

**Technique :**

- Le patient est installé après la toilette sur un drap propre recouvert de 3 champs de lit stériles.
- Les IDE sont habillés d'une charlotte, un masque et un tablier pour débiter le pansement.
- 1 IDE procède au découpage du pansement avec des gants non stériles pendant que la 2eme IDE avec des gants stériles prépare les Jelonet®.
- Les IDE mettent un sarrau stérile ainsi que des gants stériles pour terminer l'ablation du pansement au plus près des plaies
- Le premier champ est ôté et les gants stériles changés. Le patient est pesé.
- Le patient est pesé
- Le chirurgien ± médecin anesthésiste-réanimateur sont appelés.
- Les 2 IDE procèdent au lavage des plaies.
- Les IDE procèdent à l'ablation des agrafes selon prescription chirurgicale.
- Le second champ est ôté et les gants stériles changés.
- Les 2 IDE procèdent au recouvrement des plaies avec de la Jelonet® ± topiques sur prescription chirurgicale.
- Recouvrir de compresses sèches en plusieurs épaisseurs.
- Terminer par les bandes.
- Mise en place de compressifs sur avis chirurgical.

## ZONE DE PRELEVEMENT

**Principe :** Le pansement de contact est appliqué stérilement au bloc opératoire. Il s'agit le plus souvent d'Algostérial®. Dans tous les cas, le pansement se comporte comme une croûte sur une écorchure : le décoller est douloureux, fait saigner et retarde la cicatrisation.

Il faut attendre vers le 15e jour le décollement spontané du pansement de contact.

Il ne faut pas explorer le pansement sauf exception car on trouve très souvent une plaie humide et verdâtre qui peut faire évoquer une infection et pousser à décoller prématurément le pansement, ce qui risque de mettre en péril la cicatrisation.

**Ne pas toucher au pansement sauf pour le renforcer ou s'il se décolle.**

## DERMES ARTIFICIELS

**Principe** : les dermes artificiels visent à servir de guide à la cicatrisation pour obtenir au final un tissu très proche d'un derme humain normal histologiquement, esthétiquement et fonctionnellement.

Il existe deux grandes familles de dermes artificiels :

- Les dermes artificiels en monocouche utilisés en un seul temps opératoire où l'on greffe le même jour le derme et la greffe de peau mince : exemple MATRIDERM®. Pour ce type de derme le protocole de pansement est exactement comparable à celui d'une greffe de peau mince standard. Pour les agrafes, il faut penser à demander au chirurgien avant de les enlever.
- Les dermes artificiels en bicouche utilisés en 2 temps opératoires (INTEGRA®):
  - Greffe du derme puis pansement pendant 3 semaines. Sur ces dermes les soins locaux consistent en :
    - savonnage doux et rinçage sérum physiologique en évitant de mobiliser la plaque dermique par rapport au plan profond ce qui compromet la vascularisation,
    - puis application de Fucidine® pommade sur les jonctions derme-peau normale et sur les agrafages éventuels,
    - compresses sèches sur la silicone,
    - éventuellement immobilisation.
  - Pour la seconde intervention, il s'agit d'une simple greffe de peau mince (confère protocole greffe de peau mince).

Il peut arriver qu'un derme artificiel soit fixé par un bourdonnet cousu de greffe type greffe de peau totale ou par un pansement à pression négative ; conférer prescription chirurgicale.

## CULTURE D'ÉPIDERME

**Principe** : les cultures d'épiderme sont extrêmement fragiles mécaniquement et sensibles à l'infection. Elles se présentent comme des feuillets de gaze agrafés. L'épiderme cultivé se trouve sous la gaze. L'ablation des gazes se fait habituellement au bloc opératoire autour du 7e jour.

Dans l'intervalle il convient de simplement renouveler le pansement en allant jusqu'à la couche de Jelonet® pour vérifier sa propreté.

Si son aspect évoque un problème d'infection, on appliquera, sans savonner, ni mouiller, ni froter, de la pommade Bétadine® plus Colimycine®, ou de la Fucidine® sur la Jelonet® (prescription chirurgicale).

Après l'ablation des gazes, qui se fait habituellement au bloc opératoire, il ne faut pas savonner les cultures d'épiderme car le choc osmotique fait éclater les cellules. On nettoie donc simplement au sérum physiologique sans froter. Puis on applique Jelonet® et un topique antiseptique seulement si nécessaire.

Attention les frottements mécaniques sont proscrits car l'épiderme cultivé met plusieurs semaines à adhérer au lit de la plaie.



## Annexe 2 : Formulaire d'analyse de faisabilité de l'Unité de Préparation et Contrôle du Médicament

Hôpital Edouard Herriot

### NOM DU PRODUIT, FORME, DOSAGE

PHARMACIE HOPITAL E. HERRIOT 69437 LYON CEDEX 03

**PRODUIT FORME GALENIQUE**

**Quantité - Volume (Dosage)**

Voie d'administration

- PREPARATION HOSPITALIERE  
 PREPARATION HOSPITALIERE POUR ESSAI CLINIQUE  
 PREPARATION MAGISTRALE

#### I. CONFORMITE REGLEMENTAIRE

Faisabilité pharmaco-thérapeutique	Commentaires
Intérêt pharmaco-thérapeutique de la préparation : <input type="checkbox"/> Important <input type="checkbox"/> Modéré <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Insuffisant	
Pertinence de la préparation (balance bénéfice / Risque évaluée) : <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Indication thérapeutique	
Posologie	
Dosage	

#### II. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

	Commentaires
Disponibilité de spécialités pharmaceutiques <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Données toxicologiques et cliniques relatives au(x) substance(s) active(s) et excipients de la préparation <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Données sur les voies d'administration <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Données sur la stabilité et sur la formulation	

<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Données sur le contrôle de la substance active et MP <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
<b>III. FAISABILITE TECHNIQUE</b>	
<b>Formulation galénique</b>	<b>Commentaires</b>
Choix des excipients et leur inertie <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Excipients à effet notoire <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Compatibilité physico-chimique de la substance active et excipients <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Formulation galénique validée <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Procédé de fabrication défini et validé <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
<input type="checkbox"/> Préparations stériles : <input type="checkbox"/> A usage parentérale <input type="checkbox"/> Hors usage parentérale <input type="checkbox"/> Préparations non stériles	
<b>Personnel</b>	<b>Commentaires</b>
Personnel qualifié et disponible <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Maîtrise et connaissance du process <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Formation spécifique nécessaire <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Protection du personnel <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Risque personnel <input type="checkbox"/> Important <input type="checkbox"/> Modéré <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Très faible	
<b>Matériel et locaux</b>	<b>Commentaires</b>
Locaux de fabrication, de contrôle, de stockage et de mise en quarantaine disponibles <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Matériel adapté disponible <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Autres contraintes spécifiques sur les locaux et les équipements à prévoir <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Risque vis-à-vis de l'environnement et précautions spécifiques (à préciser) <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	

Circuit des Matières Premières et Articles de Conditionnement		Commentaires				
<b>Matière première (MP)</b>		<b>Principe actif</b>	<b>Excipient 1</b>	<b>Excipient 2</b>	<b>Excipient 3</b>	<b>Excipient 4</b>
Provenance de la MP	Fabricant					
	Distributeur					
MP décrits à la Pharmacopée européenne (PE)		<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA
Fournisseur européen possède un certificat GMP et/ou CEP pour chaque MP fournie		<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA
Fournisseur est un distributeur ou importateur européen possédant un certificat GMP		<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA
Fabricant ou importateur non européen avec certificat GMP et/ou CEP, certificat ASMF ou DMF		<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA
Demande d'un certificat d'analyse au fournisseur		<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA
Non disponibilité des MP en vrac : utilisation des spécialités pharmaceutiques existantes comme source de MP		<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA
MP à Usage Pharmaceutique disponibles chez un ou plusieurs fournisseurs, lesquels		<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/> NA
Articles de Conditionnement (AC)		Commentaires				
AC adaptés à la préparation, à lister <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON						
Matériau décrit à la PE <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON						
Interactions contenu-contenant réalisées ou, le cas échéant, documentées <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON						
Inviolabilité du conditionnement <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON						
Conditions de conservation déterminées et validées <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON						

*N.B : documents et preuves utiles en annexe*

Contrôles et stabilité	Commentaires
Contrôle de la MP <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Contrôle du Produit Fini (PF) <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Mise au point et validation d'une méthode de dosage <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Méthode de dosage adaptée au suivi des stabilités <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Contrôle réalisable sur site <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Contrôle à sous-traiter, à préciser <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Cas particuliers : Si MP apyrogène, contrôle des endotoxines bactériennes à réaliser <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON  Si utilisation d'isotopes stables : Contrôles adéquats prévus : dosage, enrichissement isotopique, toxicité anormale, spectre IR, analyse des schémas de synthèse de la MP <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Etude de stabilité nécessaire <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	

#### IV. ANALYSE DES RISQUES

	Commentaires
Procédures et instructions de fabrication rédigées et approuvées	
Délai de fabrication, contrainte spécifique (urgence...)	
Risque global de la préparation <input type="checkbox"/> Important <input type="checkbox"/> Modéré <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Très faible	

#### V. FAISABILITE ECONOMIQUE

	Commentaires
Evaluation du coût : <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON Prix 1 :                    € Prix 2 :                    € Prix 3 :                    €	

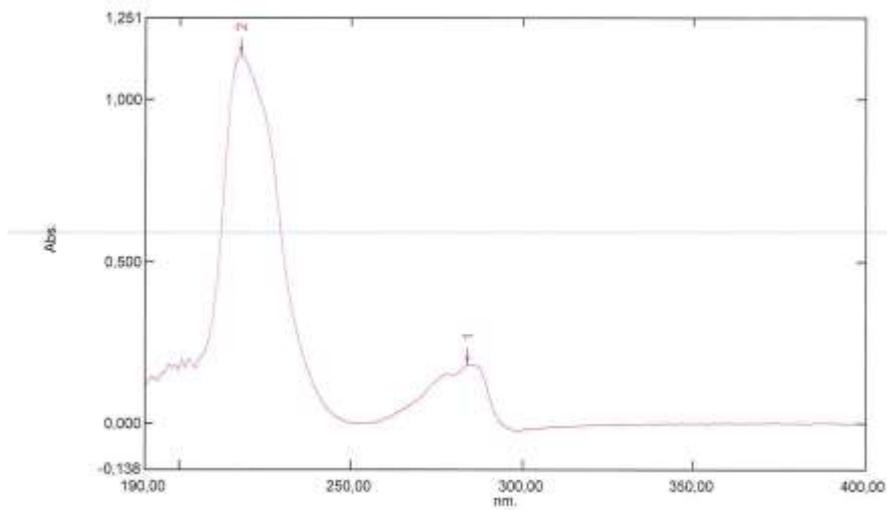
**Autres commentaires utiles :**

Conclusion	Date	Nom du pharmacien et signature

### Annexe 3 : Spectre d'absorption de l'acétate de tocophérol

Spectre Solution de Tocopheril Acetate

05/10/2018  
12:30:57

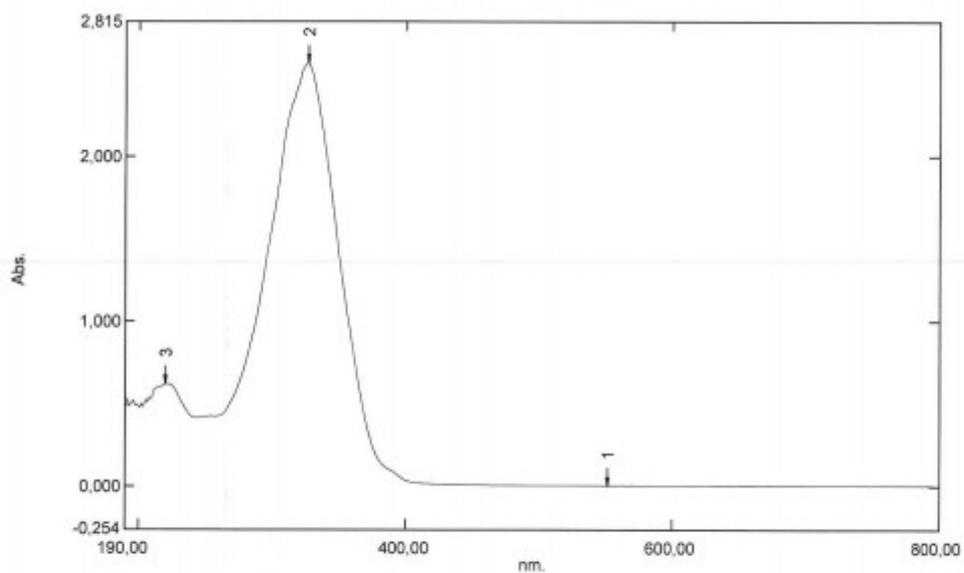


No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	284.00	0.182	
2	●	218.00	1.135	

## Annexe 4 : Spectre d'absorption du palmitate de rétinyle

### Spectre Solution de Rénityl Plamitate

05/10/2018  
12:18:42

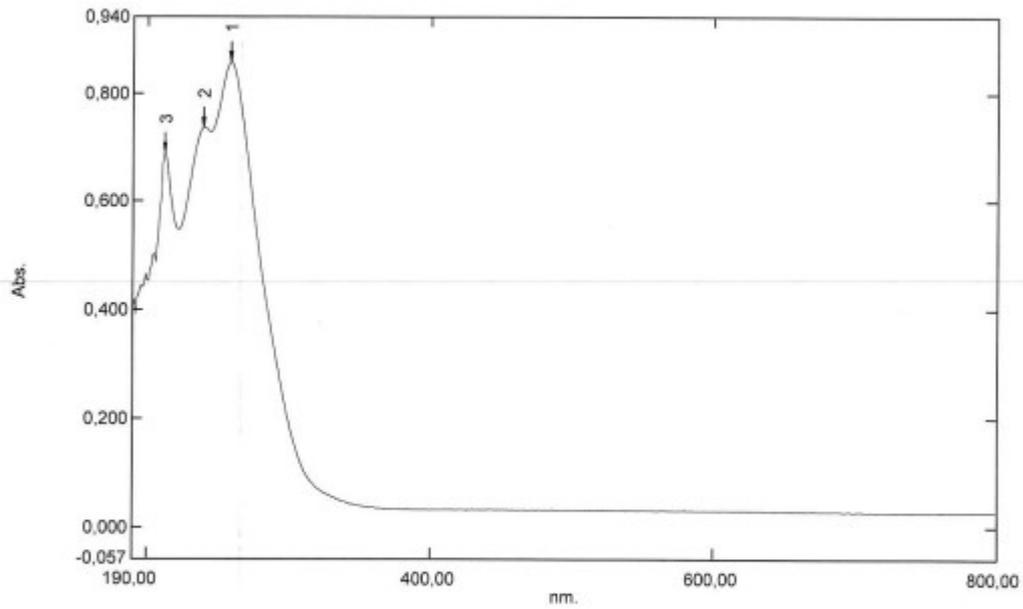


No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	①	552.00	0,004	
2	②	327.00	2,559	
3	③	221.00	0,620	

## Annexe 5 : Spectre d'absorption de la sulfadiazine argentique

### Spectre Solution de Sulfadiazine Argentique

05/10/2018  
12:29:01



No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	⊕	259,00	0,857	
2	⊕	240,00	0,736	
3	⊕	213,00	0,690	

**L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses : ces opinions sont considérées comme propres à leurs acteurs.**

**L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation de méthodes de recherche de similitudes.**

BOURGUE Lucile

**DÉVELOPPEMENT ET ÉTUDE D'EFFICACITÉ *EX-VIVO* D'UNE PRÉPARATION ANTIMICROBIENNE CICATRISANTE POUR LE TRAITEMENT DES BRÛLURES**

Th.D.Pharm., Lyon 1, 2018, 232p.

**RÉSUMÉ**

La Flammazine®, crème à 1 % de sulfadiazine argentique, reste à ce jour en France le traitement de référence dans la prévention locale de l'infection chez le brûlé, malgré les conséquences de sa cytotoxicité sur la qualité cicatricielle. Cette étude avait pour objectifs la mise au point et l'évaluation de l'efficacité d'une préparation topique anti-infectieuse cicatrisante à 1 % de sulfadiazine argentique supplémentée en vitamines. Trois formulations supplémentées en vitamines A, C et E sous forme estérifiées (i.e. palmitate de rétinyle, palmitate d'ascorbyle et acétate d'alpha-tocophérol) ont été mise au point et ont fait l'objet d'une première série d'essais d'efficacité *ex-vivo*. Des explants de peau humaine provenant d'un donneur unique ont été brûlés, répartis en groupes de traitement et maintenus en survie en interface air/liquide. Des méthodes de dosage par chromatographie liquide ont, en parallèle, été développées. Au terme de l'expérimentation, les brûlures traitées par les formulations supplémentées en vitamines présentaient (i) une réépithélisation supérieure aux brûlures traitées par Flammazine® ( $p < 0,05$ ) et (ii) des kératinocytes d'aspect atypique par défaut de coloration cytoplasmique. Les premiers résultats de ce projet de développement pharmaceutique soulignent son potentiel thérapeutique et ont esquissé les axes d'études précliniques nécessaires pour le mener à bien.

**MOTS CLÉS**

Brûlure	Vitamines
Biopharmacie	Palmitate de rétinyle
Histologie	Palmitate d'ascorbyle
Chromatographie Liquide	Acétate d'alpha-tocophérol
Sulfadiazine argentique	

**JURY**

Pr. Fabrice PIROT – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Dr. Damien SALMON – Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier  
Dr Céline AUXENFANS – Praticien Hospitalier  
Dr. Hristo SHIPKOV - Praticien Hospitalier  
Dr Christine PIVOT – Praticien Hospitalier  
Pr. Yoghesvar N. KALIA – Professeur des Universités  
Pr. Valérie SAUTOU – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

**DATE DE SOUTENANCE**

Vendredi 19 octobre 2018

**ADRESSE DE L'AUTEUR**

250, chemin de Gaujas  
84560 MENERBES

