



HAL
open science

Perspectives d'utilisation des flavines en thérapeutique

Jonathan Philippe Ribes

► **To cite this version:**

Jonathan Philippe Ribes. Perspectives d'utilisation des flavines en thérapeutique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03199327

HAL Id: dumas-03199327

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03199327>

Submitted on 15 Apr 2021

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

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

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2021

Thèse N°3

THÈSE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

Jonathan Philippe RIBES

Né le 17 août 1993 à Bordeaux

le 04 septembre 2020

**PERSPECTIVES D'UTILISATION DES FLAVINES EN
THÉRAPEUTIQUE**

Sous la direction du Professeur Isabelle Bestel

Professeur Isabelle Bestel

Professeur Pascale Dufourcq

Docteur Estelle Rascol

Docteur Dario Bassani

Présidente

Membre du jury

Membre du jury

Membre du jury

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020

Thèse N°3

THÈSE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

Jonathan Philippe RIBES

Né le 17 août 1993 à Bordeaux

le 04 septembre 2020

**PERSPECTIVES D'UTILISATION DES FLAVINES EN
THÉRAPEUTIQUE**

Sous la direction du Professeur Isabelle Bestel

Professeur Isabelle Bestel

Professeur Pascale Dufourcq

Docteur Estelle Rascol

Docteur Dario Bassani

Présidente

Membre du jury

Membre du jury

Membre du jury

Remerciements

À Madame le Professeur Isabelle BESTEL qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse et qui a accepté la présidence de ce jury. Pour la confiance que vous me témoignez depuis mon stage de 5^{ème} année de Pharmacie et encore à présent, en Thèse de Chimie mais également pour toute l'aide apportée sur la rédaction de ce manuscrit.

À Madame le Professeur Pascale DUFOURCQ, pour votre pédagogie sur l'ensemble des enseignements dispensés à vos étudiants, au cours de ces années d'études. A Madame le Docteur Estelle RASCOL, pour sa gentillesse et son aide très précieuse afin de mener à bien mes travaux de Thèse de Chimie. A Monsieur le Docteur Dario BASSANI, pour sa patience et sa disponibilité, dans ses explications de notions de photochimie, malgré leurs complexités et mon inexpérience dans ce domaine. A tous les trois, un grand merci pour avoir accepté d'être les membres de mon jury et pour tout l'intérêt que vous avez accordé à mon travail.

À Monsieur le Docteur Edouard BADARAU, pour son soutien et sa volonté quotidienne de m'aider à progresser. J'ai le privilège depuis mon stage de 5^{ème} année de profiter de son expérience en chimie et en modélisation moléculaire afin de compléter ma formation et ma compréhension sur la complexité des flavines.

À Monsieur le Professeur Jean GUILLON et Monsieur le Docteur Stéphane MOREAU de m'avoir donné l'envie d'approfondir mes connaissances en chimie et en chimie thérapeutique lors de vos cours en pharmacie, du Master 2 Conception d'Outils Thérapeutiques et Diagnostiques et surtout au travers des séances de travaux pratiques, que j'ai maintenant l'occasion d'animer en votre compagnie. Je souhaite vous exprimer toute ma gratitude et je remercie à nouveau Monsieur le Docteur Stéphane MOREAU pour la relecture de ce manuscrit et son avis éclairé.

A Messieurs les Docteurs Jean DESSOLIN et Antoine MEUNIER, ainsi qu'à Mesdames les Docteurs Nada TAÏB-MAAMAR et Maylou VANG pour l'ensemble des conseils avisés transmis qui ont contribué pleinement à ma formation. Je souhaite également remercier à nouveau Monsieur le Docteur Jean DESSOLIN pour la relecture de ce manuscrit.

Aux membres de l'équipe : Madame le Docteur Cristina AMARANDEI, Monsieur le Docteur Adama DIEDHIOU, Benoît BOUZOID, Lisa CLAVEL, Pauline COSSARD, Samantha

DI GEORGIO, Romain LAFITTE, Jessica MURE D’ALEXIS, pour leur bienveillance à mon égard et leur bonne humeur quotidienne.

À Messieurs les Docteurs François LEFOULON et François RIVIÈRE, mon cousin, pour m’avoir tendu la main et permis de mettre un premier pied dans le domaine de la recherche.

À Marie CHAUVA, pour ton aide dans la compréhension et la rédaction de la partie odontologie de cette thèse.

À l’ensemble de mes amis de promotion en pharmacie : Elise MOUROT, Claudia POULAIN, Emma QUEINNEC, Félana RABEMANANTSOA, Kareen RAMAHANDRY, Julie ROIGT, ainsi que mon binôme de travaux pratiques Paul RIVIÈRE pour votre bonne humeur, votre gentillesse ; les travaux que nous avons accomplis ensemble et les bons moments que nous avons partagés au cours de nos études.

Je voudrais exprimer ma gratitude la plus sincère à l’ensemble de ma famille et plus particulièrement à mes parents, mes beaux-parents, mon frère et mon grand-père pour votre présence, votre support depuis de longues années, votre aide et la confiance que vous m’avez accordés. Vos encouragements m’ont inculqué ma détermination et la valeur du travail. J’ai également une pensée particulière pour mes grands-parents maternels et ma grand-mère paternelle trop tôt disparus.

Enfin, mes derniers remerciements seront pour toi, Richina, pour ton soutien indéfectible, ton écoute précieuse et tes conseils avisés. La vie est plus douce à tes côtés et je suis très heureux que tu partages ma vie.

Merci à Maman, Serge et Richina pour leurs nombreuses lectures de ce travail.

“ La vérité d’hier est morte, celle de demain est encore à bâtir. Aucune synthèse valable n’est entrevue, et chacun d’entre nous ne détient qu’une parcelle de vérité. ”

Antoine de Saint-Exupéry

“ La théorie, c’est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c’est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! ”

Albert Einstein

Table des Matières

Remerciements	3
Table des Matières	5
Abréviations	7
Tables des Illustrations.....	9
Table des Schémas	11
Liste des Tableaux.....	11
Lexique.....	12
1. Introduction.....	15
1.1. Découverte de la riboflavine.....	16
1.2. Propriétés physico-chimiques.....	16
1.3. Propriétés biologiques	21
2. Utilisation des flavines dans la santé et en pharmacie entre 2008-2018.....	27
2.1. Destruction de cellules, micro-organismes, virus.....	28
2.1.1. Applications anti-cancéreuses	28
2.1.1.1. Généralités sur les cancers	28
2.1.1.2. Relation entre cancer et riboflavine	32
2.1.1.3. Interactions entre les flavines et l'ADN.....	35
2.1.1.4. Thérapie photodynamique.....	38
2.1.1.5. Mise au point de principes actifs à base de flavines	39
2.1.1.6. Utilisation de flavines comme inhibiteur de tyrosines kinases	47
2.1.2. Utilisation de la RF comme agent anti-infectieux : Mirasol system.....	48
2.1.2.1. Généralités sur le sang	48
2.1.2.2. Les transfusions en France.....	50
2.1.2.3. Utilisation de la riboflavine pour le Mirasol system et comparaison aux autres méthodes photochimiques	52
2.2. Applications en ingénierie tissulaire.....	58
2.2.1. Traitement du kératocône.....	58
2.2.1.1. Description de l'œil.....	58
2.2.1.2. Physiologie de la cornée	59
2.2.1.3. Physiopathologie du kératocône	60
2.2.1.4. Traitement par photoréticulation du collagène cornéen.....	62

2.2.2.	Autres exemples de photoréticulation du collagène.....	67
2.2.2.1.	En odontologie.....	67
2.2.2.2.	En chondrologie.....	71
2.2.2.3.	En ostéologie.....	75
2.2.2.4.	En cardiologie.....	77
2.3.	Autres applications des flavines.....	81
2.3.1.	Système nerveux central.....	81
2.3.1.1.	La maladie d'Alzheimer.....	81
2.3.1.2.	La sclérose latérale amyotrophique.....	82
2.3.1.3.	La migraine.....	83
2.3.1.4.	La maladie de Parkinson.....	86
2.3.2.	Système cardiovasculaire.....	87
2.3.2.1.	L'hypertension.....	87
2.3.2.2.	La reperfusion d'organes.....	91
2.3.3.	Maladies métaboliques.....	93
2.3.3.1.	Déficit multiple en acyl-CoA déshydrogénases et syndromes de Brown-Vialetto-Van Laere et Fazio Londe.....	93
2.3.3.2.	Le diabète.....	94
2.3.3.3.	L'ostéoporose.....	95
2.3.3.4.	Utilisation comme antidote.....	96
2.3.3.5.	Formulations à libération prolongée lors de carence.....	98
2.3.4.	Antibiothérapie.....	100
3.	Conclusion.....	108
4.	Contextualisation de cette thèse.....	112
	Bibliographie.....	117
	Serment de Galien.....	127

Abréviations

μg : microgramme	CE : Conformité Européenne
μm : micromètre	CGM : chitosan glycol méthacrylé
μM micromolaire	cm : centimètre
μmol : micromole	CMH : complexes majeurs d'histocompatibilité
μs : microseconde	COX : cyclooxygénase
^0RF : état fondamental de la riboflavine	CPA : cellules présentatrices d'antigènes
$^1\text{O}_2$: oxygène singulet	CpG : Cytosine-phosphate-Guanine
$^1\text{RF}^*$: état singulet de la riboflavine	CSM : cellule souche mésenchymateuse
3D : tridimensionnelle	Ctr : récepteur à la calcitonine
$^3\text{RF}^*$: état triplet de la riboflavine	CXL : corneal collagen cross-linking (photoréticulation du collagène cornéen)
5-A-RU : 5-amino-ribityl uracile	D : day (jour)
5-OE-RU : du 5-(2-oxoethylideneamino)-6- D-ribitylaminouracile	DMAD : déficit multiple en acyl-CoA déshydrogénases
5-OP-RU : 5-(2-oxopropylideneamino)-6-D- ribitylaminouracile	EFS : Etablissement Français du Sang
A : adénine	EPR : Enhanced Permeability and Retention (Perméabilité et rétention augmentées)
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	ERA : espèces réactives de l'azote
AF : annulus fibrosus	ERO : espèces réactives de l'oxygène
AFAD : 8-amino-8-déméthyl-Flavine Adénine Dinucléotide	FAD : flavine adénine dinucléotide
AFMN : 8-amino-8-déméthyl-Flavine MonoNucléotide	FAK : Focal Adhesion Kinase
AH : acide hyaluronique	FDA : Food and Drug Administration
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens	FL : Fazio Londe
ALAT : alanine aminotransférase	FMN : flavine mononucléotide
Alp : phosphatase alcaline	FRET : Förster Resonance Energy Transfer
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament	g : gramme
ARF : 8-amino-8-déméthyl-riboflavine	G : guanine
ARN : Acide RiboNucléique	GAG : glycosaminoglycane
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	GSH-Px : glutathion peroxydase
ASAT : aspartate aminotransférase	GTP : guanosine triphosphate
ATP : Adénosine TriPhosphate	GvH : greffon versus hôte
AVC : accident vasculaire cérébral	Gy : Gray
A β : amyloïde-béta	h : heure
BVVL : Brown-Vialetto-Van Laere	H ₂ O ₂ : peroxyde d'hydrogène
C : cytosine	HAS : Haute Autorité de Santé
CAT : catalase	HEPES : (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique)
CCl ₄ : tétrachlorométhane	His : histidine
CD : cluster de différenciation	
CDK : Cycline-Dependent Kinases	

HO[•] : radical hydroxyde
 HPV : Human Papillomavirus
 Ig : immunoglobuline
 IL : interleukine
 IR : infra-rouges
 IRM : imagerie par résonnance magnétique
 Itgb3 : intégrine β3
 J : joule
 kDa : kilodalton
 kPa KiloPascal
 l : litre
 Lpcat2 : lysophosphatidylcholine
 acyltransferase2
 LSD1 : lysine spécifique déméthylase 1
 M : mois
 MA : maladie d'Alzheimer
 MAIT : Mucosal-Associated Invariant T
 MAPK : Mitogen-activated protein kinases
 M-CSF : macrophage-colony stimulating
 factor
 MEC : matrice extracellulaire
 MES : acide 2-(N-
 morpholino)éthanosulfonique
 mg : milligramme
 min : minute
 ml : millilitre
 mm : millimètre
 mmHg : millimètre de mercure
 MMP : Métalloprotéinases Matricielles
 mol : mole
 MP : maladie de Parkinson
 Ms : Mirasol system
 MTHFR : 5,10-méthylène tétrahydrofolate
 réductase
 mW : milliWatt
 NFH : neurofilament protein
 NF-κB : nuclear factor-kappa B, : Nuclear
 Factor kappa B
 nm : nanomètre
 NP : nucleus pulposus
 ns : nanoseconde
 O₂ : dioxygène
 O₂^{-•} : anion superoxyde
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 PEG : polyéthylène glycol
 pH : potentiel Hydrogène
 PI3K : phosphoinositide 3-kinase
 QD : quantum dot
 RANK : receptor activator of nuclear factor
 kappa-B
 RANKL : receptor activator of nuclear
 factor kappa-B ligand
 RCP : protéine de transport de la riboflavine
 RF : riboflavine
 RfdiC14 : (S)-2,3-Bis(tetradecyloxy)propyl
 (5-(7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-
 dihydrobenzo[g]pteridin-10(2H)-yl)-
 2,3,4-trihydroxypentyl)phosphate
 RFL : laurate de riboflavine
 RFVT : récepteur membranaire de la
 riboflavine
 RL-6,7-diMe : 6,7-dimethyl-8-D-
 ribityllumazine
 RL-6-Me-7-OH : 7-hydroxy-6-methyl-8-D-
 ribityllumazine
 RoFAD : RoséoFlavine Adénine
 Dinucléotide
 RoFMN : RoséoFlavine MonoNucléotide
 SHH : Sonic HedgeHog
 SHRSP : stroke-prone spontaneously
 hypertensive (modèle AVC souris)
 SLA : sclérose latérale amyotrophique
 SOD : superoxyde dismutase
 SRAS : syndrome respiratoire aigu sévère
 T : thymine
 TCR : T cell receptor (Récepteur des
 cellules T)
 TGF : Transforming growth factor (facteur
 de croissance transformant)
 TK : tyrosine kinase
 TNF-α : Tumor Necrosis Factor α
 TPEGs : D-α-tocophérol polyéthylène
 glycol 1000 succinate
 UV : ultra-violet
 VIH : virus de l'immunodéficience humaine
 λ : longueur d'onde
 Φ_F : rendement quantique de fluorescence
 Φ_{ISC} : rendement quantique de conversion
 intersystème

Table des Illustrations

Figure 1 : Représentation du nombre de publications possédant les termes "riboflavine" ou "flavine" entre 1930 et 2018, selon le moteur de recherche Scopus.....	15
Figure 2 : Spectres d'absorbance et de fluorescence de la RF et FMN	18
Figure 3 : Diagramme de Jablonski et application en thérapie photodynamique	19
Figure 4 : Absorption, distribution, métabolisation et élimination de la RF	23
Figure 5 : Répartition des articles publiés entre 2008 et 2018 selon les domaines d'intérêt	27
Figure 6 : Les étapes de formation d'un cancer	29
Figure 7 : a°) Incidence cancer du poumon chez la femme, b°) Mortalité cancer de la thyroïde chez la femme	32
Figure 8 : Schéma d'internalisation de la RF dans une cellule.....	35
Figure 9 : Mésappariement G-T qui permet l'intercalation de la RF ; b°) Grossissement sur les liaisons hydrogènes et π -stacking avec la RF.....	36
Figure 10 : Interaction entre la RF et le G-quadruplex	37
Figure 11 : Représentation des voies de signalisation impactées par la RF* afin de diminuer l'agressivité de cellules de mélanome (B16F10)	39
Figure 12 : Illustration de l'effet EPR et de la diffusion de particules selon leur taille a°) Dans un tissu sain; b°) Dans un tissu tumoral	40
Figure 13 : RF conjuguées au dendrimère a°) via son N3 ; b°) via son N10	41
Figure 14 : Liposomes furtifs vectorisés par la RF.....	42
Figure 15 : Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique fluorescentes recouvertes de FMN et de GMP	43
Figure 16 : Nanoparticules permettant la conversion ascendente ; b°) Diagramme de Jablonski expliquant le phénomène de conversion ascendente utilisé pour irradier les flavines ..	45
Figure 17 : Structure a°) de l'hémoglobine, b°) de l'hème.....	49
Figure 18 : Processus d'inactivation de pathogènes par Mirasol system.....	53
Figure 19 : Influence des méthodes photochimiques sur les protéines plasmatiques de la coagulation.....	54
Figure 20 : Méthodes d'inactivation des produits dérivés du sang autorisées selon les pays	57
Figure 21 : Coupe sagittale de l'œil.....	59
Figure 22 : Histologie de la cornée	60
Figure 23 : a°) Vision d'une personne saine ; b°) Vision déformée d'un patient atteint de kératocône	60
Figure 24 : Rigidification de la cornée induite après CXL	63
Figure 25 : Exposition d'une cornée kératocônique à une solution de flavine, irradiée par des UV-A durant le CXL	64
Figure 26 : Anatomie de la dent	67
Figure 27 : a°) Encapsulation de chondrocytes dans un hydrogel photoréticulé ; b°) Image de microscopie électronique à balayage d'un chondrocyte encapsulé	73
Figure 28 : Anatomie du genou.....	74
Figure 29 : Hernie discale	75
Figure 30 : Calvaria de souris : a°) Après craniotomie 3 mm, b°) après application gel CGM (témoin), c°) cicatrisation plus rapide avec le traitement gel CGM +CSM + lysozymes	77
Figure 31 : Structure du cœur.....	78

Figure 32 : Bioimpression 3D : gélification par photoréticulation et effet thermique	80
Figure 33 : Imagerie par microscopie à force atomique des fibrilles de peptide A β : a $^\circ$) natives ; b $^\circ$) après photooxygénation	82
Figure 34 : Métabolisme de l'homocystéine.....	89
Figure 35 : a $^\circ$) Effets délétères de l'hypoxie lors d'un infarctus du myocarde, b $^\circ$) compensés par l'effet cardioprotecteur de la supplémentation en RF.....	92
Figure 36 : c $^\circ$) Auto-organisation des nanocristaux ; d $^\circ$) Imagerie en MET des nanocristaux.....	99
Figure 37 : c1 $^\circ$) Représentation des nanotubes de RFL + TPEGS + Lécithine c2 $^\circ$) MET des nanotubes; d1 $^\circ$) Représentation des nanosphères de RFL + TPEGS + Lécithine ; d2 $^\circ$) MET des nanosphères.....	100
Figure 38 : a $^\circ$) Représentation secondaire du riboswitch ; b $^\circ$) Détail des interactions hydrogènes entre l'aptamère et la FMN ; c $^\circ$) Mécanisme de régulation par le riboswitch.....	102
Figure 39 : Interaction de la RoFMN avec l'azoréductase a $^\circ$) en présence d'une molécule d'eau au sein de la poche hydrophobe ; b $^\circ$) sans molécule d'eau.....	104
Figure 40 : Cellule infectée par des Salmonelles reconnue par un lymphocyte MAIT	106
Figure 41 : a $^\circ$) CryoTEMs des auto-assemblages de RfdiC14 ; b $^\circ$) Modèle tout atome et gros grain du RfdiC14 ; c1 $^\circ$) Simulation par modélisation moléculaire : d'auto-assemblages multilamellaires du RfdiC14; c2 $^\circ$) Grossissement de c1 ; d $^\circ$) Interactions des cycles isoalloxazines par π -stacking.....	114

Table des Schémas

Schéma 1 : Structures chimiques du lumichrome, de la lumiflavine, RF, FMN et FAD ; cycle isoalloxazine en jaune, chaîne ribityle en bleue	17
Schéma 2 : Différents états d'oxydo-réduction des flavines	18
Schéma 3 : Synthèse de la RF	20
Schéma 4 : a°) Interaction de la thymine et de la lumiflavine, insérée dans un site abasique ; b°) Représentation des liaisons hydrogènes formées entre les bases de l'ADN (A, T, C, G) et la lumiflavine.....	36
Schéma 5 : a°) RF-tétrabutyrates ; b°) RF-tétraacétate.....	43
Schéma 6 : RF fonctionnalisée par le 1,2-éthanedithiol afin de lier la RF aux nanoparticules d'or	44
Schéma 7 : Réduction de la prodrogue du cisplatine induite par la photocatalyse de la RF dans un tampon MES.....	46
Schéma 8 : Structures générales des a°) 5-déazaflavines et b°) flavines-5-oxydes étudiées ; c°) composé retenu par H.I Ali et son équipe.....	48
Schéma 9 : Molécules utilisées pour l'inactivation de pathogènes.....	52
Schéma 10 : Mécanismes du CXL proposés par G.W.Conrad et son équipe	66
Schéma 11 : a°) bis-riboflavine ; b°) bis-isoalloxazine.....	82
Schéma 12 : Nitroprussiate de sodium	97
Schéma 13 : a°) Laurate de riboflavine ; b°) Structure des poloxamères	99
Schéma 14 : a°) D- α -Tocopherol polyéthylène glycol 1000 succinate ; b°) Lécithine	100
Schéma 15 : a°) roséoflavine ; b°) 8-déméthyl-8-amino-RF.....	104
Schéma 16 : Molécule antituberculeuse testée par M. Cushman et son équipe	105
Schéma 17 : Formation des ligands des cellules MAIT.....	107
Schéma 18 : Molécule de RfdiC14	113
Schéma 19 : Représentation de la stratégie de synthèse et des objectifs de l'équipe.....	116

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Protéines et enzymes constituant le flavoprotéome	24
Tableau 2 : Incidence et mortalité des principaux cancers selon le sexe, en France, en 2018.....	31
Tableau 3 : Logarithme de réduction de pathogènes selon les trois méthodes ayant obtenu le marquage CE	55
Tableau 4 : Principes actifs utilisés dans la prophylaxie des crises de migraine	84
Tableau 5 : Récapitulatif des différentes applications des flavines dans la santé	111

Lexique

Acidurie L ou D-2-hydroxyglutarique : est un groupe de maladies neurométaboliques avec un large spectre clinique allant de manifestations néonatales sévères, à des formes progressives et des cas asymptomatiques. Sur le plan biochimique, l'acidurie hydroxyglutarique est caractérisée par des taux élevés d'acide hydroxyglutarique II dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien et les urines (1).

Acidémie glutarique type III : est un déficit en glutaryl-CoA oxydase. Il s'agit d'une affection péroxisomale entraînant une acidurie glutarique. Il n'y a pas de phénotype bien déterminé associé à cette affection (2).

Acidémie isovalérique : est caractérisée par un déficit en isovaléryl-CoA déshydrogénase. Une grande variabilité clinique peut se présenter au cours de la petite enfance avec des manifestations aiguës (vomissements, retard de croissance, convulsions, léthargie, odeur caractéristique de « pieds en sueur », pancréatite aiguë, retard de développement) ou dans l'enfance avec une acidose métabolique qui peut être fatale en l'absence d'un traitement immédiat (3).

Déficit multiple en acyl-CoA déshydrogénases : est un trouble de l'oxydation des acides gras et des acides aminés. Il s'agit d'une maladie cliniquement hétérogène, variant d'une présentation sévère néonatale avec une acidose métabolique, une cardiomyopathie et une hépatopathie à une forme modérée infantile/adulte avec des crises de décompensation métabolique, une faiblesse musculaire et une insuffisance respiratoire (4).

Desmostérolose : est un trouble de la biosynthèse du cholestérol, caractérisé par de multiples malformations et une accumulation généralisée de desmostérol. Elle a été rapportée chez deux patients. Tous deux avaient des taux plasmatiques et tissulaires de desmostérol élevés, un visage dysmorphique et une fente palatine. La présence d'autres malformations très variables, a été observée chez ces patients, l'un étant décédé une heure après sa naissance (5).

Homocystinurie classique : est un déficit en cystathionine bêta synthase caractérisé par une atteinte des yeux, du squelette, du système nerveux central et du système vasculaire (6).

Maladie de Charcot-Marie-Tooth liée à l'X type 4 : est une neuropathie génétique sensorimotrice périphérique, axonale et rare. Au début de l'enfance apparaissent une faiblesse

musculaire distale sévère, lentement progressive et une perte auditive neurosensorielle ainsi qu'une atteinte cognitive, associées. Les filles sont asymptomatiques et ne manifestent pas le phénotype (7).

Maladie du sirop d'érable : est un trouble héréditaire et rare du métabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée. Elle se caractérise par des difficultés pour s'alimenter, une léthargie, des vomissements et une odeur de sirop d'érable dans le cérumen et dans les urines observés précocement après la naissance, suivis par une encéphalopathie et une insuffisance respiratoire centrale en l'absence de traitement (8).

Parangliomes héréditaires : sont des tumeurs neuroendocrines rares développées aux dépens d'un paraganglion siégeant de la base du crâne au plancher pelvien (9).

Porphyrie variegata : est une forme de porphyrie hépatique aiguë caractérisée par la survenue de crises neuro-viscérales et / ou par la présence de lésions cutanées (10).

Sarcosinémie : est une maladie métabolique, caractérisée par une élévation du taux de sarcosine dans le plasma et dans l'urine due à un déficit en sarcosine déshydrogénase (11).

Syndrome d'Antley-Bixler : est un syndrome rare caractérisé par une craniosynostose (fusion prématurée des sutures crâniennes) avec hypoplasie de l'étage moyen de la face, une synostose radio-humérale, une incurvation fémorale et des contractures articulaires (12).

Syndrome Brown-Vialetto-Van Laere : est une maladie progressive des motoneurones caractérisée par des insuffisances respiratoires, une surdité et une paralysie ponto-bulbaire également appelée syndrome de Fazio-Londe (13).

Syndrome de Brunner : est un déficit en monoamine oxydase A. Il s'agit d'un trouble très rare du métabolisme des amines biogènes, récessif lié à l'X se manifestant au cours de l'enfance, caractérisé sur le plan clinique par une déficience intellectuelle légère, une agressivité impulsive et parfois un comportement violent (14).

Syndrome de Leigh : ou encéphalomyopathie nécrosante subaiguë est une maladie neurologique progressive caractérisée par des lésions neuropathologiques associant en particulier une atteinte du tronc cérébral et des ganglions de la base (15).

Syndrome de Miller-Fisher : est une forme rare, du syndrome de Guillain-Barré (neuropathies post-infectieuses rares qui surviennent en général chez des sujets en bonne santé), touchant les nerfs crâniens (16).

Xanthinurie type I : trouble rare du métabolisme des purines. Il est caractérisé par un déficit isolé en xanthine déshydrogénase, causant une hyperxanthinémie avec peu ou pas d'acide urique et une xanthinurie, conduisant à une urolithiase, une hématurie, des coliques néphrétiques et des infections du tractus urinaire (17).

Xanthinurie type II : trouble rare du métabolisme des purines. Il est caractérisé par un déficit en xanthine déshydrogénase et en aldéhyde oxydase, conduisant à une urolithiase à cristaux de xanthine et à une insuffisance rénale chez certains patients (18).

1. Introduction

Les vitamines sont des substances organiques actives, indispensables en infime quantité à la croissance et au bon fonctionnement d'un organisme humain ou animal alors que celui-ci ne peut en effectuer lui-même la synthèse. La vitamine B₂ également nommée riboflavine (RF) est un composé essentiel que nous apportons par notre alimentation. Cependant, l'Homme possède les enzymes permettant de synthétiser les dérivés biologiquement actifs de la RF : la flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD).

Depuis la découverte de la RF en 1933, le nombre de publications concernant les flavines dans leur généralité n'a cessé d'augmenter montrant tout l'intérêt autour de cette molécule. Depuis 2002, on constate que le nombre de travaux de recherche comportant les mots « riboflavine » ou « flavine » dans leur titre croît et dépasse les 200 publications, chaque année depuis 2008 (Figure 1) traduisant l'attrait pour ces molécules et montrant que l'étude des flavines est un sujet de recherche d'actualité.

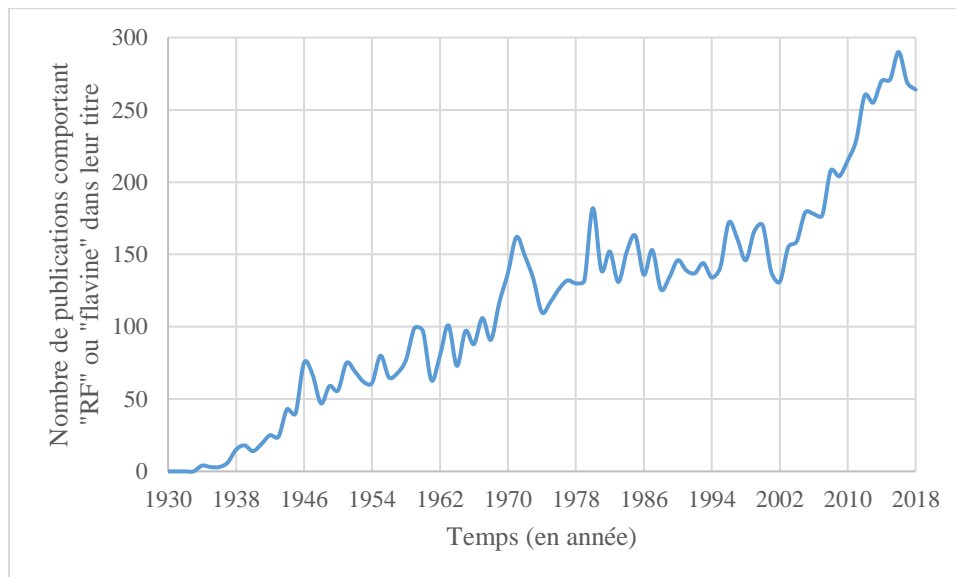


Figure 1 : Représentation du nombre de publications possédant les termes "riboflavine" ou "flavine" entre 1930 et 2018, selon le moteur de recherche Scopus

L'objectif de cette thèse consiste en l'exposé des domaines d'applications des flavines dans la santé entre 2008 et 2018 afin de comprendre tout l'intérêt que suscite cette famille de molécules.

1.1. Découverte de la riboflavine

La découverte de la riboflavine ou vitamine B₂, a été jalonnée de plusieurs étapes. En effet, dans un premier temps, a été découvert le complexe de vitamine B qui était un mélange de vitamines toutes hydrosolubles (vitamine B₁ : thiamine, B₂ : riboflavine, B₃ : niacine, B₅ : acide pantothénique, B₆ : pyridoxine, B₈ : biotine, B₉ : acide folique, B₁₂ : cyanocobalamine) et de composés anciennement appelés vitamines à tort car l'organisme est capable de les produire (B₄ : adénine, B₇ : myo-inositol, B₁₀ : acide *para*-aminobenzoïque, B₁₁ : L-carnitine) (19).

En 1927, Chick et Roscoe ont observé que certains aliments avaient des propriétés plus accentuées contre le bériberi (carence en vitamine B₁) et comprirent que ce complexe de vitamine B contenait au moins deux molécules. La thiamine fut ensuite isolée de ce mélange et le nom de vitamine B₁ lui fut attribué (20).

De la même façon, en 1932, György a remarqué que ce qui était appelé le facteur vitamine B₂, à cette époque, avait des propriétés sur la croissance et une propriété anti-pellagre (carence en vitamine B₃). La vitamine B₂ fut isolée et cristallisée par Kuhn en 1933. Le nom de lactoflavine lui a été attribué lorsqu'elle était issue du lait ou d'ovoflavine lorsqu'elle provenait des œufs ou encore hépatoflavine lorsqu'elle était d'origine hépatique. Cette molécule nécessitait l'équivalent de 5 000 litres de lait ou 34 000 œufs pour en isoler un gramme. Il a été remarqué que cette vitamine, d'une couleur jaune-vert fluorescente, se dégradait sous l'effet des rayons ultra-violet mais qu'elle était thermostable. György observa par la suite, que la privation en vitamine B₂, chez des rats, menait à des retards de croissance, mais qu'il ne s'agissait pas du facteur anti-pellagre et il conclut qu'il s'agissait de deux molécules différentes. Ce facteur, désormais appelé niacine ou vitamine B₃ fut isolé en 1937 par Elvehjem (19,20).

Karrer et Kuhn menèrent chacun de leur côté des travaux sur les vitamines, qui permirent de caractériser la vitamine B₂ et de proposer sa structure chimique en 1934. L'ensemble de leurs recherches fut récompensé par un prix Nobel chacun, respectivement en 1937 et 1938 (20,21).

1.2. Propriétés physico-chimiques

Le nom de riboflavine (RF) a été attribué à la vitamine B₂ par le Council of Pharmacy and Chemistry of the American Medical Association en 1937, car elle est constituée d'un système

hétérocyclique isoalloxazine substitué sur le N10 par une chaîne ribityle pentacarbonée (Schéma 1) (20,22). La RF est un composé organique jaune-orangé thermostable mais photosensible. Le lumichrome (isoalloxazine) et la lumiflavine (isoalloxazine méthylée en N10) sont les produits de photo-dégradation de la RF respectivement en milieu acide ou basique, dépourvus de la partie ribose (23). La flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) sont les dérivés biologiquement actifs de la RF respectivement phosphorylés et « adénylés » (Schéma 1). La RF est faiblement soluble dans l'eau alors que la FMN et la FAD ont une meilleure hydrosolubilité grâce à leur groupement phosphate (22,23).

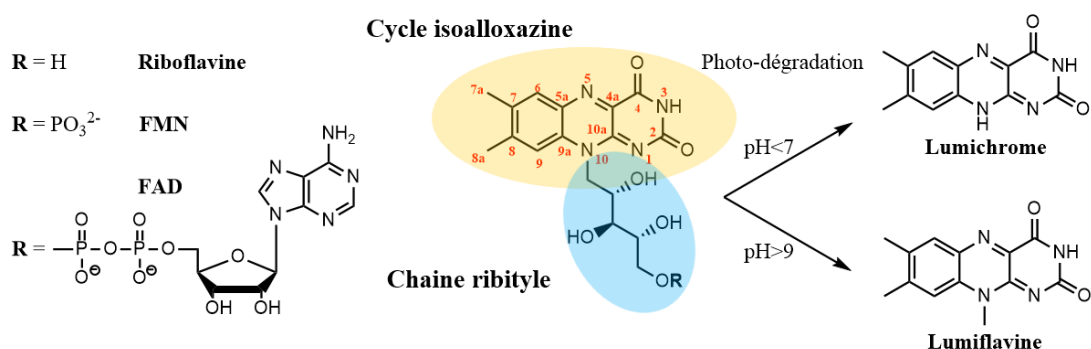


Schéma 1 : Structures chimiques du lumichrome, de la lumiflavine, RF, FMN et FAD ; cycle isoalloxazine en jaune, chaîne ribityle en bleue

Les propriétés physico-chimiques des flavines leur sont conférées par leur cycle isoalloxazine. En effet, les flavines possèdent plusieurs états d'oxydo-réduction : la forme oxydée, la forme semiquinone réduite d'un électron et la forme hydroquinone complètement réduite. Ces différents états redox influencent le repliement du cycle isoalloxazine puisque les formes oxydées et semiquinones sont planes, contrairement à la forme hydroquinone (Schéma 2) (22,24).

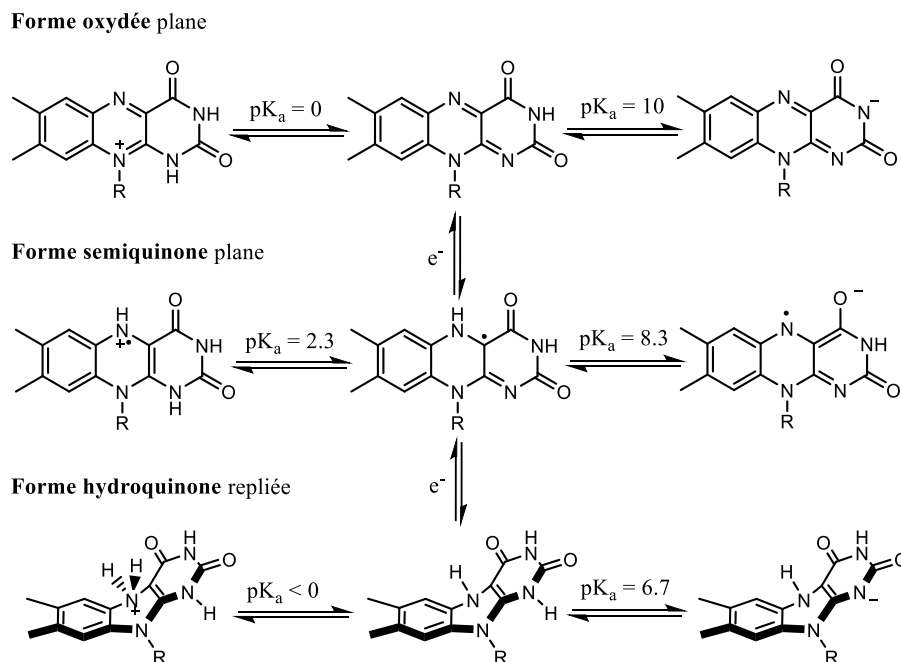


Schéma 2 : Différents états d'oxydo-réduction des flavines inspiré selon les revues des équipes de I. Bestel et P.Sobrado (22,24)

Le cycle isoalloxazine est également responsable de l'absorbance et de la fluorescence des flavines. La RF et la FMN ont les mêmes spectres d'absorbance (maxima $\lambda = 223$ nm, 266 nm, 373 nm et 445 nm) car la nature de la chaîne ribityle n'influence que très peu ces propriétés. Concernant leur fluorescence, les flavines sont excitées à $\lambda = 446$ nm et émettent une lumière jaune, $\lambda = 535$ nm (Figure 2). En revanche la fluorescence de la FAD est inhibée par des interactions intra moléculaires entre le cycle isoalloxazine et l'adénine (23,25,26).

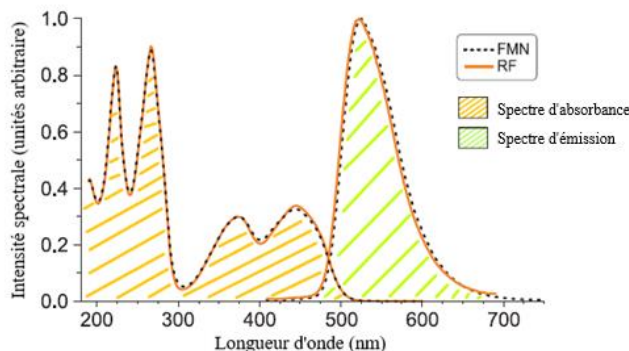


Figure 2 : Spectres d'absorbance et de fluorescence de la RF et FMN (25)

Les flavines sont des molécules photosensibilisatrices : après irradiation par une source lumineuse, un photon apporte l'énergie permettant le passage d'un électron, initialement à un état

fondamental (^0RF) vers un état singulet instable ($^1\text{RF}^*$) (Figure 3). Le temps de demi-vie de $^1\text{RF}^*$ est très court, environ 5 ns et il subit un phénomène de conversion interne. La conversion interne est un mécanisme qui permet la dissipation non radiative de l'énergie par différence avec la fluorescence qui permet un retour à l'état fondamental de manière radiative (27,28).

Le mécanisme de conversion intersystème permet le passage de l'état singulet instable où les spins sont en sens inverse $\uparrow\downarrow$ vers un état triplet métastable ($^3\text{RF}^*$) où les spins sont dans le même sens $\uparrow\uparrow$ ou $\downarrow\downarrow$. Le temps de demi-vie de l'état triplet de la RF est de 15 μs , soit 3000 fois plus important que l'état $^1\text{RF}^*$. Là encore un retour à l'état fondamental pourra se faire soit de manière radiative soit par un processus non radiatif. La phosphorescence est le processus radiatif permettant le retour à un état fondamental. Le photon phosphorescent est émis de manière différée et à des longueurs d'ondes supérieures par rapport au photon fluorescent (27,28).

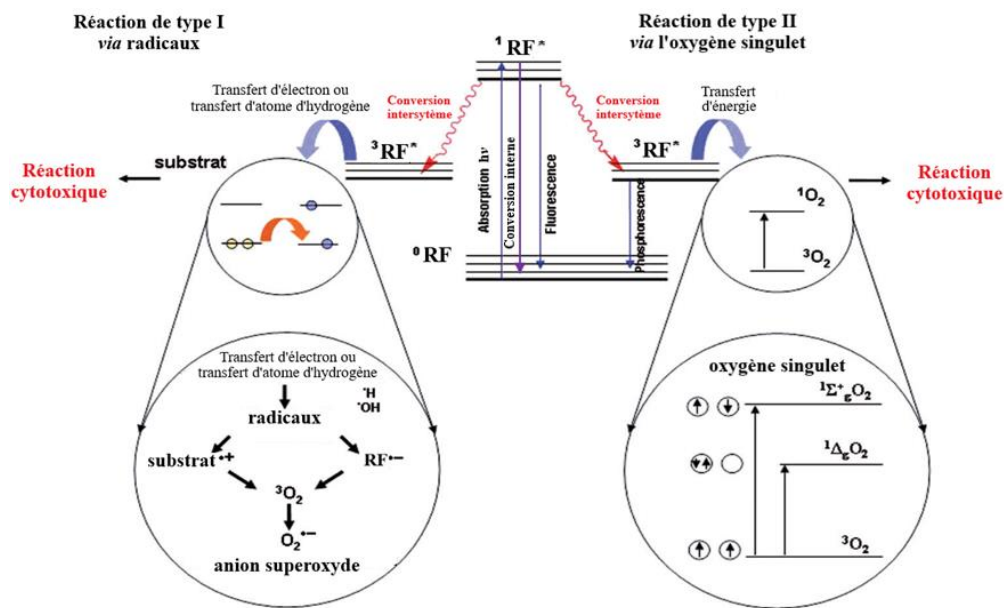


Figure 3 : Diagramme de Jablonski et application en thérapie photodynamique (27)

Les réactions de type I et II permettent quant à elles un retour à l'état fondamental de manière non radiative. Dans le cadre des réactions de type I, $^3\text{RF}^*$ réagit avec un substrat ce qui permettra par la suite de générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que l'anion superoxyde O_2^- , le radical hydroxyde HO^\cdot et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Par ailleurs, lors des réactions de type II, $^3\text{RF}^*$ va réagir directement avec le dioxygène O_2 qui sera à son tour excité en une ERO : l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$. L'ensemble des ERO obtenues par mécanisme de type I ou II sont

cytotoxiques. Les applications dérivées de ces principes physico-chimiques seront détaillées par la suite (27,28).

Le rendement quantique de fluorescence (Φ_F), permet de mesurer l'efficacité de l'émission de lumière fluorescente par le rapport : $\Phi_F = \frac{\text{nombre de photons fluorescents émis}}{\text{nombre photons absorbés}}$, compris entre 0 et 1.

La valeur de Φ_F de la RF est comprise entre 0.29 et 0.39. De la même manière, le rendement quantique de conversion intersystème (Φ_{ISC}) de la RF est compris entre 0.6 et 0.7 et environ la moitié de cette énergie permet la formation de l' 1O_2 (27,28). Cela signifie donc que la dissipation d'énergie de la $^1RF^*$ se fait par émission de lumière fluorescente, dans des proportions pouvant atteindre jusqu'à 39 % mais surtout par conversion intersystème en formant $^3RF^*$ (jusqu'à 70%). A son tour, $^3RF^*$ cède son énergie pour retourner à l'état fondamental, principalement par des réactions de type I et de type II.

Parmi les voies de synthèse de la RF répertoriées dans la littérature, celle proposée par l'équipe de C.D. Poulter en 2016, a permis l'obtention de la RF en trois étapes avec un rendement global pouvant atteindre jusqu'à 72% (Schéma 3). Ils ont tout d'abord procédé à l'amination réductrice de la 3,4-diméthylaniline avec le D-ribose et en présence de cyanoborohydrure de sodium. Par la suite, la réaction de diazotation a permis d'obtenir le cation benzènediazonium formé à partir d'une aniline et de l'acide nitreux généré *in situ* par le nitrite de sodium et l'acide chlorhydrique. Ce cation benzènediazonium est utilisé pour faire une substitution électrophile aromatique en position 6 de la 3,4-diméthylaniline alkylée. La dernière étape consiste en la formation du cycle isoalloxazine selon une condensation de Tishler à partir de l'acide barbiturique (29).

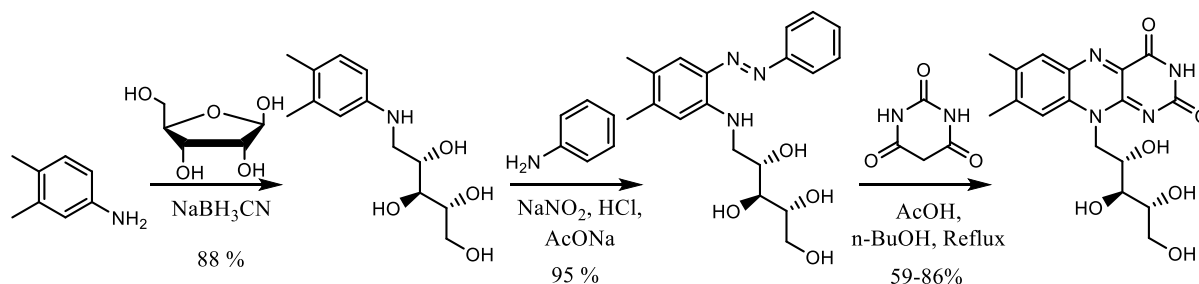


Schéma 3 : Synthèse de la RF (29)

Cependant, la production de RF se fait aujourd'hui par voie biotechnologique. En effet, les procaryotes, les champignons et les végétaux (au sein de leurs chloroplastes) sont des organismes auxotrophes pour la RF. C'est-à-dire, qu'ils sont capables de produire la RF mais aussi la FMN et la FAD, respectivement en une étape (de phosphorylation) et deux étapes supplémentaires (phosphorylation et adénylation). *Bacillus subtilis* (bactérie) et *Ashbya gossyii* (champignon) sont les microorganismes principalement utilisés du fait qu'ils surproduisent et excrètent la RF dans leur milieu de culture, à raison de 15 g/l. Ces microorganismes produisent la RF en neuf étapes à partir du guanosine triphosphate (GTP) et du ribulose-5-phosphate (23).

La production mondiale de RF, dominée par la Chine, représentait un chiffre d'affaire compris entre 150 et 500 millions de dollars pour un volume avoisinant 10 000 tonnes, en 2008. Environ 80% de cette production est utilisée en tant qu'additif alimentaire pour nourrir les animaux d'élevage tandis que le reste est utilisé dans l'industrie agro-alimentaire (colorant E-101) ou dans le domaine de la santé (23).

1.3. Propriétés biologiques

La RF est une vitamine essentielle à la vie cellulaire. L'Homme n'est pas capable de la synthétiser étant donné que les cellules eucaryotes ne possèdent pas les enzymes nécessaires à sa biosynthèse. Nous l'apportons donc principalement par notre alimentation et en moindre mesure par la production de la microflore intestinale. Cette vitamine est retrouvée dans de nombreux aliments en faible quantité : lait et produits laitiers, viandes maigres, œufs, céréales, certains poissons gras ou encore fruits et légumes. Les apports journaliers recommandés en RF dépendent de l'âge mais en moyenne l'homme a besoin de 1.3 mg / jour tandis que les besoins chez les femmes sont estimés à 1.1 mg / jour (besoins physiologiquement plus importants au cours d'une grossesse et lors de la période de lactation où le lait permet l'apport de 650 µg/l au nourrisson). Cependant des carences en RF peuvent survenir au cours de l'allaitement (besoins accrus pour la mère) ; en conditions physiopathologiques telles que l'alcoolisme, la maladie cœliaque, certaines pathologies cancéreuses ou lors de l'administration médicamenteuse d'antipsychotiques tels que les phénothiazines, d'antipaludéens tel que la quinacrine, d'anticancéreux comme la doxorubicine, d'anticonvulsivants comme le phénobarbital ou encore lors de la photothérapie du nourrisson. Les carences en RF également appelées ariboflavinose sont à l'origine des symptômes suivants :

fatigue, anémie, acidose, migraines, neuropathie périphérique, retard de croissance, symptômes dermatologiques, glossite, cataracte et cécité (22,23,30–33).

D'un point de vue pharmacocinétique, avant d'être absorbées au niveau de l'intestin grêle et du côlon, la FAD et la FMN sont converties en RF par des pyrophosphatases et phosphatases (Figure 4). La RF est ensuite internalisée au niveau du pôle apical des entérocytes *via* le transporteur RFVT-3. Ce transporteur saturable et pH-dépendant est composé de 11 domaines transmembranaires de 469 acides aminés (32,34).

L'Homme possède deux enzymes : la flavokinase et la flavine adénine dinucléotide synthétase (FAD synthétase) qui permettent de produire successivement la FMN et la FAD, tout d'abord par phosphorylation de la RF puis par adénylation de la FMN. Ces enzymes sont exprimées au sein de nos cellules intestinales ainsi que dans l'ensemble de nos cellules. La flavokinase est plutôt localisée au niveau de l'appareil de Golgi alors que la FAD synthétase est une enzyme cytosolique. La RF non convertie dans les entérocytes va traverser le pôle basal de ces cellules *via* des transporteurs pH indépendants : RFVT-1 et RFVT-2 qui possèdent 10 domaines transmembranaires, respectivement de 448 et 445 acides aminés. Ainsi, la RF se trouve dans la circulation sanguine. Une fraction sera de nouveau convertie en FMN et FAD alors que le reste de la RF sera prise en charge par différentes protéines responsables de sa distribution : la Riboflavin Carrier Protein (RCP), l'albumine et de manière moins importante certaines immunoglobulines (22,30,32,34).

Le processus d'internalisation n'est pas encore très bien connu et les structures cristallographiques des protéines qui interviennent n'ont pas encore toutes été publiées. Cependant, nous savons que les récepteurs RFVT sont tissus spécifiques : RFVT-1 est localisé au niveau du placenta et de l'intestin grêle, RFVT-2 est principalement situé dans le cerveau et les glandes salivaires alors que l'on retrouve RFVT-3 au niveau testiculaire, de l'intestin grêle et de la prostate (22,32,34).

La concentration plasmatique en RF est régulée par l'hormone thyroïdienne et serait influencée par les rythmes circadiens. La RF et ses métabolites (7 α -hydroxyRF, 8 α -sulfoRF, 8 α -hydroxyRF, lumiflavine et 10-hydroxyéthylRF) sont éliminés dans les urines et sont responsables de leur coloration. Les surdosages lors d'une supplémentation en RF causent rarement d'effets

indésirables, car la vitamine B₂ peut être biotransformée ou excrétée en tant que telle, dans les urines. Cependant, une phototoxicité peut apparaître lors d'une supplémentation supérieure à 100 mg répétée. Les espèces radicalaires générées entraînent la formation d'adduits entre la RF et le tryptophane qui sont hépatotoxiques et ont une cytotoxicité pour les protéines du cristallin et de la rétine qui sont constamment exposées à la lumière (30,32).

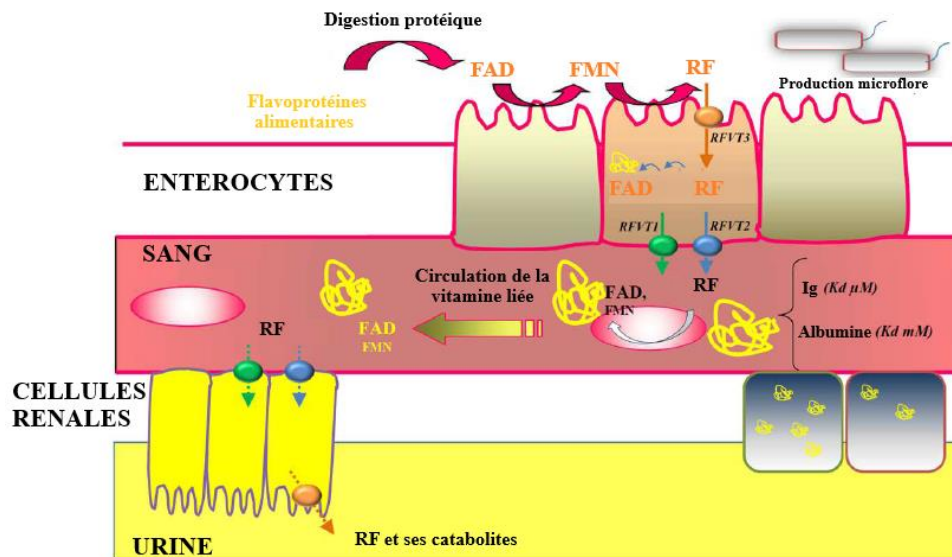


Figure 4 : Absorption, distribution, métabolisation et élimination de la RF (32)

La RF internalisée dans des cellules est transformée en FMN et FAD qui sont utilisées par l'ensemble des protéines et enzymes constituant le flavoprotéome. Ces protéines sont essentiellement des déshydrogénases, des oxydoréductases, des transférases, des mono-oxygénases ou encore des hydrolases. Parmi ces flavoprotéines, 84 % sont FAD-dépendantes alors que seulement 16 % utilisent la FMN comme cofacteurs. Les flavines sont engagées dans de nombreuses réactions métaboliques comme la bêta-oxydation mitochondriale et peroxysomale des acides gras, le cycle de l'acide citrique, la dégradation d'acides aminés. Elles sont impliquées au niveau nucléaire dans le remodelage de la chromatine, la réparation de l'ADN ; mais aussi dans le repliement protéique ou encore l'apoptose. Ces protéines participent aussi à la biosynthèse d'hormones (stéroïdes, thyroxine) ou de cofacteurs (coenzyme A et Q₁₀, folate, pyridoxine/pyridoxal 5'-phosphate, niacine) et de l'hème (Tableau 1). De ce fait, les maladies génétiques liées à des mutations inactivantes d'enzymes du flavoprotéome se traduisent par des

symptômes très handicapants ou engendrent la mort de l'embryon ou du fœtus car ces déficits empêchent leur développement (31,35).

Tableau 1 : Protéines et enzymes constituant le flavoprotéome (31,35)

Enzymes	Cofacteurs	Fonctions métaboliques	Maladies / Symptômes
D-lactate déshydrogénase	FAD	Métabolisme du pyruvate	Acidose lactique, syndromes neurologiques
Xanthine déshydrogénase	FAD	Dégradation des purines	Xanthinurie type I *
Glycolate oxydase	FMN	Métabolisme de la glycine	Diabète type II, néphrolithiase
Glycérol 3-phosphate déshydrogénase	FAD	Transport électron	Diabète type II
Choline déshydrogénase	FAD	Dégradation de la choline.	Agénésies dentaire, fente labiale, diminution de la motilité des spermatozoïdes
L-2-Hydroxyglutarate déshydrogénase	FAD	Réparation métabolique	Acidurie L-2-hydroxyglutarique *, retard psychomoteur, leukoencéphalopathie
D-2-Hydroxyglutarate déshydrogénase	FAD	Réparation métabolique	Acidurie D-2-hydroxyglutarique*, retard du développement, épilepsie, hypotonie
Aldéhyde oxydase	FAD	Métabolisation substrats (dont xénobiotiques) par oxydation	Xanthinurie type II*
Dihydropyrimidine déshydrogénase	FMN / FAD	Catabolisme pyrimidines	Comportement autistique, microcéphalie, hypertonie musculaire
3b-Hydroxystérol D24-réductase	FAD	Biosynthèse stérol.	Desmostérolose*
Dihydroorotate déshydrogénase	FMN	Biosynthèse pyrimidines	Syndrome de Miller Fischer*
Protoporphyrinogène IX oxydase	FAD	Biosynthèse de l'hème.	Porphyrie Variegata*
Acyl-CoA oxydase	FAD	Dégradation lipidique	Hypotonie, démyélinisation nerveuse
Glutaryl-CoA oxydase	FAD	Dégradation Glutaryl-CoA.	Acidurie Glutarique III*, macrocéphalie
Succinate déshydrogénase sous unité A	8a-(n3-His)-FAD	Cycle de l'acide citrique	Déficiences complexes II mitochondrial, syndrome de Leigh*, paragangliome*
Chaîne courte (butyryl-) acyl CoA déshydrogénase	FAD	Béta-oxydation	Parfois asymptomatique
Chaîne moyenne acyl-CoA déshydrogénase	FAD	Béta-oxydation	Hypoglycémie, léthargie, vomissements, crises d'épilepsie, coma
Glutaryl-CoA déshydrogénase	FAD	Dégradation lysine	Acidémie glutarique, crises encéphalopathiques, trouble du mouvement : dyskinétique dystonique
Isovaleryl-CoA déshydrogénase	FAD	Dégradation leucine.	Acidémie isovalérique*
2-Methylbutyryl-CoA déshydrogénase*	FAD	Dégradation isoleucine.	Hypotonie, retard de développement, léthargie, hypoglycémie, acidose métabolique
Chaîne longue-acyl-CoA déshydrogénase	FAD	Béta-oxydation	Cardiomyopathie hypoglycémie, hépatopathie, intolérance à l'effort et une rhabdomyolyse
Chaîne très longue acyl-CoA déshydrogénase	FAD	Béta-oxydation	Cardiomyopathie hypoglycémie, hépatopathie, intolérance à l'effort et une rhabdomyolyse

Isobutyryl-CoA déshydrogénase	FAD	Dégradation valine.	Cardiomyopathie, anémie, retard staturo-pondéral
Chaîne longue insaturée-acyl-CoA déshydrogénase (complexe I de protéine chaperonne)	FAD	Béta-oxydation	
Chaîne longue et ramifiée-acyl-CoA déshydrogénase	FAD	Béta-oxydation	Défaut de synthèse des acides biliaires
C22-longue-chaîne-acyl-CoA déshydrogénase	FAD	Béta-oxydation	Cardiomyopathie hypoglycémie, hépatopathie, intolérance à l'effort et une rhabdomyolyse
D-aspartate oxydase	FAD	Dégradation aspartate	Schizophrénie
L- acide aminé oxydase	FAD	Oxydation des L-amino-acides	Cardiomyopathie
D- acide aminé oxydase	FAD	Oxydation des D-amino-acides	Schizophrénie, Sclérose latéral amyotrophique
Monoamine oxydase	8a-(n3-His)-FAD	Oxydation de neurotransmetteur	Syndrome de Brunner*, comportement antisocial et autistique
Pyridoxal 5'-phosphate oxydase	FMN	Métabolisme vitamine B6	Encéphalopathie, épilepsie
Catécholamine oxydase (rénalase)	FAD	Oxydation	Hypertension
5,10-Méthylène-tétrahydrofolate réductase	FAD	Métabolisme folate.	Homocystinurie*, défaut du tube neural, schizophrénie
L-pipecolate oxydase	8a-(n3-His)-FAD	Dégradation de la lysine	Dysfonctions neurologiques sévères
Spermine oxydase	FAD	Biosynthèse de spermidine	Carcinome gastrique
Flavoprotéine transférant électron ubiquinone oxydoréductase	FAD	Transport électron	Acidémie glutarique IIC
Flavoprotéine transférant électron	FAD	Transport électron	Acidémie glutarique IIA, IIB
Sarcosine déshydrogénase	8a-(n3-His)-FAD	Dégradation choline.	Sarcosinémie*
Diméthylglycine déshydrogénase (DMGDH)	8a-(n3-His)-FAD	Dégradation choline.	Déficit en DMGDH-
Histone déméthylase lysine-spécifique	FAD	Transcription ADN	Fente palatine, retard psychomoteur
Proline déshydrogénase 1	FAD	Métabolisme acides aminés	Hyperprolinémie type I, schizophrénie
Cytochrome-b5 réductase	FAD	Métabolisme hème.	Méthémoglobinémie type I et II
NADPH-hémoprotéine réductase (cytochrome P450 réductase)	FMN	Donneur d'électron aux enzymes du cytochrome P450	Syndrome d'Antley-Bixler, désordre stéroïdogenèse
NAD(P)H déshydrogénase (quinone)	FAD	Détoxification quinone, dégradation p53	Toxicité benzène, cancer du sein
NADH-ubiquinone oxydoréductase du complexe I, sous unité UQOR1	FAD	Transport électron	Myopathies, maladie de Parkinson, syndrome de Leigh*
Diflavine oxydoréductase 1 dépendant NADPH	FMN	Chaîne mitochondriale respiratoire	Cancers
ARNt dihydrouridine synthase	FMN	Réduction uridine	Létal
Dihydrolipoyl déshydrogénase	FAD	Métabolisme énergie	Syndrome de Leigh*, maladie du sirop d'érable*
Glutathion-disulfide réductase	FMN	Détoxification	Anémie hémolytique

Thioredoxin-disulfide réductase	FAD	Régulation par oxydo-réduction des facteurs de transcription	Carence familiale en glucocorticoïdes
Flavoprotéine du réticulum endoplasmique associée à la dégradation	FAD		
Sulfhydryl oxydase	FAD	Balance redox disulfide	Myopathie, cataracte, retard de développement, perte de l'audition
Prenylcysteine oxydase	FAD	Rupture de liaison C-S	Maladies cardiovasculaires
Ribosyldihydronicotinamide déshydrogénase	FAD	Détoxification quinone	Susceptibilité de cancer du sein
Flavine monoxygénases	FAD	Détoxification	Triméthylaminurie : odeur caractéristique de poisson (sueur, urine, haleine)
Kynurénine 3-monoxygénase	FAD	Catabolisme du tryptophane, nicotinamide adénine dinucléotide	Schizophrénie
Oxyde nitrique synthase	FMN	Vasodilatation	Hypertension
Squalène monoxygénase	FAD	Biosynthèse du cholestérol	
Monoxygénase 6 du coenzyme Q10.	FAD	Biosynthèse coenzyme Q10.	Carence coenzyme Q10, syndrome néphrotique, surdité
Ferriréductase (biliverdine IX bêta réductase)	FMN	Dégradation de l'hème	Ictère
Méthionine synthase réductase	FMN	Biosynthèse méthionine.	Carence en cobalamine, homocystinurie, défaut tube neural
Ferrédoxine-NADP+ réductase	FAD	Biosynthèse des stéroïdes, vitamine D, acides biliaires	Neuropathie auditive et atrophie optique
NAD(P)H oxydase cytochrome b(558), sous unité bêta	FAD	Génération de superoxyde	Maladie granulomateuse chronique, mycobactériose atypique
Thyroïde oxydase / dual oxydase 2	FAD	Biosynthèse hormone thyroïdienne	Dyshormonosynthèse thyroïdienne
Acétolactate synthase	FAD	Synthèse valine, leucine, isoleucine	
Alkyldihydroxyacétone phosphate synthase	FAD	Biosynthèse lipidique	Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique type 3
4'-Phosphopantothénylcysteine décarboxylase	FMN	Synthèse du coenzyme A	Létal
Cytochromes	FAD	Biosynthèse d'hormones stéroïdiennes, métabolisation xénobiotiques...	Syndrome ovarien polykystique, infertilité, syndrome d'Antley-Bixler*...
Protéine induisant l'apoptose	FAD 6-OH-FAD	Control redox	Syndrome de Charcot, surdité liée à l'X
Iodotyrosine désiodase	FMN	Désiodation de la mono- et di-iodotyrosine	Dyshormonosynthèse thyroïdienne type 4
protéine interagissant avec CasL guidant l'axone	FAD	Orientation cytosquelette, trafic vésiculaire	Anomalie organisation cellulaire et du cytosquelette (souris KO)
Oxydoréductase FAD-dépendent (molécule chaperonne du complexe 1)	FAD	Molécule chaperonne	Carence en complexe I syndrome de Leigh*
Transporteur riboflavine	RF	Internalisation de riboflavine	Syndrome de Brown-Vialetto-Van Laere et syndrome de Fazio-Londe*
Riboflavine / FMN réductase	FMN	Oxydation flavines	Cardiomyopathies
Riboflavine kinase	RF	Phosphorylation RF	Létale
FAD synthétase	FMN	Adénylation de la FMN	Myopathie de stockage des lipides

2. Utilisation des flavines dans la santé et en pharmacie entre 2008-2018

La base de données Scopus permet d'étudier le nombre de publications qui comportent les mots « riboflavine » ou « flavine » dans leur titre en fonction des domaines de recherche d'appartenance (Figure 5). On constate qu'au cours de cette période, 56 % des articles concernent le domaine de la santé (teintés en bleu), alors que les 44 % suivants concernent des sciences plus fondamentales (colorés en vert). La biochimie, la génétique et la biologie moléculaire (22 %) ainsi que la médecine (17 %) représentent une part prépondérante dans la santé. L'immunologie et la microbiologie (6 %), la pharmacologie, la toxicologie et la pharmacie (5 %) et les neurosciences (3%) représentent un nombre de publications moins important.

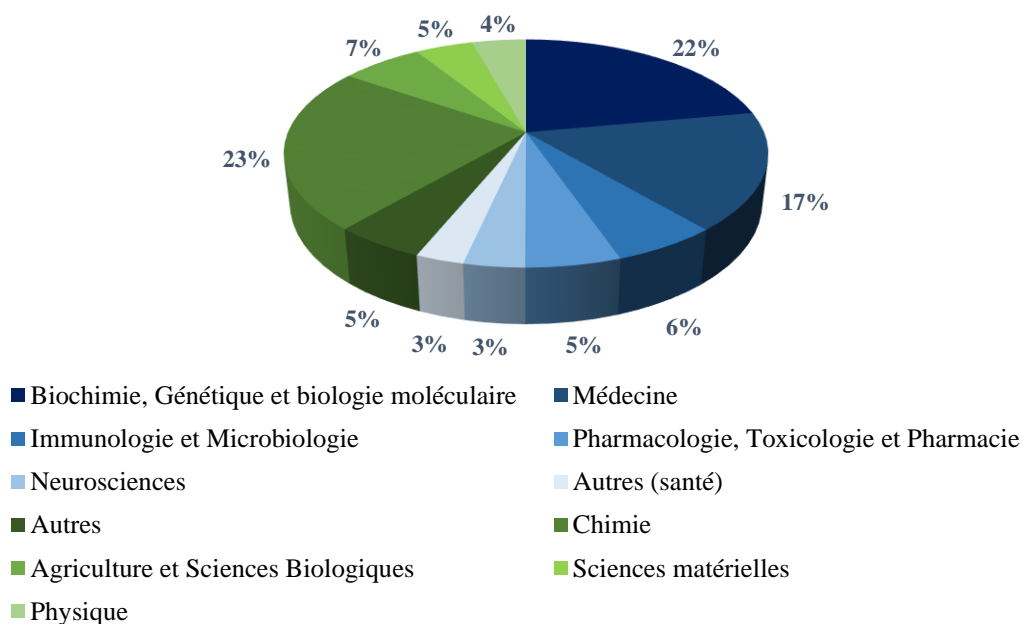


Figure 5 : Répartition des articles publiés entre 2008 et 2018 selon les domaines d'intérêt (Scopus)

Cette veille scientifique présente les travaux utilisant les flavines selon les propriétés physico-chimiques et biologiques mises en jeu ainsi que des applications médicales considérées. Les principaux domaines exposés consistent en la destruction de cellules, micro-organismes et virus. Par la suite, les applications des flavines dans l'ingénierie tissulaire sont exposées. Cette partie s'achève en expliquant d'autres perspectives de traitements utilisant les flavines.

2.1. Destruction de cellules, micro-organismes, virus

2.1.1. Applications anti-cancéreuses

2.1.1.1. Généralités sur les cancers

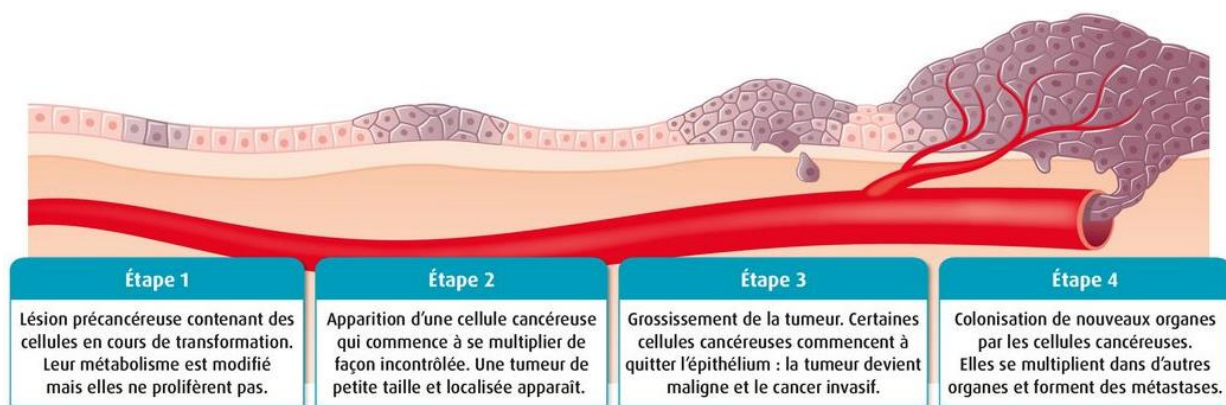
Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), « le cancer est un terme générique appliqué à un grand groupe de maladies pouvant toucher une partie quelconque de l'organisme. Les autres termes employés sont ceux de tumeurs malignes et de néoplasmes. L'une des caractéristiques définissant le cancer est l'apparition rapide de cellules anormales dont la croissance s'étend au-delà de leurs limites habituelles et qui peuvent alors envahir des zones voisines de l'organisme et se propager à d'autres organes. Il est fait référence à ce processus sous le terme de dissémination métastatique. Les métastases sont la principale cause de décès par cancer. » (36). D'un point de vue médical, le cancer représente un groupe de pathologies hétérogènes, très différentes les unes des autres.

L'Homme est constitué de différents types cellulaires organisés en tissus. Ces cellules, dont les fonctions sont bien définies, ont un cycle de vie au cours duquel elles naissent lors d'une mitose par division cellulaire, se développent puis meurent de façon programmée lors de l'apoptose. Il arrive qu'au cours de la mitose, surviennent des mutations de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) qui sont des erreurs de réplication. Si ces erreurs ne sont pas réparées, elles s'accumuleront au cours des divisions cellulaires successives et pourront être à l'origine du processus de cancérisation : des cellules précancéreuses deviendront alors cancéreuses (37).

Les mutations sont liées à des facteurs de risques qui peuvent être externes tels que le mode de vie (tabac, alcool, alimentation...), l'exposition à des produits chimiques (benzène...), à des agents physiques (rayonnements nucléaires ou solaires, inhalation de poussières, microparticules...) ou à des virus (Papillomavirus humain et cancer du col de l'utérus, *Helicobacter pylori* et cancer de l'estomac, Virus Hépatite B et C et cancers hépatiques...). Il est possible d'agir sur ces facteurs en vue de diminuer leur incidence (hygiène de vie, campagne de vaccination, dépistages...). En revanche, il n'est pas possible d'influencer les facteurs internes comme l'âge (l'incidence des cancers augmente chez les personnes âgées), l'hérédité (certaines mutations peuvent être transmises dès la fécondation des gamètes si les parents sont porteurs de mutations germinales) (38).

Il existe différentes mutations : les mutations ponctuelles entraînent des variations légères de l'ADN qui peuvent être sans conséquence et participent au polymorphisme. Les mutations ponctuelles peuvent aussi engendrer des mutations plus complexes lorsqu'elles atteignent une séquence codante. Il existe également des anomalies avec des effets plus graves comme les insertions (ajout d'un ou plusieurs nucléotides), les délétions (perte d'un ou plusieurs nucléotides), les translocations (échanges de portions de chromosomes). Ces anomalies induisent le processus de cancérisation des cellules lorsqu'elles atteignent les gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN lésé ou lorsqu'elles activent des proto-oncogènes (qui favorisent la prolifération cellulaire) ou par la répression de gènes suppresseurs de tumeur (qui freinent la prolifération cellulaire) (39).

Cette première étape où survient une lésion importante de l'ADN s'appelle l'initiation (Figure 6, Étape 1). Par la suite, lors de l'étape de promotion, la cellule transformée se développe et prolifère localement et forme un groupe de cellules transformées (Étape 2). La dernière étape est la progression au cours de laquelle ces cellules pourront se multiplier de façon anarchique et seront disséminées dans la circulation sanguine ou lymphatique, jusqu'à envahir d'autres organes (Étape 3). Ainsi, ces cellules se multiplieront et formeront de nouvelles masses de cellules tumorales, appelées métastases (Étape 4).



© Belin Éducation/Humensis, 2019 SVT 1re enseignement de spécialité
© Amandine Wanert

Figure 6 : Les étapes de formation d'un cancer (40)

Les cellules cancéreuses acquièrent des caractéristiques comme la capacité de se diviser indéfiniment, en échappant au processus d'apoptose car elles deviennent indépendantes des

signaux qui régulent leur croissance et leur division. Du fait de leur division cellulaire plus importante, ces cellules ont un métabolisme accru, notamment en oxygène et en nutriment (glucose, vitamines...). Les cellules vont permettre l'angiogenèse, c'est à dire la formation de néovaisseaux afin d'assurer son irrigation. De plus, les cellules cancéreuses se différencient et perdent les caractéristiques de leur tissu d'appartenance, ce qui constitue un critère d'agressivité de la tumeur. Le système immunitaire permet d'éliminer les cellules cancéreuses reconnues comme « étrangères » ; cependant s'il n'y parvient pas, le cancer se développe (41).

Les cancers sont classifiés en fonction de leur histologie. Les carcinomes sont localisés dans les épithéliums (adénocarcinomes du sein ou de la prostate). Les sarcomes sont retrouvés au niveau des tissus mous (tissus adipeux, muscles, vaisseaux, viscères) ou des tissus de soutien (os, cartilage). Les cancers hématopoïétiques affectent la moelle osseuse, le sang ou les organes lymphoïdes (42). D'un point de vue clinique, les cancers sont également classés en quatre stades de gravité croissante qui prennent en compte la taille et le volume tumoral ; mais aussi si la tumeur est localisée ou s'il y a un envahissement ganglionnaire ou si des métastases sont disséminées dans l'organisme. Néanmoins, plus un cancer est diagnostiqué précocement, meilleures seront les chances de survie (43).

Les cancers sont diagnostiqués chez les patients sur la base d'examen anatomopathologiques qui consistent en l'analyse visuelle d'un échantillon prélevé par biopsie. De plus en plus, ces résultats sont corrélés par la mesure de biomarqueurs spécifiques des cellules cancéreuses d'un type de cancer donné. Ces marqueurs biologiques sont des molécules excrétées en faible quantité dans le sang et dont le dosage se fait sur un prélèvement sanguin (43). D'autres techniques, comme le séquençage de gènes peuvent être intéressantes pour des formes plus rares de cancer afin de déterminer la nature d'une mutation.

La prise en charge peut varier en fonction du type de cancer, de son stade, de l'âge et la condition physique du patient. Les principaux traitements actuels sont :

- la chirurgie qui permet d'extraire la masse tumorale et l'ablation de ganglions,
- la chimiothérapie qui utilise de petites molécules appartenant notamment aux classes des agents intercalants, des poisons du fuseau, des alkylants, des antimétabolites afin de tuer les cellules cancéreuses,

- la radiothérapie qui consiste à délivrer localement des rayons ou des radiations ionisantes pour éliminer les cellules cancéreuses,
- l'hormonothérapie qui s'adresse aux patients ayant un cancer hormono-dépendant afin de ralentir sa croissance,
- les thérapies ciblées et biothérapies qui sont des traitements plus récents qui permettent une médecine « personnalisée ». Ces traitements sont administrés en fonction des cancers et des marqueurs exprimés par les cellules tumorales. Ces traitements présentent l'avantage d'induire moins de traitements indésirables que les chimiothérapies.

La prise en charge médicamenteuse s'intéresse également à l'atténuation des effets indésirables provoqués par les traitements (antiémétiques, antidiarrhéiques...) et à diminuer la douleur afin d'améliorer le confort du patient. Par ailleurs, la prise en charge psychologique est capitale pour les accompagner et les aider (44).

Dans le monde, l'incidence des cancers s'élève à 18,1 millions de nouveaux cas et la mortalité à 9,6 millions de décès, en 2018. En France, l'incidence des cancers représentait 382 000 nouveaux cas (54 % d'hommes et 46 % de femmes) ce qui représente une baisse de 1,4 % chez les hommes et une légère hausse +0,7 % par an chez les femmes. La mortalité s'élève à 157 400 décès en 2018 (57 % d'hommes et 43 % de femmes) où elle a diminué respectivement de 2,0 et 0,7 % par an, depuis 2010. L'incidence et la mortalité des principaux cancers en fonction du sexe sont répertoriées (Tableau 2). Il est intéressant de noter que la survie à 5 ans des patients s'est améliorée en 2010 par rapport à 1990 grâce à des diagnostics plus précoces et l'apparition de nouveaux traitements (45,46).

Tableau 2 : Incidence et mortalité des principaux cancers selon le sexe, en France, en 2018 (45,46)

	Incidence (nombre de nouveaux cas en 2018)	Mortalité (nombre de décès en 2018)
Homme	Prostate (50 000)	Poumon (23 000)
	Poumon (31 000)	Colorectal (9 000)
	Colorectal (23 000)	Prostate (8 000)
Femme	Sein (58 000)	Sein (12 000)
	Colorectal (20 000)	Poumon (10 000)
	Poumon (15 000)	Colorectal (8 000)

Il est curieux d’observer qu’il existe des disparités géographiques pour certains cancers au sein du territoire français. Les cartes (Figure 7) montrent le rapport de l’incidence ou la mortalité d’un département par rapport aux données nationales. Les départements en vert présentent donc des données inférieures aux données nationales contrairement aux départements en rouge. Par exemple, on constate une sur-incidence des cancers du poumon chez les femmes dans le sud de la France et une surmortalité des cancers de la thyroïde chez la femme dans le nord-est, entre 2007 et 2016, selon un rapport publié par Santé Publique France (47).

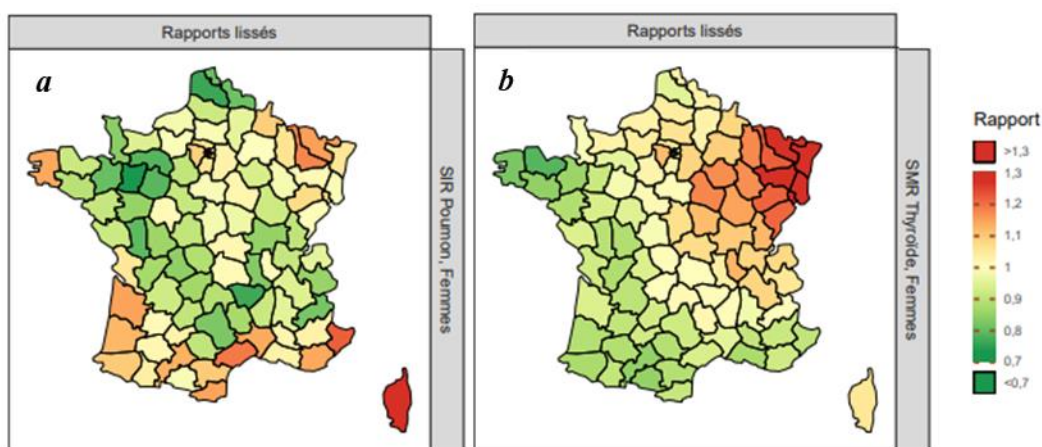


Figure 7 : a°) Incidence cancer du poumon chez la femme, b°) Mortalité cancer de la thyroïde chez la femme (47)

2.1.1.2. Relation entre cancer et riboflavine

Comme énoncé précédemment, les cellules cancéreuses ont un métabolisme accru. De ce fait, ces cellules surexpriment certains récepteurs et notamment les récepteurs à la RF. Ainsi, il a été constaté, dans plusieurs études, que les récepteurs RFVT-2 et surtout RFVT-3, étaient surexprimés au niveau des cancers du sein (48), de la prostate (49), du col de l’utérus (50,51), de l’œsophage (52–54), de l’estomac (55), du poumon (56) et du gliome (57).

Au cours d’une étude, A. Hasimu et son équipe ont cherché les mécanismes moléculaires impliqués dans cette augmentation du nombre de récepteur RFVT. Dans le cadre des cancers du col de l’utérus, il a été observé que l’hyperméthylation de l’ADN au niveau de deux zones qui contiennent des îlots CpG (riches en cytosines et en guanines) de la région promotrice du gène codant pour RFVT-3 avait pour conséquence la surexpression de ce récepteur (50).

L.-Y. Xu et son équipe ont souligné l'importance de l'inflammation dans les cancers de l'œsophage et du poumon. En effet, le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) qui est une cytokine inflammatoire active une protéine anti-apoptotique, le Nuclear Factor kappa B (NF- κ B). Une fois activé, ce facteur de transcription migre au niveau du noyau de la cellule et favorise la transcription et l'expression du récepteur RFVT-3 (53). De plus, les faibles taux plasmatiques en RF ont pour conséquence la surexpression des récepteurs RFVT-3. Cela engendre une diminution de la production des protéines P21 et P27 dont le rôle est de stopper le cycle cellulaire par inhibition des Cycline-Dependent Kinases 4 (CDK4). Dès lors, le cycle cellulaire est activé et la prolifération devient incontrôlée par levée de l'inhibition des CDK-4 et d'autres protéines activatrices (58).

L'équipe de M.-C. Yin avance que des apports itératifs en RF conduisant à des concentrations plasmatiques supérieures à 200 μ mol/l favorisent le processus de cancérisation en activant la production d'interleukine 6 (IL-6) et de TNF- α . Ces cytokines inflammatoires, activent plusieurs voies de signalisation (NF- κ B, Focal Adhesion Kinase (FAK), Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK...)) connues pour être impliquées dans la prolifération, l'invasion et la migration cellulaire ainsi que la formation de métastases. Cependant cette concentration plasmatique semble difficilement atteignable (plus d'un millier de fois supérieure aux concentrations physiologiques), notamment du fait de l'élimination rénale (56).

Par ailleurs les résultats recueillis par les équipes de H. Upur et L.-Y. Xu suggèrent que le manque de RF est assez fréquent chez les patients atteints de pathologies cancéreuses. Ceci peut s'expliquer par une diminution de l'alimentation suite à une perte d'appétit ou à cause de la douleur, par une diminution de l'absorption et de la distribution de la RF ou par une augmentation de l'efflux plasmatique de la RF (51,52). Le manque de RF peut être considéré comme facteur de mauvais pronostic, notamment lors du processus de cancérogenèse du cancer du col de l'utérus. En effet, de faibles concentrations plasmatiques et tissulaires semblent être inversement corrélées avec une infection à HPV 16 ou 18 (Human Papillomavirus) (51). De la même manière, les patients atteints d'un cancer de l'œsophage présentent globalement des taux plasmatiques amoindris en RF. En revanche, les patients ayant un cancer de l'œsophage avec des taux plus élevés en RF ont une espérance de vie plus élevée avec moins de chance de rechute et de développer des métastases (52,59).

Il a également été observé lors des cancers du sein, de la prostate androgène dépendants ou indépendants et les adénocarcinomes hépatiques, une surexpression plasmatique de la RCP, qui permet le transport de la RF. Cette protéine pourrait constituer un biomarqueur dont le dosage permettrait de diagnostiquer précocement ces pathologies cancéreuses (49).

L'ensemble des informations actuellement disponibles sont assez hétérogènes car il s'agit de travaux qui concernent un phénomène ponctuel jouant un rôle dans la cancérisation d'un type cellulaire donné. Ces travaux préliminaires demandent à être confirmés par d'autres études afin de mieux comprendre le rôle des récepteurs RFVT lors du processus de cancérisation et afin de déterminer si les causes de sa surexpression pourraient être généralisées à plusieurs types de cancers ou s'il s'agit de phénomènes très spécifiques.

Par ailleurs, l'internalisation de la RF a été étudiée sur des cellules d'adénocarcinome mammaire (Figure 8). La RF se lie aux récepteurs RFVT. Par la suite, les clathrines qui sont des protéines permettant l'invagination membranaire sont recrutées afin d'internaliser le ligand et son récepteur par endocytose dans des endosomes précoces. Ces vésicules peuvent soit repartir en surface soit fusionner avec un lysosome pour former des lysosomes tardifs. Le milieu intra vésiculaire est acidifié (diminution du pH de 6 à 5) grâce à l'influx de protons *via* des pompes à proton et induit la dissociation de la RF et son récepteur. Par la suite, les récepteurs sont recyclés, une partie de la RF est utilisée par le flavoprotéome et une partie est dégradée. La connaissance des mécanismes d'internalisation de la RF pourrait permettre d'utiliser la RF comme agent de vectorisation d'un principe actif afin de le conduire préférentiellement au niveau des cellules cancéreuses et ainsi de diminuer les effets indésirables dus à un manque de sélectivité (48).

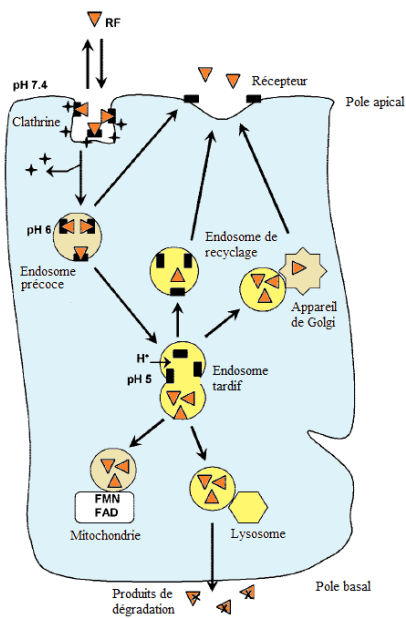


Figure 8 : Schéma d'internalisation de la RF dans une cellule (48)

2.1.1.3. Interactions entre les flavines et l'ADN

Les flavines peuvent interagir avec les bases nucléiques dans la double hélice d'ADN étant donné que le cycle isoalloxazine des flavines est plan. Il a été observé que la RF était capable de reconnaître et s'intercaler au niveau des mésappariements entre guanines et thymines (G-T). Ces mésappariements sont dus à la 5-méthylcytosine qui représente jusqu'à 8 % de la cytosine totale contenue dans l'ADN. Ces bases nucléiques sont sujettes à une désamination spontanée, formant la thymine. Il a été constaté que ces mésappariements étaient 100 à 1000 fois plus fréquents au sein de 18 % des tumeurs solides et 10 % des leucémies. Ainsi, la RF peut créer des liaisons hydrogènes avec la guanine et des interactions de type π -stacking avec la thymine et les autres bases nucléiques environnantes (Figure 9). Ces thymines, dont la disposition est défavorable, peuvent être clivées et forment des sites abasiques ou apuriniques/apyrimidiqes (60).

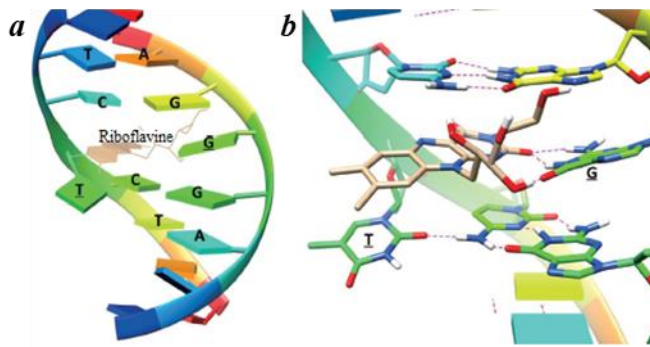


Figure 9 : Mésappariement G-T qui permet l'intercalation de la RF ; b°) Grossissement sur les liaisons hydrogènes et π -stacking avec la RF (60)

Par ailleurs, l'équipe de N. Teramae a rapporté que les sites abasiques peuvent être la cause de mutations en cas de non-réparation de l'ADN. De ce fait, l'ADN polymérase lors de la réplication insère aléatoirement une des quatre bases nucléiques. L'hydrolyse des bases nucléiques se fait physiologiquement cependant, le nombre de sites abasiques est augmenté lors d'une irradiation. Ces sites abasiques sont de nature hydrophobe et présentent une affinité plus importante pour la lumiflavine que pour la RF, du fait de l'encombrement stérique apporté par la chaîne ribityle (Schéma 4a). Il a donc été constaté par modélisation moléculaire que ces flavines se lient par effet hydrophobe, π -stacking avec les bases nucléiques environnantes (et plus particulièrement les guanines qui juxtaposent le site abasique) et par liaisons hydrogènes (de manière plus stable avec la thymine). En effet, les liaisons hydrogènes formées avec la thymine nécessitent une énergie supérieure pour induire leur rupture car ces liaisons formées avec « le motif uracile » des flavines (en orange, Schéma 4b) leur permettent de se loger au sein de la double hélice d'ADN de manière plus favorable (61).

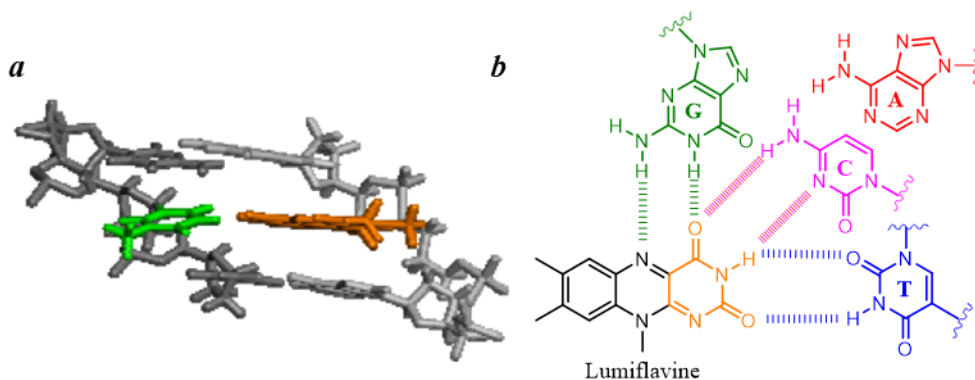


Schéma 4 : a°) Interaction de la thymine (vert) et de la lumiflavine (orange), insérée dans un site abasique ; b°) Représentation des liaisons hydrogènes formées entre les bases de l'ADN (A, T, C, G) et la lumiflavine (61)

R. Pei et son équipe se sont intéressés aux interactions entre la RF et les G-quadruplexes (Figure 10) (62). Les G-quadruplexes sont des structures de l'ADN riches en guanines. Quatre guanines forment des structures planes appelées quartets. Ainsi, plusieurs quartets adoptent une conformation secondaire et s'empilent pour former les G-quadruplexes. Ces structures sont stabilisées par des cations sodium ou potassium. Ces séquences riches en guanines sont impliquées dans la réplication de l'ADN mais elles sont aussi retrouvées dans le génome humain au niveau des télomères à l'extrémité des chromosomes, au niveau de régions promotrices de gène où elles participent à la gestion et la régulation de ces gènes.

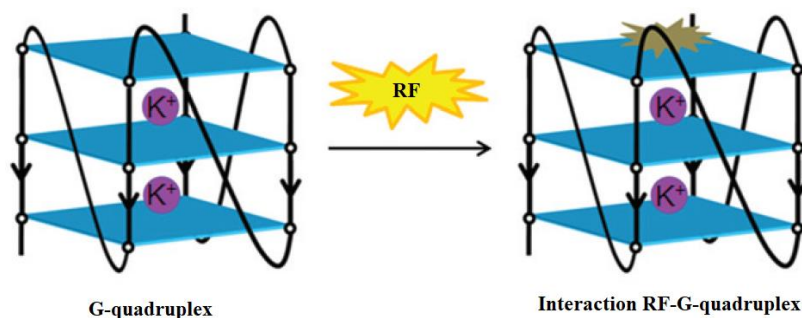


Figure 10 : Interaction entre la RF et le G-quadruplex (62)

Les télomères sont des régions non codantes qui protègent l'ADN. Lorsque les séquences codantes sont endommagées, la cellule meurt. Cependant dans le cadre de pathologies cancéreuses, la télomérase (enzyme synthétisant les télomères) est surexprimée. Ce mécanisme permet de synthétiser de nouveau le télomère et inhibe la mort des cellules cancéreuses. Cette enzyme constitue donc une cible de traitement afin d'empêcher la survie et la prolifération cellulaire. L'objectif est de bloquer la télomérase d'accéder aux télomères en stabilisant les G-quadruplexes et en empêchant le dépliement de l'ADN, grâce à des ligands qui stabilisent ces structures (63).

L'équipe de R. Pei s'est intéressée aux interactions de la RF avec les G-quadruplexes et a montré une extinction de la fluorescence qui est quenchée par les guanines du G-quadruplexe (62). Il pourrait également être envisagé de synthétiser des ligands ayant un motif isoalloxazine afin de contrarier la télomérase.

2.1.1.4. Thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique antitumorale utilise la combinaison de la lumière, d'un photosensibilisateur et de l'oxygène, en vue de détruire sélectivement des tissus cancéreux de tumeurs solides. Cette technique est d'ores et déjà utilisée dans le traitement de certains cancers cutanés du fait qu'elle permet une destruction sélective des cellules cancéreuses. Il est ainsi possible d'épargner les tissus sains et d'atténuer certains effets indésirables chez le patient (60).

La RF est un des photosensibilisateurs naturels les plus prometteurs et efficaces. Néanmoins, les mécanismes moléculaires régissant ce phénomène restent à élucider afin de mieux comprendre ces processus. Cependant, nous savons que la RF, sous l'effet d'une irradiation dans le domaine de l'UV-visible (ultraviolet-lumière bleue), induit la mort cellulaire en générant un stress oxydatif au niveau de l'ADN, par exemple. Deux mécanismes aboutissent à la destruction de la cellule : le mécanisme de type I (réaction de la $^3\text{RF}^*$ directement avec un substrat, comme les bases nucléiques) et le mécanisme de type II (réaction de la $^3\text{RF}^*$ avec le O_2 , formant l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ qui est une espèce très réactive permettant par exemple le photoclivage de l'ADN) (60) (cf. 1.2. Propriétés physico-chimiques).

Sous l'effet d'un photosensibilisateur irradié, les bases pyrimidiques (cytosine, thymine et uracile) et de manière plus significative les bases puriques (adénine, xanthine, hypoxanthine et surtout la guanine) sont lésées au sein des ARN (Acide RiboNucléique) et de l'ADN. De nombreux peptides et protéines (récepteurs, enzymes, hormones ...) perdent leur fonction du fait que plusieurs acides aminés comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la méthionine subissent une photodégradation. Les lipides insaturés sont détériorés en lipides peroxydés au niveau de la membrane plasmique et de la membrane des organites et des vésicules intracellulaires. Cela engendre également l'oxydation de vitamines et molécules phénoliques antioxydantes telles que l'acide ascorbique, l'acide folique, la thiamine, le pyridoxal, les tocophérols ou les polyphénols (28).

C.V. Ferreira et son équipe proposent des mécanismes moléculaires impliqués dans des voies de signalisation qui induisent la mort de cellules de mélanome lorsqu'elles sont traitées par thérapie photodynamique avec la RF (Figure 11). D'après les expériences menées *in vitro* et les observations par Western blot, ils suggèrent que la capacité de migration est atténuée du fait de l'inhibition des Métalloprotéinases Matricielles 9 et 2 (MMP-9 et MMP-2). De plus, les voies de

transduction du signal activant les protéines AKT (serine/thréonine kinase) et Ras (tyrosine kinase) *via* la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) sont inhibées, diminuant la survie et l'invasion cellulaire. La voie Sonic HedgeHog (SHH) est aussi impactée et diminue la formation de métastases et l'angiogénèse. L'ensemble de ces réactions génère un stress oxydatif et conduit à l'apoptose des cellules par l'inhibition de Bcl-2 qui par levée d'inhibition de Bax permet le relargage de cytochrome C activant les caspases (64).

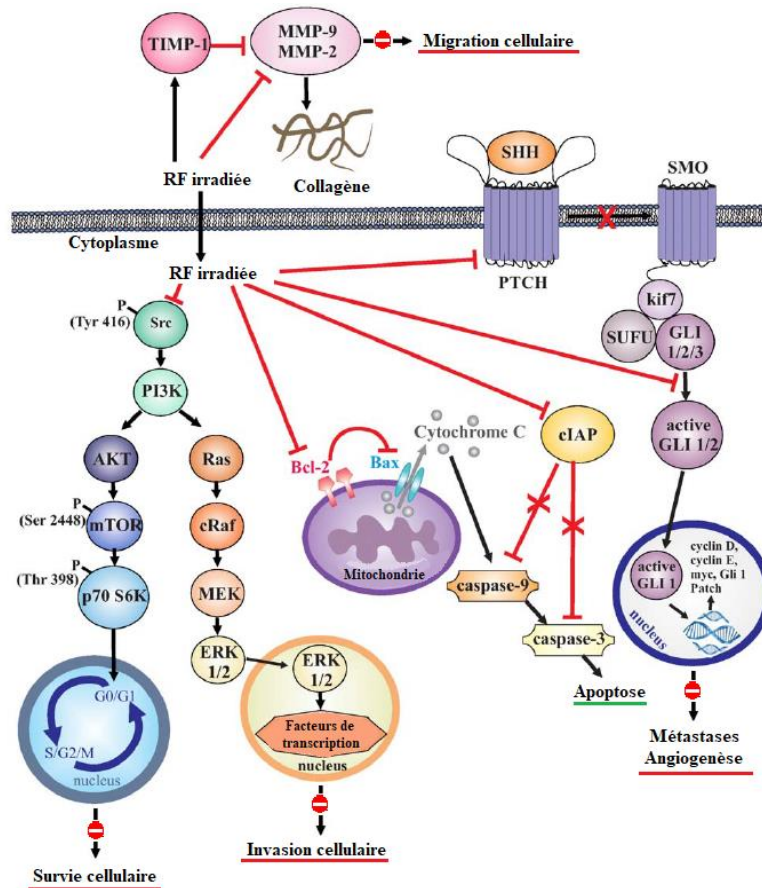


Figure 11 : Représentation des voies de signalisation impactées par la RF* afin de diminuer l'agressivité de cellules de mélanome (B16F10)(64)

2.1.1.5. Mise au point de principes actifs à base de flavines

Les nanoparticules ont une taille comprise entre un et quelques centaines de nanomètres. L'intérêt d'utiliser ces nanoparticules en médecine consiste à exploiter l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). En effet, les vaisseaux formés au cours de l'angiogénèse ont une perméabilité augmentée aux nanoparticules grâce à la présence de pores. De plus, le drainage lymphatique au sein des tumeurs étant inefficace, ces nanoparticules peuvent s'accumuler dans des

tissus cancéreux afin de libérer localement des principes actifs cytotoxiques et diminuer leurs effets indésirables. Les nanoparticules permettent donc un ciblage passif des tissus tumoraux (Figure 12) (65,66). Cependant l'effet EPR est controversé étant donné que la morphologie des tumeurs varie pour un type de cancer donné. On observe également des variabilités subrégionales au sein d'une même tumeur. En effet, cette hétérogénéité provient de la formation de fibrose qui empêcherait la diffusion et la pénétration de nanoparticules en profondeur dans l'environnement tumoral (67).

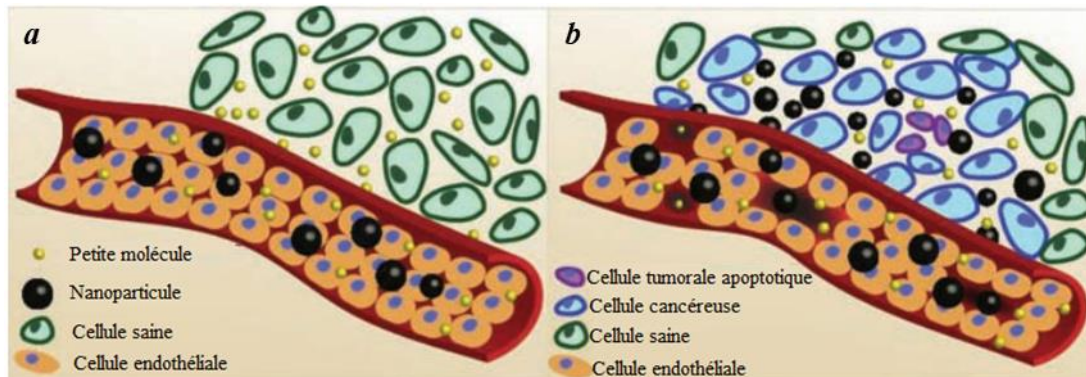


Figure 12 : Illustration de l'effet EPR et de la diffusion de particules selon leur taille a°) Dans un tissu sain; b°) Dans un tissu tumoral (66)

- Vectorisation de nanoparticules

F. Kiessling et son équipe ont montré qu'il était possible de majorer significativement l'internalisation de polymères lorsqu'ils étaient liés à la RF, au sein de tumeurs. Les polymères d'intérêt sont le polyéthylène glycol (PEG) de 10 et 40 kDa. Il a été observé que le PEG 10 kDa s'accumulait davantage dans les cellules cancéreuses que dans les macrophages ou cellules endothéliales angiogéniques alors que le PEG 40 kDa est principalement internalisé par les macrophages et cellules tumorales. Il est également avancé que l'internalisation dans les macrophages n'est pas un inconvénient étant donné que ces cellules agissent comme des réservoirs, capables de libérer localement les nano-objets de manière différée (67).

C. Giovannangeli et son équipe ont proposé de vectoriser des acides nucléiques peptidiques par la RF. Ces molécules miment la structure de l'ADN mais elles sont reliées à une chaîne centrale de nature peptidique. Ces molécules sont développées et utilisées lors de thérapies antisens (interaction avec un ARNm afin d'inhiber sa traduction et l'expression des protéines ciblées). Elles présentent l'avantage d'être résistantes à la dégradation enzymatique des protéases et des

nucléases. Cependant, ces molécules sont très hydrophiles et n'ont pas la capacité de traverser la membrane cytoplasmique. La liaison de la RF à ces acides nucléiques peptidiques a permis leur internalisation au sein de cellules cancéreuses et de les retrouver plus spécifiquement dans des endosomes et lysosomes. L'utilisation de chloroquine connue pour lyser les endosomes, a permis la libération des acides nucléiques peptidiques dans la cellule afin qu'ils puissent agir avec leur cible (68).

L'équipe de J.R. Baker Jr et celle de J. Luo se sont intéressées à la vectorisation de principes actifs anticancéreux par des dendrimères décorés de RF. Les dendrimères sont des macromolécules synthétisées à partir de polymères qui forment une arborescence. A l'extrémité des ramifications sont fonctionnalisées des molécules permettant le ciblage comme la RF et le traitement cytotoxique comme le méthotrexate (69) et la doxorubicine (70). De multiples interactions entre les molécules RF décorant les dendrimères et les récepteurs RFVT surexprimés sur les cellules cancéreuses ont permis d'observer une internalisation accrue et une cytotoxicité importante et spécifique (69,70). Par ailleurs, K. Sinniah et son équipe se sont intéressés à l'influence de la position de conjugaison de la RF aux dendrimères sur l'affinité à la RCP. La RF a donc été reliée aux dendrimères au niveau de l'atome N3 ou sur l'alcool primaire de la chaîne ribityle (Figure 13). Il a été observé que l'affinité pour la RCP de la RF conjuguée était moins importante que celle de la RF libre et que l'affinité était diminuée lorsque le nombre de RF liées augmente ou encore que la RF était liée au niveau de son alcool primaire. Cela montre l'importance de cet alcool lors de l'interaction avec la RCP (71).

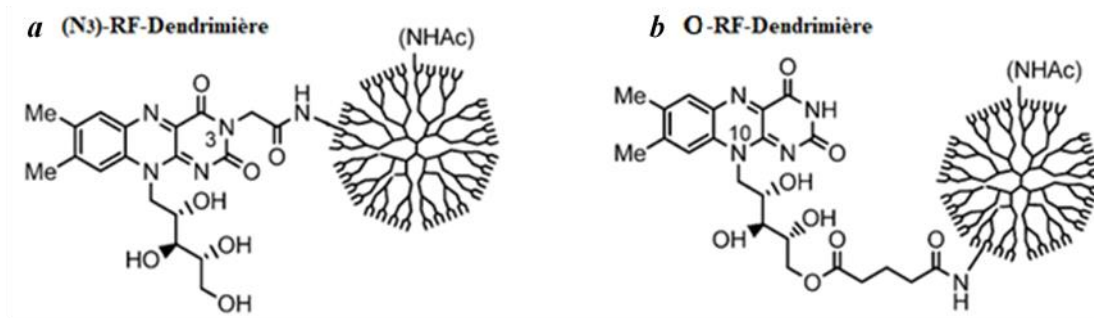


Figure 13 : RF conjuguées au dendrimère a°) via son N3 ; b°) via son N10 (71)

I. Bestel et son équipe sont parvenues à synthétiser des phospholipides en reliant la RF *via* une liaison phosphodiester à un glycérol lié à deux chaînes grasses. D'autres phospholipides

comportant un espaceur PEG entre la tête flavine et la partie phosphate ont été synthétisés et introduits à hauteur de 1 % dans des liposomes (Figure 14). Les liposomes sont des auto-assemblages sphériques constitués d'une bicouche de phospholipides. L'utilisation du PEG permet de rendre les liposomes furtifs, dans la circulation sanguine et de ralentir leur élimination. Ainsi l'accumulation de ces formulations dans les cellules tumorales ainsi que leur pharmacocinétique ont pu être vérifiées au cours de tests *in vivo* (72). Par ailleurs, l'encapsulation d'un agent de contraste, l'indocyanine verte est observée en photoacoustique (technique qui permet la conversion d'un signal lumineux en signal acoustique). Cette technique présente l'avantage de combiner une haute résolution spatiale grâce aux ultrasons et un contraste important grâce à l'imagerie optique. Les liposomes ont ainsi été localisés précisément dans la tumeur, *in vivo*, au cours du temps et ont été quantifiés afin de montrer l'efficacité du ciblage par la RF (73).

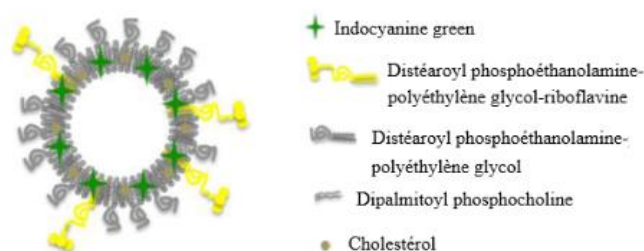


Figure 14 : Liposomes furtifs vectorisés par la RF (72)

- Utilisation pour le diagnostic de pathologies cancéreuses

F. Kiessling et son équipe se sont intéressés au diagnostic de pathologies cancéreuses en mettant au point des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique greffées par des molécules de FMN. D'une part, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique ont été choisies comme support car elles constituent d'excellents agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM) ; d'autre part, la FMN permet le ciblage des cellules cancéreuses, émet une lumière fluorescente et ralentit la dégradation oxydative des nanoparticules de fer. Le couplage de ces deux techniques permet une co-localisation des signaux au sein des tumeurs.

Afin de stabiliser ces nanoparticules et d'espacer les noyaux isoalloxazines pour éviter l'inhibition de la fluorescence, des nucléotides ont été ajoutés. Du fait de l'encombrement stérique trop important des nucléotides di- et triphosphates, diminuant le taux de greffage de la FMN et par

conséquent l'internalisation cellulaire, les nucléotides monophosphates semblent les plus adaptés (74). Finalement, le guanosine monophosphate a été retenu pour réaliser l'évaluation biologique sur l'animal (Figure 15). Les tests *in vivo* ont montré une très forte accumulation de ces formulations au sein des cellules cancéreuses, des cellules angiogéniques et des macrophages et la conservation de leurs propriétés superparamagnétiques et de fluorescence (75,76).

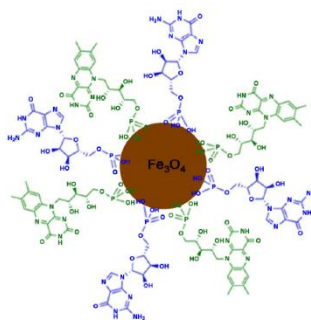


Figure 15 : Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique fluorescentes recouvertes de FMN (vert) et de GMP (bleu)(75)

- Utilisation comme photosensibilisateur

Les équipes de A.M. Edwards (77) et de P. Pons (78) ont respectivement synthétisé la 2',3',4',5'-RF-tétrabutyrate (Schéma 5a) et la 2',3',4',5'-RF-tétraacétate (Schéma 5b). Ces estérifications de la RF ont permis de synthétiser des molécules plus apolaires qui diffusent mieux au travers des membranes cellulaires mais aussi d'apporter une plus grande photo-stabilité afin de ralentir la dégradation et montrer des résultats plus intéressants que la RF lors de tests cellulaires (77,78).

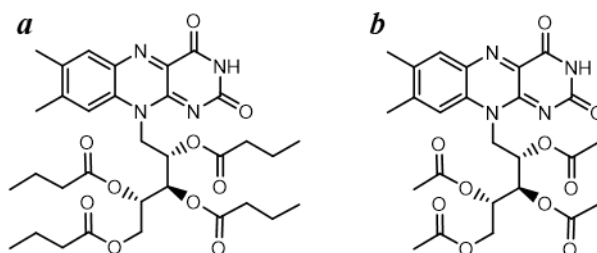


Schéma 5 : a°) RF-tétrabutyrate (77); b°) RF-tétraacétate (78)

S. Basu et son équipe ont conçu des nanoparticules d'or décorées par des molécules de RF liées *via* des liaisons thioesters (Schéma 6). L'utilisation en thérapie photodynamique de ces nano-objets sur des lignées cancéreuses induisait leur apoptose et fragmentait leur ADN (79).

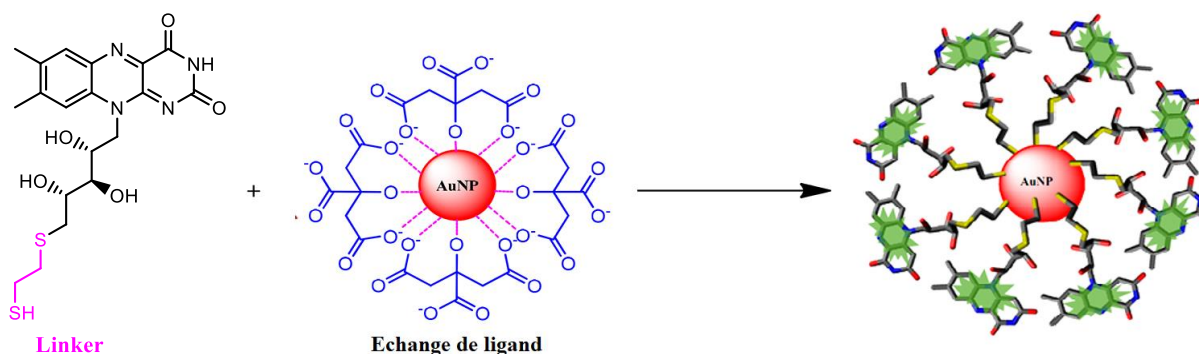


Schéma 6 : RF fonctionnalisée par le 1,2-éthanedithiol afin de lier la RF aux nanoparticules d'or (79)

Les équipes de V.Y.Pachenko (80) et H.-S. Qian (81) ont formulé des nanoparticules capables de convertir les rayonnements infra-rouges (IR) en rayonnements UV-visibles. L'avantage d'irradier dans l'IR (à 970-980 nm) permet d'utiliser une lumière moins énergétique, moins ionisante et mutagène pour les cellules et surtout une administration plus profonde dans les tissus. En effet, la pénétration des rayonnements IR est inférieure au centimètre alors que la pénétration des UV est seulement de 60 μm . L'utilisation de rayonnements IR, a l'avantage d'être moins invasive pour une utilisation en thérapie photodynamique afin de traiter des tumeurs moins superficielles que les cancers cutanés.

Les nanoparticules formulées sont constituées d'une matrice inorganique de nanocristaux de fluorure de sodium et d'yttrium (NaYF_4), d'ions ytterbium (Yb^{3+}) et thulium (Tm^{3+}) qui permettent l'émission de lumière par conversion ascendente *via* des transferts d'énergie selon un processus anti-Stokes (Figure 16). L'absorption successive de deux photons dans l'IR induit le transfert d'énergie des ions sensibilisateurs ou donneurs Yb^{3+} excités vers les ions Tm^{3+} activateurs ou accepteurs. Les ions Tm^{3+} possèdent plusieurs états excités avec des demi-vies longues approchant une milliseconde. Les relaxations radiatives permettent d'observer l'émission de lumières d'énergies plus élevées, aux longueurs d'ondes 800 nm, 650 nm, 510 nm, 475 nm, 450 nm, 360 nm, 345 nm. Plus le nombre de photons séquentiels absorbés par les ions Tm^{3+} est important et plus les photons émis sont énergétiques (80,82).

Ainsi, les photons émis à 360 nm et 475 nm ont la capacité d'irradier les flavines par transfert d'énergie (FRET : Förster Resonance Energy Transfer). Les équipes de V.Y.Pachenko et H.-S. Qian ont respectivement soit co-administré séparément les nanoparticules permettant la conversion

ascendante et la FMN, soit la RF-tétraacétate directement liée sur les nanoparticules. Bien que ces nanoplateformes de thérapie photodynamique convertissent seulement 2 % de la lumière IR en rayonnement à 360 nm et 475 nm, cela suffit à déclencher l'irradiation des flavines, comme l'attestent les tests *in vivo* sur modèle murin et entraînent une régression du volume tumoral (80,81).

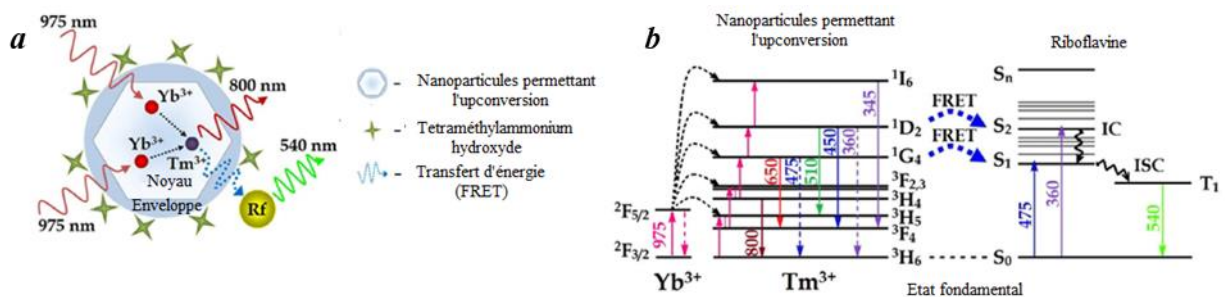


Figure 16 : Nanoparticules permettant la conversion ascendante ; b°) Diagramme de Jablonski expliquant le phénomène de conversion ascendante utilisé pour irradier les flavines (80)

Plusieurs études se sont intéressées à la co-administration de cisplatine et de RF irradiée. Le cisplatine est un antinéoplasique utilisé dans le traitement des cancers de l'endomètre, l'œsophage, l'ovaire, la vessie, le col de l'utérus, du testicule, oropharyngé, cutané. Il agit par l'alkylation de l'ADN en générant des stress oxydatif et nitrosatif. Cependant, le cisplatine induit des effets indésirables assez importants liés à son hépato-, néphro-, neuro-, immuno-, spermo- et ototoxicité. I. Nassem et son équipe suggèrent que la RF irradiée améliore l'activité antinéoplasique du cisplatine en sensibilisant les cellules cancéreuses (83). Ils ont également observé une diminution des effets indésirables du cisplatine et plus particulièrement des toxicités hépatique et rénale. Ils ont expliqué ce résultat par la génération d'ERO qui annihilent les espèces radicalaires générées par le cisplatine et réduisent son stress oxydatif (84).

L'équipe de L. Salassa a travaillé sur cette même thématique et s'est intéressée à l'activation de prodrogues à base de sels de platine (cisplatine (85) et du carboplatine (86)). En effet, le complexe de Pt^{IV} est initialement inactif. La ${}^3RF^*$ obtenue après irradiation de la RF, sert de photocatalyseur et permet la formation de Pt^{II} cytotoxique (Schéma 7). Il a également été démontré que l'utilisation de tampon MES (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique) ou HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) permet d'améliorer la stabilité de la RF et de ralentir sa photodégradation (85,86). Les tests menés ont permis d'observer une augmentation de la phosphorylation des histones suite aux lésions de l'ADN induites par les sels de platine. Ces

dommages étant irréversibles, ils causent la mort des cellules traitées par ces prodrogues et la RF irradiée.

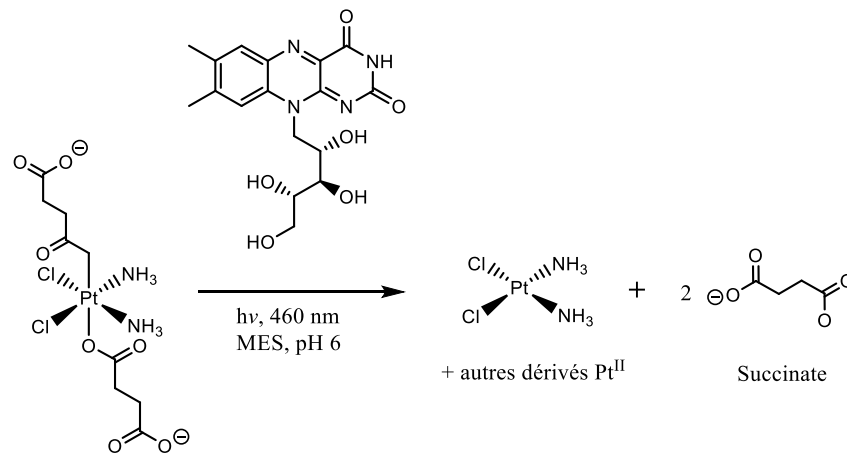


Schéma 7 : Réduction de la prodrogue du cisplatine induite par la photocatalyse de la RF dans un tampon MES (85)

- Utilisations combinées pour des applications en théranostique

Le mot théranostique est un condensé de thérapeutique et diagnostic. Cela signifie que par le biais de cette approche, l'intérêt est double : déceler une tumeur et la traiter en tuant les cellules cancéreuses. F. Pan et son équipe ont mis au point des quantum dots (QD) à cet effet. Les QD sont des nanoparticules métalliques au fort pouvoir fluorescent dont la longueur d'émission dépend des atomes utilisés ainsi que de leur taille. Ainsi, ces nanoparticules offrent une large gamme d'émission lumineuse : dans l'UV, le visible et l'IR. Cependant, ces objets présentent souvent une forte toxicité à cause de l'utilisation de métaux lourds.

L'équipe de F. Pan (87) a donc mis au point des QD de fer et azote encapsulés dans une vésicule polymérique de chitosan pour diminuer leur toxicité. Ces nano-objets sont capables d'émettre une lumière fluorescente verte et également d'être utilisés en hyperthermie du fait que ce sont des particules de fer supermagnétique. Ainsi, il a été observé qu'après irradiation dans l'IR, la température augmentait localement au niveau tumoral jusqu'à 50,2°C lors des tests *in vivo*. De plus, ces nanoparticules ont été vectorisées par l'acide folique alors que la RF a été greffée aux QD pour être utilisée en tant que photosensibilisateur et de cumuler les effets de la thérapie photodynamique après irradiation dans l'IR. En effet, ces QD ont également la possibilité de conversion ascendente de la lumière IR en lumière UV et permettent le traitement d'une tumeur par la production d'espèces radicalaires. Enfin, un traitement par chimiothérapie est administré, en

libérant de la doxorubicine sous l'effet d'un pH acidifié, à l'intérieur des endosomes et lysosomes et de l'augmentation de température. Ainsi, la combinaison de l'ensemble de ces approches permet un traitement prometteur afin d'éradiquer la tumeur, sans présenter de toxicité pour le reste de l'organisme (rate, foie, cœur, poumons, reins) (87).

2.1.1.6. Utilisation de flavines comme inhibiteur de tyrosine kinases

Les tyrosine kinases (TK) sont des protéines qui ont besoin d'ATP pour la phosphorylation de leurs propres résidus tyrosines ou ceux d'autres enzymes afin de déclencher la transduction du signal. Ces kinases entrent physiologiquement dans des cascades de signalisations cellulaires impliquées dans la prolifération, la différenciation, le métabolisme et la mort cellulaire mais elles peuvent être également suractivées dans certains cancers.

Les équipes de T. Nagamatsu (88) et H.I. Ali (89) se sont intéressées aux propriétés de dérivés alloxazines : les 5-déazaflavines (Schéma 8a) et les flavines-5-oxydes (Schéma 8b) afin de les utiliser en tant qu'inhibiteurs de TK. Il est ressorti des études de modélisation que les 5-déazaflavines présentaient un plus grand intérêt car elles agissent comme antagonistes. Ces composés sont des dérivés du coenzyme F420 utilisé chez certaines bactéries, car elles présentent l'avantage de posséder un fort pouvoir oxydant (88,89).

H.I Ali et son équipe ont montré que les déazaflavines avaient une sélectivité pour les TK : Abl-1 et FAK par rapport aux 20 kinases étudiées. Ils se sont aperçus que le groupement R₃ favorise les interactions dans la poche hydrophobe du site de liaison de l'ATP entraînant une augmentation de l'apoptose et de la mort cellulaire. Finalement, la molécule où R₃ = (4-((4-méthylpipérazin-1-yl)méthyl)phényl)méthanamine (Schéma 8c) a été conservée car celle-ci présentait les meilleurs résultats, corrélés, entre les études de modélisation moléculaire (docking) et les tests d'inhibition de TK *in vitro* avec une CI₅₀ = 0.04 μM (89).

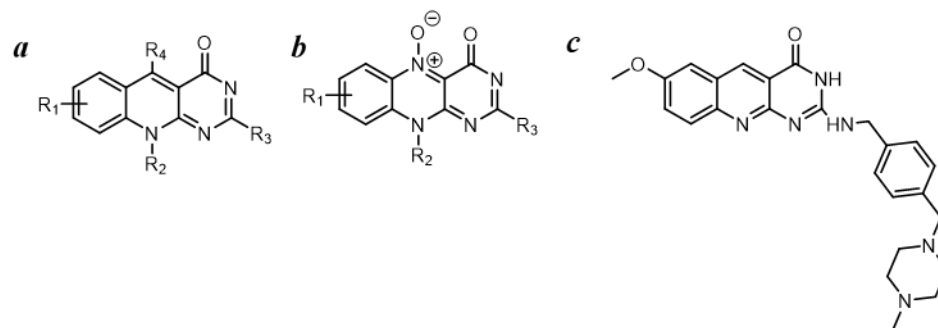


Schéma 8 : Structures générales des a°) 5-déazaflavines et b°) flavines-5-oxydes étudiées ; c°) composé retenu par H.I Ali et son équipe (89)

2.1.2. Utilisation de la RF comme agent anti infectieux : Mirasol system

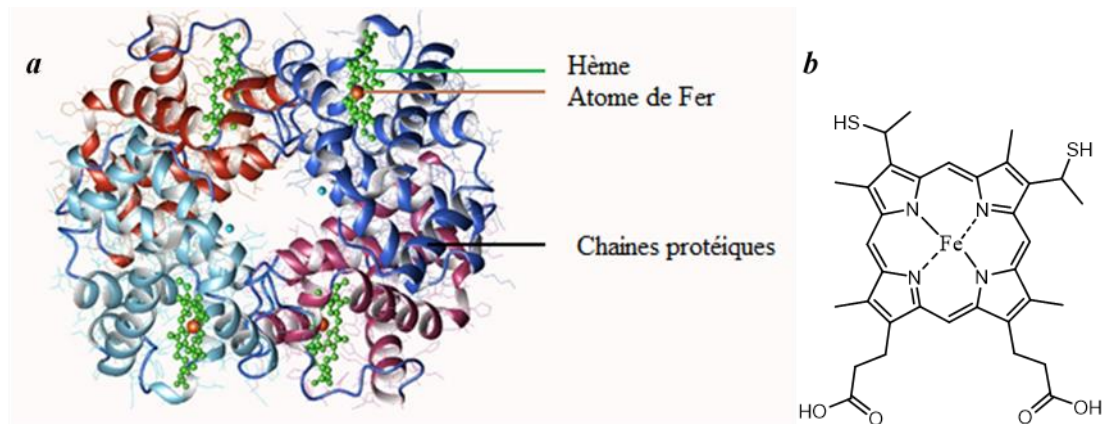
2.1.2.1. Généralités sur le sang

Le sang est un tissu liquide composé des globules rouges (ou hématies ou érythrocytes), des globules blancs (ou leucocytes) et des plaquettes (ou thrombocytes) qui forment une suspension homogène dans le plasma. Le sang est un fluide vital impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Le volume de sang chez un adulte est en moyenne de 5 litres (90).

Tout d'abord, le sang permet l'irrigation de l'ensemble des tissus de l'organisme afin de les approvisionner en oxygène et en nutriments puis de récupérer le dioxyde de carbone et autres déchets issus du métabolisme. Le sang véhicule également des hormones ou autres molécules qui assurent une communication entre l'ensemble des cellules de l'organisme et participent à son homéostasie (90).

Le sang oxygéné circule dans les artères sous l'impulsion du cœur, après son éjection du ventricule gauche, il irrigue l'ensemble des organes. Le sang désoxygéné revient au travers du système veineux vers l'oreillette droite puis il est éjecté par le ventricule droit dans la petite circulation afin de s'oxygéner au niveau des alvéoles pulmonaires. Ce sang oxygéné revient dans l'oreillette gauche avant d'entamer un nouveau cycle. Les déchets autres que le dioxyde de carbone sont principalement éliminés par les reins et le foie. Les hématies sont des cellules anucléées qui représentent environ 44 % du volume sanguin total. Elles sont responsables du transport de l'oxygène, car elles contiennent une métalloprotéine dans leur cytoplasme : l'hémoglobine. Cette protéine est liée à des molécules d'hème, constituée d'un motif porphyrique et d'un atome de fer coordonné aux atomes d'azotes des noyaux pyrroles (Figure 17a, 17b). Le fer est capable de former

une liaison réversible avec l'oxygène pour former l'oxyhémoglobine et de le libérer dans les tissus (90).



Le sang est également impliqué dans la protection de l'organisme. Les cellules immunitaires sont les leucocytes qui comprennent les lymphocytes B et T, les monocytes et les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles. De manière schématique, il existe une immunité aspécifique (permettant de déclencher un processus inflammatoire, la phagocytose et le complément), ainsi que deux immunités adaptatives : l'immunité humorale (libération d'immunoglobulines spécifiques d'un antigène donné par les lymphocytes B et formation d'un immun complexe) et l'immunité cellulaire (médiée par les lymphocytes T cytotoxiques et T auxiliaires) (90).

Le sang contient aussi des thrombocytes qui jouent un rôle essentiel lors du processus de l'hémostase en initiant la coagulation. Après la vasoconstriction des vaisseaux, il se forme le clou plaquettaire qui permet d'initier une cascade protéique aboutissant à la formation de la fibrine à partir du fibrinogène. La fibrine formée est insoluble dans le plasma et forme un caillot afin d'arrêter les saignements (90).

Les leucocytes et thrombocytes représentent 1 % du volume sanguin total. Le volume restant (55 %) est constitué par le plasma. Le plasma est une solution acellulaire composée de différents électrolytes et protéines qui sont essentiels respectivement dans la régulation de l'équilibre acido-

basique et la pression oncotique. Les principales protéines retrouvées sont l'albumine, les globulines et le fibrinogène, tandis que les lipoprotéines régissent le transport des lipides (90).

2.1.2.2. Les transfusions en France

Les transfusions regroupent la collecte et l'utilisation du sang total et des dérivés du sang : globules rouges, plaquettes, plasma et fractions plasmatiques. Aujourd'hui, le sang total est fractionné, suite à une opération de centrifugation, afin d'administrer la fraction appropriée au patient selon ses besoins. De plus, chaque fraction ayant des durées de conservations différentes, cela permet de mieux contrôler la qualité des produits administrés. En effet, les produits labiles tels que les plaquettes et globules rouges ont des durées de vie respectives de 7 et 42 jours alors que le plasma et les produits préparés à partir de celui-ci (albumine, fibrinogène, immunoglobulines, facteurs de coagulation) sont dits stables car ils ont une durée de vie d'un an (92,93).

Les transfusions de globules rouges permettent de compenser les pertes sanguines dues à des hémorragies lors d'opérations chirurgicales, d'accouchements mais aussi de compenser des anémies (liées à une leucémie ou une hémolyse, par exemple). L'exsanguino-transfusion permet de renouveler plus de la moitié du volume sanguin afin d'éliminer des produits toxiques. Les fractions plasmatiques concentrées en albumine sont administrées aux grands brûlés (afin de restaurer la masse liquidienne dans la circulation), tandis que les fractions coagulantes sont administrées aux patients hémophiles et les immunoglobulines permettent de lutter contre des maladies infectieuses ou virales (92).

En France, le don de sang est volontaire, anonyme et bénévole. Les donneurs doivent être majeurs, avoir une pression artérielle normale et non affectés de syphilis, paludisme, cancer, tuberculose et aucune allergie majeure. Les tests ont été renforcés concernant la recherche des virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et des hépatites B et C suite aux affaires de sang contaminé, entre 1970 et 1990, dans plusieurs pays et notamment en France ou aux Etats Unis. Suite à ces évènements, les dépistages ont été améliorés, grâce à l'aide de la biologie moléculaire qui renseigne sur les statuts sérologiques des donneurs ou encore grâce à la déleucocytation systématique de tous les produits sanguins qui évite les réactions de type greffon *versus* hôte (GvH). L'ensemble des échantillons sont aujourd'hui collectés et contrôlés par l'Etablissement Français du Sang (EFS) qui

ensuite, approvisionne 1500 hôpitaux et cliniques afin de soigner 1 million de patients chaque année (94,95).

Selon un article de J.P. Cazenave (94) publié sur le site de l'Académie de Médecine, il existe un risque pour de nombreux agents pathogènes non testés, émergents ou ré-émergents dus aux voyages, aux changements climatiques modifiant les zones d'habitat des animaux vecteurs. De ce fait, il existe par exemple, des possibilités d'infections :

- virales par des virus connus mais non testés : cytomégalovirus, parovirus B19,
- virales par des virus émergents ou ré-émergents tels que les arbovirus transmis par des arthropodes hématophages (responsables du chikungunya ou de la dengue), le coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), le virus influenza H1N1...
- parasitaires à *Trypanosoma cruzi* (maladie de Chagas), *Plasmodium falciparum* (paludisme),
- aux prions (protéines infectieuses) responsables de la maladie de Creutzfeldt-Jacob,
- bactériennes comme *Coxiella burnetii* (fièvre Q).

La mise au point de tests de dépistage de plus en plus nombreux pour chaque nouveau pathogène est compliquée. Il est également possible que des pathogènes puissent ne pas être détectés au cours d'une période où leur quantité est inférieure au seuil de sensibilité du test. C'est à cet égard qu'un changement de paradigme s'opère et la prévention de la transmission des maladies infectieuses devient alors proactive au lieu d'être réactive. L'inactivation des pathogènes apparaît donc comme une solution afin d'améliorer la sécurité des patients transfusés (94).

Cependant, les méthodes de stérilisation par la chaleur ne sont pas applicables aux produits sanguins pour ne pas détériorer les cellules et protéines. Aujourd'hui, en France, les fractions plasmatiques sont inactivées par solvant-détergent ou *via* le bleu de méthylène sans altérer leur qualité. En revanche, ces méthodes ne sont pas applicables à toutes les fractions puisque la méthode solvant-détergent lyse les thrombocytes et est inefficace contre les virus nus et prions alors que le bleu de méthylène est inefficace contre les virus intracellulaires (94). Certains pays comme les Etats Unis utilisent également les irradiations par rayonnement gamma entre 25 et 30 Gy afin

d'éliminer les leucocytes résiduels. Cependant, l'utilisation de césium ou de cobalt radioactifs est plus contrainte et il est plus difficile de se les procurer pour des causes de sécurité liées aux risques terroristes (96,97).

De ce fait, des méthodes photochimiques ont été mises au point et permettent de conserver la survie et la fonction des hématies et des thrombocytes. Trois technologies ont obtenu la conformité européenne (marquage CE) : Theraflex-UV (photosensibilisateur : bleu de méthylène), Mirasol PRT system (photosensibilisateur : RF, détaillé ci-dessous) et Intercept Blood System (photosensibilisateur : amotosalen) (Schéma 9). Le S-303 ou l'amustaline (Schéma 9) est un agent alkylant dérivé des gaz moutarde. Cette molécule fait l'objet d'études cliniques en phase III afin d'inactiver les pathogènes contenus dans les concentrés de globules rouges par procédé chimique (94,98,99).

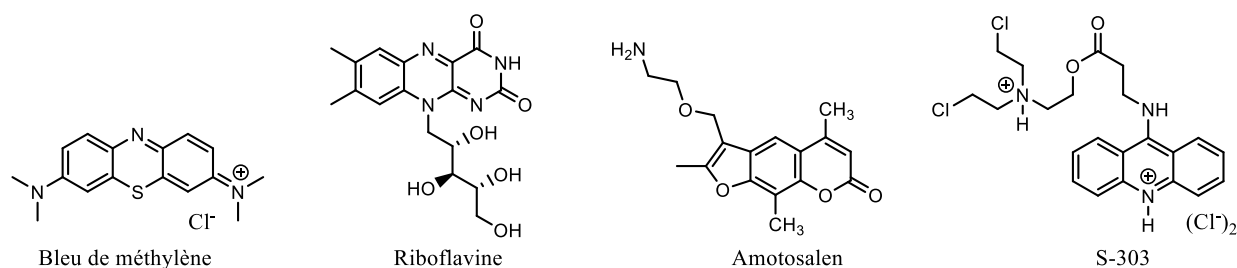


Schéma 9 : Molécules utilisées pour l'inactivation de pathogènes (98)

2.1.2.3. Utilisation de la riboflavine pour le Mirasol system et comparaison aux autres méthodes photochimiques

Au cours de la première étape du Mirasol system (Ms), l'échantillon est transféré dans une poche d'irradiation constituée de matériaux biocompatibles (Figure 18). La solution stérile de RF (à une concentration de 500 μ M, dans 35 ml de solution saline à 0,9% et à un pH compris entre 4 et 5) est utilisée pour photosensibiliser l'échantillon. L'irradiation de l'échantillon dure entre 5 et 8 minutes. La puissance d'irradiation est fixée à 6,2 J/ml dans les domaines d'irradiation des UV-B (280-315 nm) et UV-A (315-400 nm). Les espèces radicalaires générées permettent la lésion irréversible des acides nucléiques et plus particulièrement des guanines. Ainsi, les protéines plasmatiques, les hématies et thrombocytes sont préservés car ils sont anucléés, au contraire des parasites, virus enveloppés et quelques virus non enveloppés, bactéries et leucocytes. La photodégradation de la RF induit la formation de lumichrome, 2'-cétoriboflavine, 4'-cétoriboflavine et de formylméthylflavine qui ne sont pas géno- ou cyto-toxiques pour l'Homme.

Ainsi, l'échantillon peut être directement conditionné avant d'être administré à un patient (100). Le Ms est applicable pour la décontamination du plasma et des concentrés plaquettaires. En revanche, le traitement du sang complet est plus compliqué car le maximum d'absorption de l'hémoglobine se situe entre 400 et 450 nm. Etant donné que l'hémoglobine absorbe un peu dans la région des UV-A, l'énergie lumineuse administrée est normalisée selon la concentration en hématie (101).

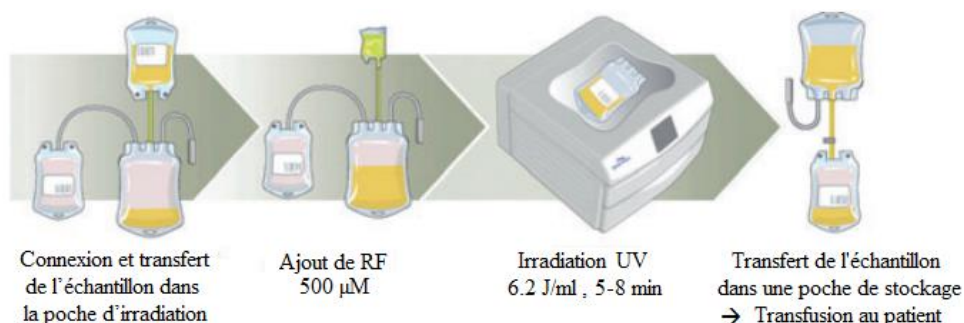
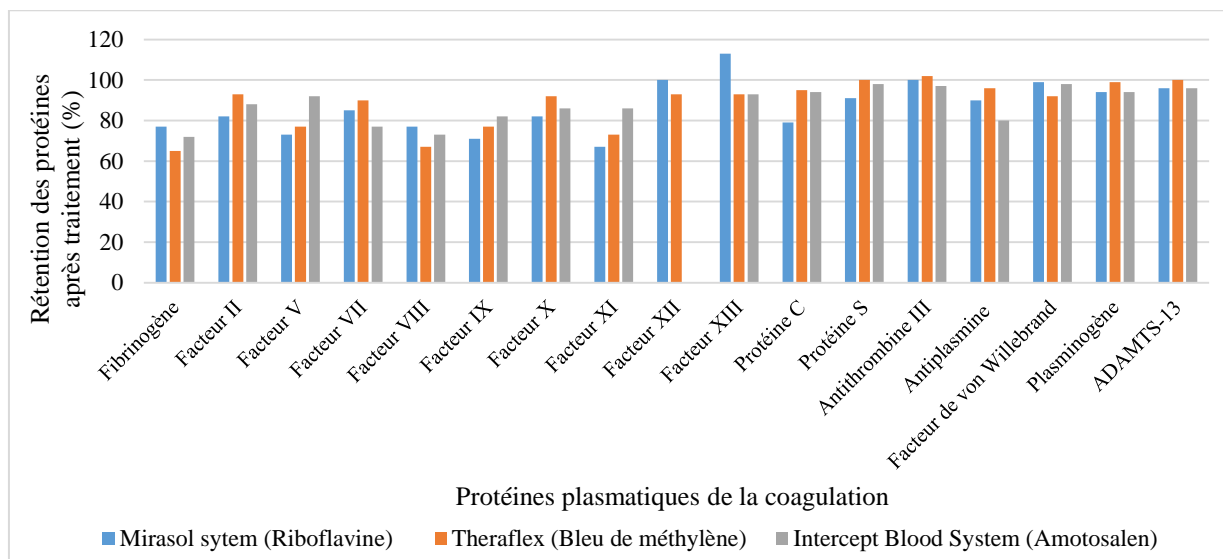


Figure 18 : Processus d'inactivation de pathogènes par Mirasol system (102)

Le Ms a montré une efficacité comparable à l'inactivation par rayonnement gamma sur les leucocytes. L'inactivation des leucocytes permet de prévenir les GvH, l'alloimmunisation (immunisation humorale qui se produit entre individus de la même espèce), le microchimérisme (présence d'un petit nombre de cellules génétiquement distinctes chez l'individu hôte provenant d'un autre individu : peut se produire physiologiquement au cours de la grossesse). Il a également été observé que la libération de cytokines inflammatoires (TNF- α , interféron- α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10) était diminuée lors de l'inactivation par Ms par rapport aux rayonnements gamma. La diminution de ces cytokines diminue ainsi le risque de réaction transfusionnelle fébrile non hémolytique (réaction inflammatoire dont les premiers symptômes sont des poussées fébriles et les frissons) (96,97).

L'utilisation de ces méthodes photochimiques provoque néanmoins une perte d'activité des facteurs de coagulation. L'ensemble des facteurs de coagulation est légèrement réduit mais de manière non significative selon la méthode d'inactivation étudiée. Cependant, le Ms est la méthode qui affecte le moins la quantité de fibrinogène : perte d'environ 23 % tandis qu'elle est évaluée à 28 % pour Intercept Blood System et 35 % pour Theraflex (photo-oxydation de résidus histidines) (Figure 19) (103).



*Traitement du Facteur XII par Intercept Blood System : non trouvé dans la littérature

Figure 19 : Influence des méthodes photochimiques sur les protéines plasmatiques de la coagulation (données issues de (103))

Le Theraflex utilise quant à lui le bleu de méthylène qui est une phénothiazine chargée positivement. Ce colorant ne pénétrant pas à l'intérieur des cellules, il ne permet pas l'inactivation des virus intracellulaires ou des leucocytes. En revanche, son efficacité a notamment été prouvée sur les virus enveloppés et non-enveloppés afin d'inactiver les pathogènes contenus dans le plasma (99). La technologie Intercept Blood System utilise une furocoumarine comme photosensibilisateur : l'amotosalen. L'activation de cette méthode est permise par les UV-A afin de traiter le plasma et les concentrés plaquettaire mais pas le sang total du fait de l'absorption des UV-A par l'hémoglobine. Ainsi cette méthode induit l'inactivation des virus enveloppés, bactéries, protozoaires et leucocytes. Cependant les résultats sur les virus non enveloppés sont variables (99). Toutefois, l'amotosalen nécessite une étape de purification indispensable car les produits de dégradation formés induisent des pathologies pulmonaires (101).

La revue de C.V. Prose liste la réduction logarithmique générée par ces trois méthodes photochimiques (98). Plusieurs exemples (Tableau 3) montrent que dans l'ensemble, l'Intercept Blood System obtient les meilleurs résultats (colorés en bleu) et permet une diminution significativement plus importante des virus enveloppés, des bactéries Gram positives et négatives ainsi que des spirochètes. Le Ms apporte des résultats intéressants ponctuellement et notamment pour le traitement de certains parasites.

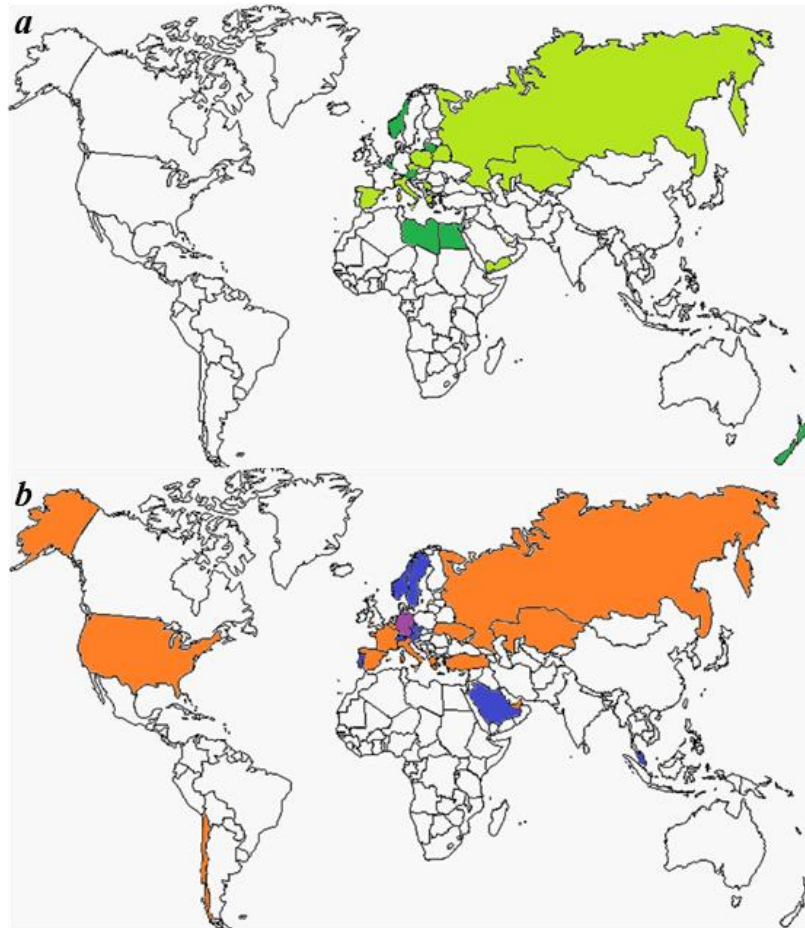
Tableau 3 : Logarithme de réduction de pathogènes selon les trois méthodes ayant obtenu le marquage CE (98)

Pathogènes	Méthode d'inactivation de pathogène		
	Mirasol sytem (Riboflavine)	Theraflex (Bleu de méthylène)	Intercept Blood System (Amotosalen)
Virus enveloppés			
VIH-1 intracellulaire	4.5	~	>6.1
VIH-1 libre	5.9	1.4	>6.2
Virus hépatite B	2.3	~	>5.5
Virus hépatite C	3.2	~	>4.5
CMV intracellulaire	~	~	>5.9
CMV libre	2.1	3.5	*
West Nile virus	>5.1	5.4	>6
Corona virus SRAS	~	~	>5.8
Chikungunya	2.1	~	>6.4
Virus Influenza H5N1	>5	~	>5.9
Virus non enveloppés			
Parvovirus B19	>5	5.5	3.5-5
Virus de l'hépatite A	1.8	~	0
Bactéries Gram négatives			
<i>Escherichia coli</i>	4.4	>4.0	>6.4
<i>Serratia marcescens</i>	4.0	>4.0	>6.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.8	4.8	>5.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>4.6	>4.9	4.5
<i>Salmonella choleraesuis</i>	~	~	>6.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	>2.0	>4.3	5.9
Bactéries Gram positives			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4.2	4.8	>6.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0	>4.8	6.6
<i>Streptococcus pyogenes</i>	>2.2	~	>6.8
<i>Listeria monocytogenes</i>	~	~	>6.3
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	~	~	>6.3
Bactéries spirochètes			
<i>Treponema pallidum</i> (syphilis)	~	~	>6.8
<i>Borrelia burgdorferi</i> (Lyme disease)	~	~	>6.8
Parasites			
<i>Plasmodium falciparum</i> (malaria)	>3.2	~	>6
<i>Trypanozoma cruzi</i> (Maladie de Chagas)	6.0	~	>5.3
<i>Leishmania mexicana</i> (promastigote)	~	~	>5.0
<i>Leishmania major</i> (amastigote)	>5.0	~	>4.3
<i>Babesia microti</i> (babésiose)	>4.0	~	>5.3
Leucocytes			
Viabilité lymphocytes T	>5.0	~	>4.3
Cytokines inflammatoires	Absence	~	Absence

~ : Pas de données disponibles dans la littérature, * : réduction inférieure à la limite de détection, : meilleurs résultats d'inactivation de pathogènes

Actuellement, une vingtaine de pays (Figure 20a) ont approuvé le Ms. Cependant, la seule méthode photochimique approuvée en France par l'Agence National de Sécurité de Médicament

(ANSM) est l'Intercept Blood System pour le traitement des concentrés plaquettaires et du plasma (94). En effet, cette méthode semble la plus efficace et a été approuvée par un nombre important de pays (Figure 20b). A l'instar de l'ANSM, l'agence sanitaire du médicament aux Etats Unis, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé la méthode utilisant l'amotosalen et a également autorisé des essais clinique de phase III, actuellement en cours, pour l'inactivation de pathogènes par Ms. Quelques pays utilisent l'inactivation par Theraflex pour la décontamination du plasma (Figure 20c). Les méthodes photochimiques devraient peu à peu remplacer, la méthode de référence depuis le début des années 1990 par solvant et détergent pour l'inactivation du plasma (Figure 20d) (104).



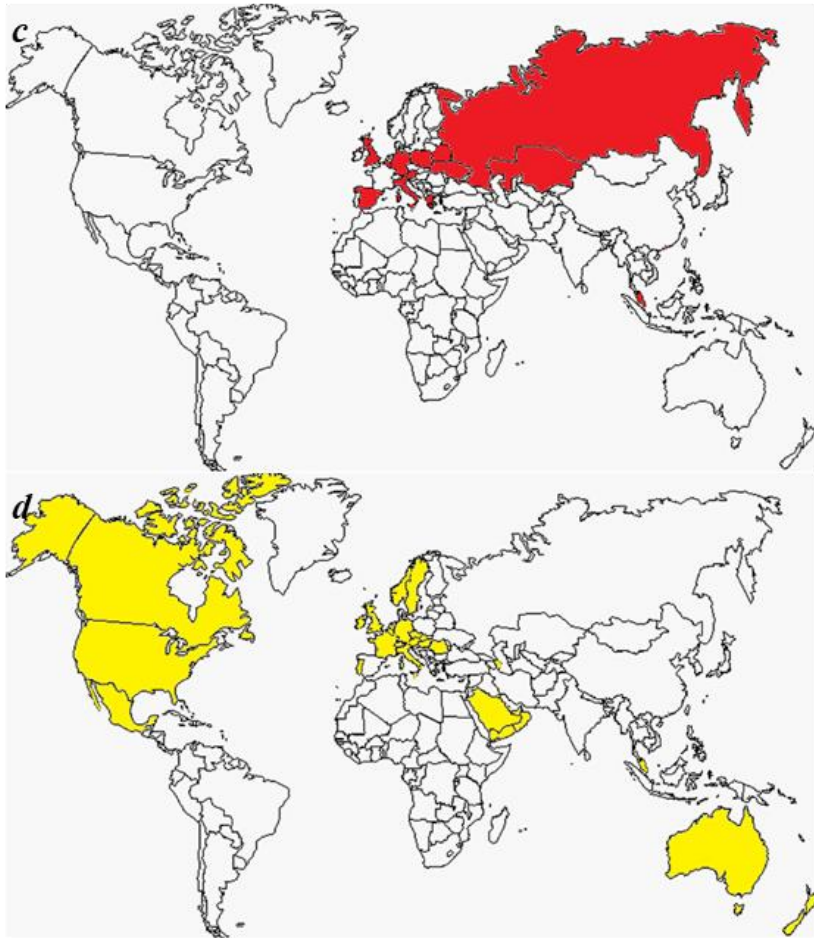


Figure 20 : Méthodes d'inactivation des produits dérivés du sang autorisées selon les pays ; cartes réalisées d'après des données de l'American Association of Blood Banks (104) :

a°) Mirasol system autorisé sur ■ les dérivés plaquettaires ou ■ dérivés plaquettaires + le plasma ; b°) Intercept Blood System autorisé sur ■ les dérivés plaquettaires ou ■ le plasma ou ■ les dérivés plaquettaires + le plasma; c°) Theraflex autorisé sur ■ le plasma ; d°) solvant/détergent utilisé sur ■ le plasma

2.2.Applications en ingénierie tissulaire

2.2.1. Traitement du kératocône

2.2.1.1. Description de l'œil

L'œil est l'organe sensoriel de la vision. Il permet de percevoir la lumière et d'intégrer des informations visuelles afin d'appréhender la perception des formes, des reliefs, des textures, des couleurs, des contrastes et des déplacements (105,106).

L'œil est une sphère aplatie de 2,5 cm de diamètre, logé au niveau crânien dans la cavité orbitale. Le mouvement du globe oculaire est permis par les six muscles oculomoteurs insérés au niveau de la sclère (partie blanche de l'œil). D'avant en arrière (Figure 21), l'œil est protégé par la paupière qui permet également d'humidifier le globe en étalant des larmes sécrétées par la glande lacrymale principale (située sur le bord supérieur latéral de l'orbite). L'excès de larme s'évacue au travers du canal lacrymal qui débouche dans la fosse nasale (105,106).

La cornée a principalement un rôle dans la réfraction de la lumière et contribue à la convergence des rayons lumineux vers la rétine. La cornée et le cristallin sont séparés par l'humeur aqueuse contenue dans la chambre antérieure. L'iris est la partie colorée de l'œil qui délimite en son centre un orifice appelé la pupille. L'iris permet l'accommodation en régulant la quantité de lumière qui pénètre au travers de la pupille grâce aux fibres musculaires circulaires responsables de la contraction (myosis) alors que les fibres musculaires radiaires favorisent une dilatation de la pupille (mydriase). Le cristallin est une lentille biconvexe dont la plasticité modifie la courbure et ajuste l'indice de réfraction de la lumière (105,106).

Les rayons lumineux traversent le corps vitré et atteignent la rétine qui correspond à la couche neurosensorielle. La rétine est munie de cellules photoréceptrices : les bâtonnets, responsables de la vision scotopique (nocturne, faible résolution, sensible aux mouvements) tandis que les cônes sont responsables de la vision photopique (diurne, distinction des couleurs). Ces cellules sont capables de la phototransduction, c'est-à-dire, qu'elles convertissent un signal lumineux en signal électrique. Elles transmettent ces signaux aux cellules nerveuses dont les axones convergent au niveau du point aveugle pour former le nerf optique. Le nerf optique est le deuxième nerf crânien (105,106).

Les nerfs optiques sont des nerfs sensitifs qui se rejoignent au niveau du chiasma optique. Ils y forment une décussation partielle (croisement des fibres provenant des rétines nasales mais pas des rétines temporales). Ensuite, ils se projettent au niveau du corps genouillé latéral (thalamus) puis terminent au niveau de l'aire de la vision principalement située au niveau du lobe occipital (105,106).

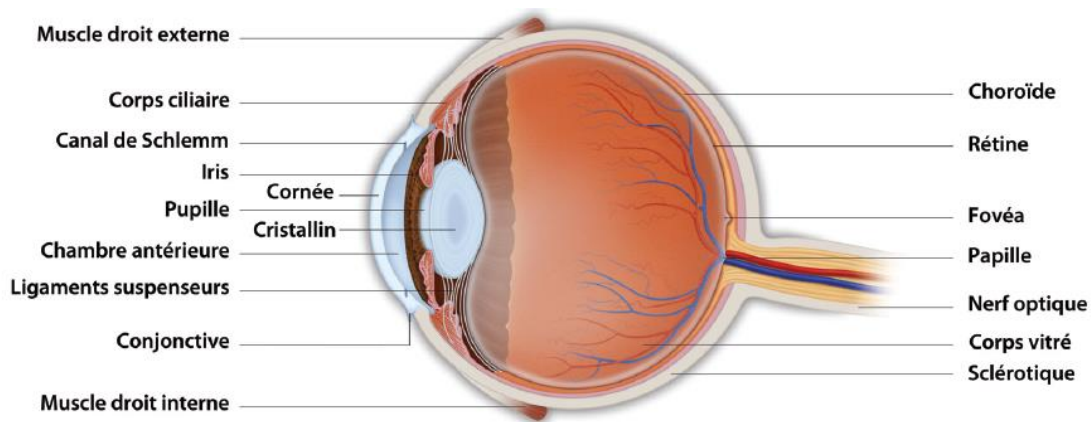


Figure 21 : Coupe sagittale de l'œil (105)

2.2.1.2. Physiologie de la cornée

La cornée permet la réfraction et représente environ les deux tiers de la puissance optique de l'œil. Ce tissu résistant et transparent a une épaisseur centrale d'environ 520 μm . La cornée se compose de cinq couches de cellules (Figure 22) : l'épithélium superficiel (5 à 8 strates cellulaires), la membrane de Bowman (lame basale), le stroma cornéen, la membrane de Descemet (lame basale) puis de l'endothélium cornéen (couche unicellulaire) en profondeur. Le stroma représente 80 à 90 % du volume cornéen. Il est constitué essentiellement d'une matrice extracellulaire (MEC) faite d'eau, de collagène de type I et V, de protéoglycanes et glycosaminoglycanes et d'une quantité minimale de cellules : kératinocytes et fibres nerveuses. L'agencement du collagène est capital pour que la cornée conserve sa transparence et son anisotropie. Le stroma cornéen n'étant pas vascularisé, les substances nutritives diffusent depuis l'humeur aqueuse et également proviennent d'échanges avec les larmes (106–109).

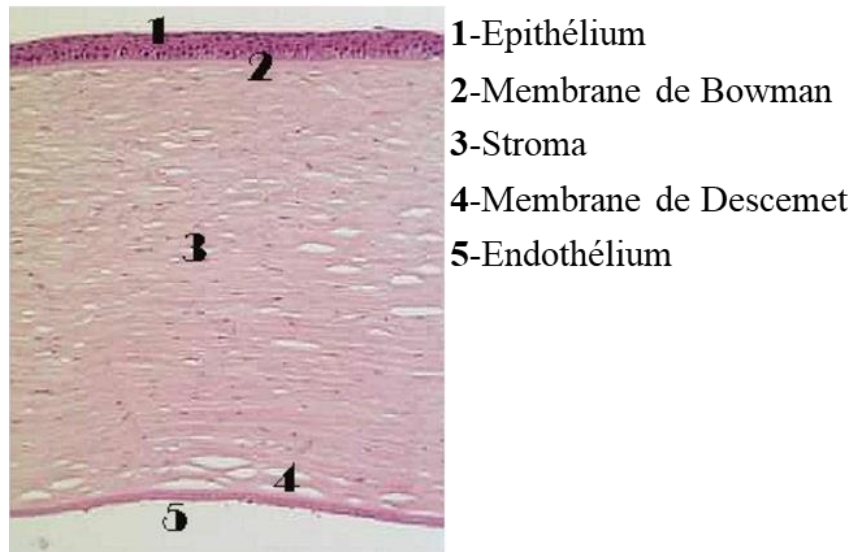


Figure 22 : Histologie de la cornée (108)

2.2.1.3. Physiopathologie du kératocône

Le kératocône se caractérise par l'amincissement de la cornée et la formation d'une protrusion (cornée conique). Ces déformations cornéennes sont bilatérales et souvent asymétriques (les yeux ne sont pas touchés selon le même degré de gravité). Ces symptômes entraînent une détérioration de la vue (Figure 23): myopie (baisse de l'acuité visuelle pour des objets éloignés), astigmatisme (déformation de l'image, vision floue) ainsi qu'une photophobie (sensibilité excessive à la lumière) et une irritation oculaire qui engendre un larmoiement. Sans prise en charge, ces symptômes peuvent s'accroître et la correction apportée par le port de lunettes ne suffit plus à compenser l'astigmatisme. La cornée peut s'opacifier, troublant davantage la vision. Cette évolution est susceptible dans les cas les plus extrêmes, d'aboutir à la cécité du patient (110,111).

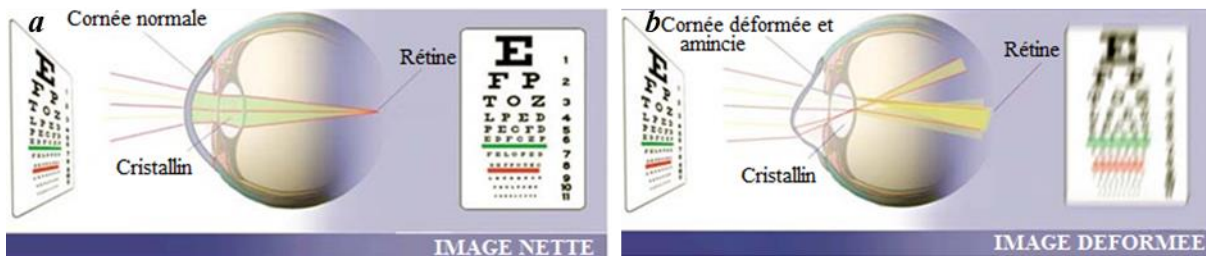


Figure 23 : a°) Vision d'une personne saine ; b°) Vision déformée d'un patient atteint de kératocône (110)

Le kératocône est une pathologie dégénérative et non inflammatoire de la cornée où la MEC du stroma est altérée. La structure et l'organisation du collagène sont modifiées. De plus, une part

des kératinocytes, impliqués dans la biosynthèse de la MEC, entre en apoptose. Il a également été observé que l'expression d'enzymes protéolytiques et lysosomales était augmentée et corrélée avec une diminution de la concentration des inhibiteurs de ces protéases. De ce fait, l'épaisseur du stroma ainsi que les propriétés biomécaniques de la cornée diminuent et induisent sa fragilité (110–112).

Les causes de cette maladie ne sont pas encore bien établies. Les hypothèses émises discutées concernent certains facteurs : hormonaux, métaboliques, environnementaux, comportementaux, iatrogéniques, idiopathiques ou même inflammatoires. Cependant, le facteur génétique semble important car les formes familiales représentent 10 % des patients atteints de kératocône. Il a également été mis en exergue que plusieurs maladies génétiques (syndrome de Down, syndrome de Turner, syndrome de Marfan...) étaient associées à une prévalence de cette dégénérescence structurale de la cornée. Le facteur mécanique, provoqué par le frottement préférentiel et répété de l'œil (d'origine allergique, conjonctivite, amétropie, fatigue accommodative, dermatites atopiques...), pourrait avoir une incidence sur l'aggravation du kératocône et expliquerait son asymétrie. En revanche, les personnes diabétiques sont moins exposées au kératocône probablement du fait de la glycation du collagène (108,110,113).

Le kératocône est souvent découvert à la puberté (entre 10 et 20 ans) car cela correspond à l'âge de progression de la maladie. Cependant, le kératocône a tendance à ne plus progresser autour de 40 ans du fait que la cornée se stabilise en vieillissant. Cette pathologie touche une personne sur 2000, bien qu'il soit possible que la prévalence soit en réalité plus importante, étant donné que les formes les moins sévères sont sous-diagnostiquées. Cette pathologie affecte indifféremment tous les individus quelque soit leur sexe ou leur origine ethnique (108,110,113).

Afin de diagnostiquer le kératocône, l'ophtalmologiste met en évidence plusieurs symptômes *via* un biomicroscope : la forme conique de la cornée, un astigmatisme irrégulier et évolutif, ainsi que l'opacité et la présence de cicatrices cornéennes (strie de Vogt, hypertrophie des nerfs cornéens...). Par la suite, des examens approfondis sont réalisés tels que la topographie cornéenne (mesure des rayons de courbure de la cornée à différents endroits), la pachymétrie cornéenne (évaluation de l'épaisseur de la cornée et détermination du point d'amincissement), l'abérométrie cornéenne (mesure de la qualité optique de la cornée qui varie en fonction de sa déformation) et la

viscoélasticité cornéenne (propension de la cornée à reprendre sa forme après avoir exercé une pression *via* un flux d'air) (108,114).

Actuellement la prise en charge du kératocône prend en considération de nombreux critères tels que : l'âge du patient, l'évolutivité de la maladie, la transparence et l'épaisseur de la cornée, le confort visuel (atteinte asymétrique), la tolérance aux lentilles rigides (108)... De ce fait, après le traitement de première intention que constitue le port de lentilles (108,115), l'ophtalmologue peut proposer :

- la pose d'anneaux intra-cornéens afin de retendre la cornée centrale (108,116);
- une greffe cornéenne pré-descemétique (afin de préserver l'endothélium sain et de favoriser une plus grande longévité et une meilleure efficacité de la greffe), où la partie de cornée endommagée est remplacée par la même partie de cornée saine d'un donneur (108,117);
- la photoréticulation du collagène cornéen (ou corneal collagen cross-linking (CXL) en anglais) stabilise la forme de la cornée et ralentit la progression de la maladie. Bien que ce traitement ait été autorisé en 2016 par la FDA aux Etats Unis, le CXL est encore en cours d'essais cliniques, en France. En effet, la Haute Autorité de Santé (HAS) a notamment recommandé la nécessité d'étudier les conséquences du CXL sur le long terme afin d'obtenir des données actuellement insuffisamment renseignées par manque de recul (108,118,119).

En complément de ces traitements, les patients utilisent des lentilles ou des verres scléaux. Les verres scléaux sont des lentilles de plus grandes dimensions qui offrent un gain d'acuité visuelle très important car elles utilisent un matériau permettant d'augmenter la perméabilité à l'oxygène. De plus, ces lentilles ne sont pas en contact avec la cornée et sont mieux tolérées par les patients (120).

2.2.1.4. Traitement par photoréticulation du collagène cornéen

L'objectif du traitement par CXL est de rigidifier le stroma cornéen à l'aide d'une réaction photochimique où une solution de flavine : riboflavine-5'-phosphate (=FMN) ou RF est irradiée par des UV-A. La formation d'espèces radicalaires permet ainsi de générer des ponts chimiques entre les fibres de collagènes et de ralentir la progression de la maladie (Figure 24) (121–126).

Les patients doivent avoir une épaisseur cornéenne minimale de 400 μm pour bénéficier du traitement par CXL. Il a été établi, au cours des essais précliniques, que pour des cornées plus fines, il existe un risque que les UV-A atteignent l'endothélium. Les conséquences de cet acte mèneraient à des lésions irréversibles et à une opacification de la cornée (121–126).

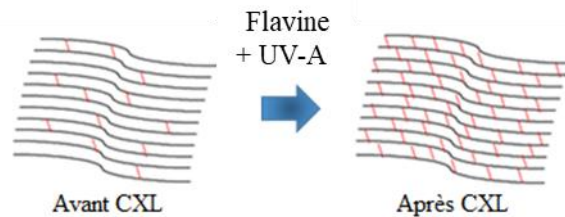


Figure 24 : Rigidification de la cornée induite après CXL (118)

Le protocole, se déroule en conditions stériles et débute par une anesthésie topique (proxymétacaïne ou lidocaïne). Par la suite, l'épithélium du centre de la cornée est enlevé, sur une largeur de 7 à 9 mm afin de perméabiliser la cornée. En effet, les jonctions serrées, formées entre les cellules épithéliales, imperméabilisent la cornée à la solution de flavine (121–126).

Ensuite, une solution de FMN (qui présente l'avantage d'être plus soluble que la RF) ou de RF à 0,01 % et de dextrane T500 20 % (agent isotonisant qui permet un contrôle de l'osmolarité, ainsi qu'une augmentation de la viscosité entraînant une rétention allongée au niveau du globe oculaire) est administrée toutes les 5 min lors des 30 min qui précèdent l'irradiation puis toutes les 5 min, au cours de l'irradiation afin de saturer le stroma antérieur (Figure 25). Bien que les maxima d'absorbance des flavines soient : $\lambda = 223 \text{ nm}$, 266 nm , 373 nm et 445 nm , le CXL utilise une lumière UV-A. Même s'ils ne correspondent pas aux longueurs d'ondes les plus intensément absorbées par les flavines, les UV-A sont moins mutagènes que les UV-B et UV-C et présentent l'avantage d'être non visibles au contraire de la lumière bleue. La longueur d'onde choisie pour le CXL est donc de 370 nm tandis que la dose totale administrée est de 5.4 J/cm^2 en utilisant une puissance de 3 mW/cm^2 , pendant 30 min (121–126).

Certaines variations du protocole sont étudiées comme :

- l'utilisation de pilocarpine 1 % induit un myosis en réduisant l'ouverture de la pupille afin de limiter l'exposition de la rétine à la lumière.

- l'utilisation du chlorure de benzalkonium permet de perméabiliser les jonctions serrées de manière moins traumatique, afin de diminuer la douleur et le risque d'infections post-opératoires liés à la désépithélialisation. Ainsi, l'absorption de la solution de flavine dans le stroma est favorisée, cependant, les résultats obtenus sont moins reproductibles que lors de l'abrasion complète de l'épithélium. Un procédé intermédiaire utilisant un laser femtoseconde permet de creuser des puits de 100 μm de profondeur dans la cornée. Ainsi, la solution de flavines est absorbée au sein du stroma sans léser significativement l'épithélium et facilite la cicatrisation, perçue comme moins douloureuse par les patients.

- l'utilisation d'une solution de flavine hypo-osmolaire et dépourvue de dextrane pour des patients ayant une épaisseur minimale de cornée, inférieure aux 400 μm recommandés pour effectuer le CXL. En effet, les cellules cornéennes vont gonfler suite au phénomène de turgescence et accroître l'épaisseur de la cornée. Ainsi, le CXL peut être pratiqué sans risquer de léser l'endothélium (121–126).

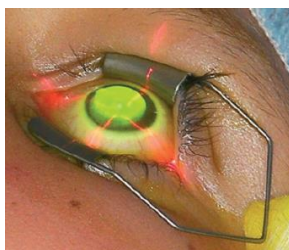


Figure 25 : Exposition d'une cornée kératocônique à une solution de flavine, irradiée par des UV-A durant le CXL (125)

A l'issue du traitement, une lentille pansement est posée et des collyres antibiotiques et anti-inflammatoires sont prescrits pour éviter une infection locale et soulager la douleur causée par la désépithélialisation. Il est recommandé que le patient protège ses yeux au cours des 24 h suivant l'opération avec des lunettes de soleil. Cette protection est nécessaire, le temps que l'ensemble des flavines soit éliminé par le larmoiement et évacuées dans le canal lacrymal pour éviter un surdosage des UV administrés (121–126).

Suite au traitement, il est normal que les patients aient une vision floue, un larmoiement et une sensation de corps étranger au cours des 24 à 48 premières heures. Ensuite, les patients observent ensuite une brume qui disparaît entre 6 mois et un an après l'opération et tandis que leur pression intra-oculaire peut être augmentée (121–126).

Il est estimé que la ré-épithélialisation nécessite au moins 4 jours et elle est jugée qualitative après 3 mois. L'ensemble des fibres nerveuses des kératinocytes du stroma antérieur entrent en apoptose et disparaissent suite au traitement. Les fibres nerveuses sont complètement reformées après 6 mois et permettent de retrouver l'intégralité de la sensibilité cornéenne. Les kératinocytes, quant à eux, repeuplent le stroma entre le 3 et 6^{ème} mois post-opératoire. Ils sécrètent de l'acide hyaluronique qui joue un rôle très important afin d'espacer les fibres de collagène pour mieux résister aux contraintes et cela augmente la densité de la matrice extracellulaire du stroma. Afin de contrôler le bon déroulement de la cicatrisation, de vérifier l'ensemble des symptômes ainsi que l'absence d'infection, le patient sera suivi en post-opératoire à D1, D3, M1, M6 et 1 an (124,127).

G.W. Conrad et son équipe (128) ont proposé un mécanisme d'action afin d'expliquer la formation des pontages chimiques entre les fibres de collagène au cours du CXL. Des espèces radicalaires et notamment de l'oxygène singulet, sont générés suite à l'irradiation d'une solution de flavine par des UV-A et induisent la formation d'un dérivé imidazolone à partir des résidus histidines (Schéma 10). Cet intermédiaire imidazolone étant très réactif, sa durée de vie très courte, lui permet de réagir avec les acides aminés nucléophiles composant les fibres de collagène : histidine, hydroxyproline, tyrosine, thréonine (en vert). L'imidazolone peut également réagir (en rose) avec l'allysine (en rouge) ou l'hydroxyallysine (en violet) qui sont des composés synthétisés par la lysyl oxydase à partir des résidus lysine du collagène. Une dernière voie utilise la 2,3-butanedione, qui est une molécule diélectrophile issue de la photodégradation des flavines. La 2,3-butanedione est susceptible de réagir avec les fonctions carbonylées de deux molécules d'allysines et de permettre la photoréticulation du collagène par réactions d'aldolisation (en bleu) (128).

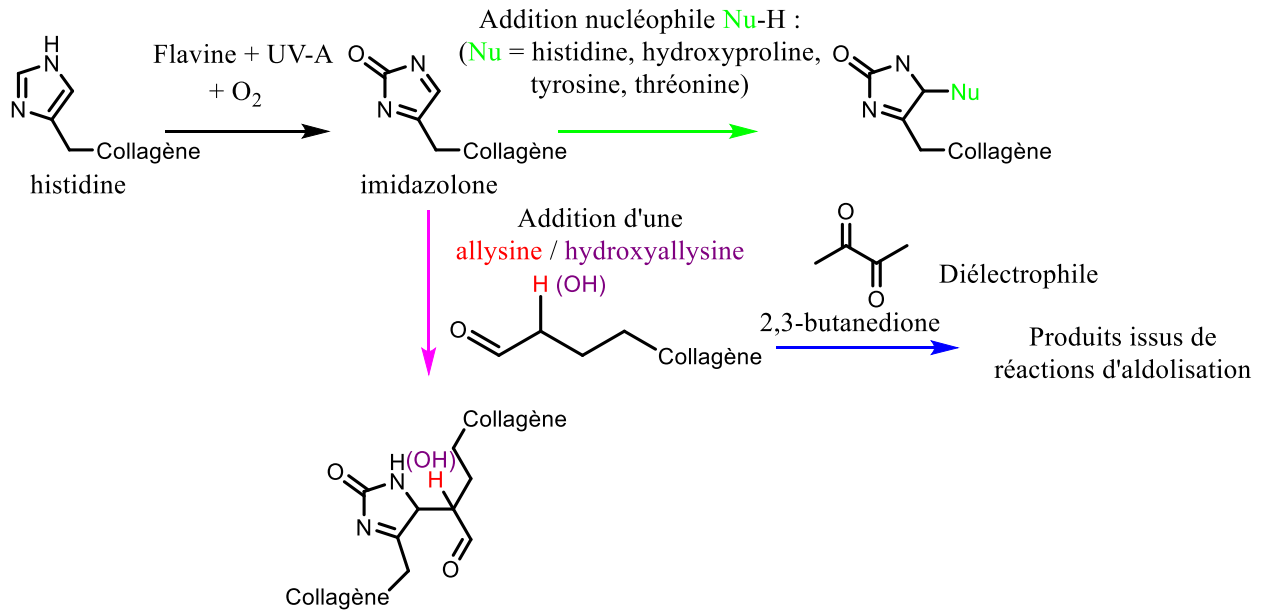


Schéma 10 : Mécanismes du CXL proposés par G.W. Conrad et son équipe (128)

Les essais *in vitro* ont montré que les cornées traitées par CXL avaient de meilleures caractéristiques biomécaniques :

- augmentation de sa raideur, mesurée par le module de Young,
- augmentation du diamètre des fibres de collagène (12 % sur des cornées de lapin),
- augmentation de la résistance à la digestion enzymatique (multipliée par 2,2 pour la pepsine, par 2,3 pour la collagénase, 2,5 pour la trypsine),
- diminution de la perméabilité de la pilocarpine (*in vivo*) et de la fluorescéine (*in vitro*) ayant pour conséquence un ralentissement de la diffusion au travers des nutriments ou des formulations topiques (121–126).

Le CXL pourrait faire l'objet d'études dans d'autres pathologies cornéennes, en ingénierie tissulaire telles que : la dégénérescence pellucide marginale, la kératectasie iatrogène, la kératopathie bulleuse, l'ulcération de la cornée. Une autre application oculaire, notamment dans le cadre des kératites infectieuses permet l'inactivation d'agents infectieux (selon le même principe que celui du Mirasol system) (122).

En effet, l'étude d'A. Behrens et son équipe montre l'efficacité du CXL, *in vitro*, contre les principales bactéries responsables des kératites infectieuses. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que cette technique a montré une activité sur des souches résistantes aux

antibiotiques (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant et *Streptococcus pneumoniae* résistant) et pourrait constituer une véritable alternative de traitement (129). Cependant, l'équipe de T. Bourcier a montré que le CXL est inefficace contre les organismes fongiques (130). En revanche, au cours de tests *in vitro* sur gélose, l'association du CXL et de l'amphotéricine B, comparée avec l'amphotéricine B seule, a permis d'inhiber la croissance (mesurée par rapport à la surface) d'environ 30 % de *Candida albicans*, 30 % de *Fusarium sp* et 50 % d'*Aspergillus fumigatus*. L'ensemble de ces tests demande d'avantage de résultats et notamment des essais sur l'animal avant d'envisager de tester leur efficacité chez l'homme (130).

2.2.2. Autres exemples de photoréticulation du collagène

2.2.2.1. En odontologie

La dent se compose de deux parties : la couronne (partie apparente qui dépasse de la gencive) et la racine (partie attachée par le ligament alvéolo-dentaire, dans les os maxillaires et mandibulaire). Le collet correspond à la partie de la couronne, en contact avec la gencive (Figure 26). La dentine est protégée par l'émail, au niveau coronaire et le cément au niveau radiculaire. La dentine renferme la pulpe dentaire qui constitue la partie innervée et vascularisée de la dent. Elle est moins minéralisée que l'émail, néanmoins, les éléments minéraux qui la constituent (hydroxyapatite, phosphates, oligoéléments), représentent 70 % en masse ; d'une partie organique (majoritairement constituée par du collagène de type I, 20 %) et d'eau (10%) (131,132).

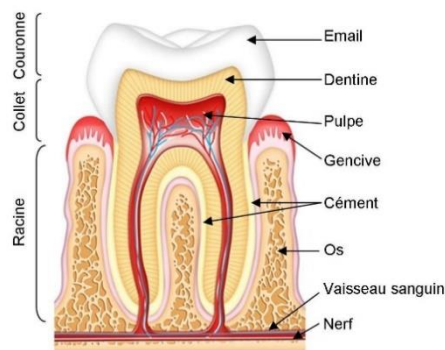


Figure 26 : Anatomie de la dent (133)

La maladie carieuse est due à des infections bactériennes (principalement *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* et *Actinomyces israelii*). Ces bactéries présentes dans la plaque dentaire dissolvent les substances minérales de l'émail puis de la dentine jusqu'à atteindre la pulpe

dentaire (moment où la douleur est ressentie par le patient du fait qu'il s'agisse de la zone innervée de la dent). Elles utilisent les glucides pour leur propre métabolisme et génèrent, au cours de la glycolyse, des acides organiques responsables de la déminéralisation de l'émail (pH inférieur à 5,5). Leur présence est favorisée par des grignotages répétés et la consommation de boissons sucrées ainsi qu'une hygiène bucco-dentaire insuffisante. D'autres facteurs plus spécifiques intrinsèques au patient peuvent intervenir : les facteurs hormonaux (liées aux hypothyroïdies et hypoparathyroïdies), génétiques et salivaires (pH, sécrétion insuffisante, immunologiques : absence d'IgA...). Les principales mesures de prévention consistent en un brossage des dents biquotidien associé à l'utilisation d'un dentifrice fluoré et dans la surveillance dentaire réalisée par un dentiste, une fois par an. Le fluor favorise la reminéralisation en précipitant des ions fluorures, phosphates, hydroxydes (134,135)...

Un interrogatoire initial associé à un examen clinique et un examen radiographique, permettent de déceler la présence d'une carie et d'en réaliser le diagnostic. Dans un second temps, le traitement consiste en l'exérèse du tissu dentaire carié puis à la restauration de l'intégrité de la dent afin de lui rendre sa forme et sa fonction. Différents types de restaurations existent et sont indiqués en fonction de la perte de tissu dentaire (protocole de restauration adhésive directe décrit ci-dessous). L'utilisation de composite de restauration nécessite la création d'une couche hybride, au préalable, à l'aide d'un système adhésif amélo-dentinaire (135).

Le protocole de restauration directe débute par l'étape de mordançage qui consiste en l'administration d'acide orthophosphorique concentré (entre 30 et 40 %, pendant 15 secondes sur la dentine et 30 secondes sur l'émail). Cette étape permet d'éliminer le tissu dentaire superficiel, également appelé « boue dentaire ». Ainsi, il se crée des rugosités de surface et la partie superficielle exposée à l'acide se déminéralise et seules les fibres de collagène subsistent. Il s'en suit une étape de séchage partiel de la dent (131,132).

Ensuite, deux produits peuvent être appliqués simultanément ou dissociés : le primaire et l'adhésif. Le primaire est constitué de monomères amphiphiles (l'hydroxyéthylméthacrylate est couramment utilisé) afin d'interagir avec le collagène humide, d'une part, et avec la résine acrylique, hydrophobe de l'adhésif, d'autre part. Ces systèmes contiennent également des initiateurs (par exemple, la camphorquinone, sous l'action d'énergie lumineuse, induit la

production d'espèces radicalaires puis la photopolymérisation ainsi que la prise du primaire et de l'adhésif). Les irrégularités formées lors du mordantage favorisent l'apparition de brides au sein d'une couche hybride entre le collagène et ces composés résineux ; ils permettent une meilleure adhésion (131,132).

Une fois la couche hybride formée, le montage est effectué par incrémentations et photopolymérisations successives de composite de restauration dentaire. Ces matériaux composites contiennent notamment une résine de méthacrylate. Cet ensemble composite possède des propriétés mécaniques supérieures à chacun des constituants isolés. L'ensemble des monomères est soit photopolymérisé, soit chémozpolymérisé ou bien l'utilisation des deux *stimuli* peut être combinée afin d'induire la polymérisation par des réactions d'addition. Cependant, d'autres protocoles existent et permettent de fusionner ou d'individualiser les étapes décrites précédemment. Les dentistes ont donc recours à une batterie de matériaux, choisis en fonction du protocole appliqué et selon les signes cliniques présentés par le patient (131).

Il a été observé suite au mordantage et à la déminéralisation de la dentine, que le collagène devenait la cible d'enzymes d'origine endogènes : essentiellement les métalloprotéinases matricielles (MMP-2, 3, 8, 9 et 20) et les cathepsines à cystéine. La destruction du réseau de collagène a pour conséquence un vieillissement accéléré du joint dento-protéique, au niveau de la couche hybride (perte d'étanchéité, récurrences carieuses, sensibilité post opératoire, coloration). D'autres facteurs opérateurs dépendants, tels qu'un mauvais séchage (à la suite du mordantage) ou une photopolymérisation insuffisante des monomères conduisent également à l'accélération de la détérioration du joint dento-protéique (131,132).

Afin de lutter contre la dégradation enzymatique du réseau de collagène et de la couche hybride, il a été suggéré d'utiliser la chlorhexidine (un inhibiteur de métalloprotéases), après le mordantage. Cependant, à plus long terme, la chlorhexidine est éliminée à cause de son hydrosolubilité et les MMP retrouvent leur activité (131,132).

C'est dans ce contexte, que l'utilisation d'agents de réticulation a montré son intérêt en odontologie. Les agents chimiques de réticulation tels que les carbodiimides, les proanthocyanidines et les acides tanniques se sont montrés efficaces, mais ils nécessitent un temps d'application d'une heure. Leur application en clinique paraît limitée du fait de cette attente trop

longue. Le glutaraldéhyde possède un temps d'action plus rapide cependant il n'est pas utilisable à cause de sa cytotoxicité pour la pulpe dentaire (136,137).

Des agents de photoréticulation comme les porphyrines, le bleu de méthylène, le rose Bengale sont des photosensibilisateurs connus mais ils paraissent inadaptés d'un point de vue de l'esthétisme, à cause de leur coloration. En revanche, l'utilisation des flavines en solution diluée, de couleur jaune pâle apparaît plus adaptée (137).

Après l'étape de mordantage et de séchage, les équipes d'A. Mazzoni (136) et H.-T. Chang (137) ont administré une solution de riboflavine-5'-phosphate (FMN) sur la dentine et l'ont irradiée par des UV-A. A l'issue de ce prétraitement, ils ont appliqué le primaire et l'adhésif qu'ils ont photopolymérisé puis ont appliqué le composite avant de l'irradier.

D'une part, ces résultats ont montré que la photoréticulation du collagène de la dentine, engendre la formation de liaisons covalentes entre les fibres. Il a également été observé que les fibres de collagène adoptent une orientation isotrope augmentant l'espace inter fibrillaire. Ainsi, ce prétraitement permet d'augmenter les propriétés de rigidité de la dentine et a également pour conséquence une amélioration des propriétés biomécaniques du joint dento-protéique. Les forces d'adhésion et l'étanchéité entre la dentine et la résine sont augmentées (136,137).

D'autre part, les espèces radicalaires, générées lors de l'irradiation des flavines par des UV-A, permettent l'inactivation aspécifique des collagénases : MMP (notamment MMP-9) et des cathepsines. L'inactivation de ces enzymes améliore la résistance et la stabilité de la couche hybride par rapport l'utilisation de chlorhexidine dont l'efficacité est temporaire. Ainsi, l'intégrité du joint dento-protéique face à la biodégradation est assurée sur un plus long terme (136–139).

A.S. Fawzy et son équipe (140) ont proposé d'effectuer ce prétraitement en ajoutant du chitosan à la solution de flavines. Le chitosan est un polysaccharide inerte et biocompatible très intéressant en ingénierie tissulaire. Le chitosan possède des fonctions amines qui lui permettent de participer aux réactions de photoréticulation et de former des liaisons covalentes avec le collagène, mais surtout d'interagir *via* des liaisons ioniques qui lui donnent ses propriétés bioadhésives. La surface de la dentine est alors recouverte de ce film polymérique semicristallin et forme une membrane plus rigide et plus stable que le collagène. L'inactivation des collagénases est conservée

et confère une résistance accrue à la dégradation enzymatique. De plus, il a été observé que la surface formée n'est pas lisse mais possède des microfibrilles qui améliorent l'infiltration de résine et offre de meilleures propriétés mécaniques à la couche hybride (140).

Au cours d'une autre étude, A.S. Fawzy et son équipe (141) se sont intéressés à l'ajout de flavines directement dans le système primaire-adhésif. Cette méthodologie s'avère aussi efficace sur l'inactivation enzymatique que lorsque la solution de flavines est appliquée au cours d'un prétraitement. Les propriétés de pénétration de la résine au sein des irrégularités de la dentine ne sont pas affectées pour des concentrations de flavine de 1 à 3 %. Cette nouvelle procédure offre donc des propriétés d'adhésion comparables, en évitant l'étape de prétraitement. Cet aspect est à prendre en considération car il faciliterait l'utilisation clinique des flavines si elles étaient incorporées au système primaire-adhésif et permettrait un meilleur contrôle de la procédure et une meilleure reproductibilité des résultats (141).

2.2.2.2. En chondrologie

Le cartilage est un tissu conjonctif retrouvé, notamment, au niveau : des articulations, des disques intervertébraux, des jonctions costo-sternales, de la cloison nasale, du larynx, de la trachée, des bronches et des oreilles... Le cartilage articulaire recouvre les extrémités des os et il favorise leur glissement. Il permet également la transmission et l'amortissement des forces mécaniques lorsque les articulations sont sollicitées (142,143).

Le cartilage contient des chondrocytes qui représentent 3 % en masse de ce tissu. Ces cellules sont entourées d'un réseau de fibres de collagène (de type II, IX et XI (20 %)), de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes (GAG : héparanes sulfates, kératanes sulfates, chondroïtines sulfates, dermatanes sulfates, acide hyaluronique ... (7 %)). Ces molécules constituent la MEC et permettent la rétention de l'eau (70 %) (142,143).

Le cartilage n'étant pas innervé, ni vascularisé, ce tissu possède de faibles capacités de cicatrisation alors qu'il est particulièrement exposé aux traumatismes. Les principales chondropathies sont l'arthrose suite à l'usure et au vieillissement du cartilage ainsi que l'arthrite dont l'origine est inflammatoire (142).

L'arthrose est une forme rhumatismale fréquente dont les principaux facteurs de risques sont : l'âge, l'obésité, l'activité physique intense ou le port fréquent de charges lourdes, la polyarthrite rhumatoïde ou encore l'hérédité. Cette pathologie se caractérise par des raideurs et douleurs articulaires ainsi qu'une gêne fonctionnelle (144).

Au cours de plusieurs études, M. Lee et son équipe (145–148) ont proposé une approche d'ingénierie tissulaire afin de reconstituer les tissus cartilagineux lésés superficiellement. Leur objectif consistait, en l'encapsulation de chondrocytes au sein d'un polymère biocompatible : le chitosan glycol méthacrylé (CGM), possédant des similarités chimiques avec les GAG. Ce polymère gélifie lors de sa photoréticulation à l'aide d'un photosensibilisateur et de la lumière. Dans un premier temps, ils ont comparé trois photosensibilisateurs : la camphorquinone, la fluorescéine et la RF (145). Ces molécules ont été irradiées par une lumière visible, du fait qu'elle est moins énergétique et cytotoxique que la lumière UV, mais aussi car elle permet une atteinte plus profonde des tissus. La RF a été retenue étant donné que les résultats de viabilité cellulaire (80-90 % de survie) étaient les meilleurs. Ces cellules ont également d'excellentes propriétés de prolifération au long cours, sans changement de leur phénotype, après irradiation. De plus, le gel photoréticulé présentait des propriétés de résistance mécanique améliorées après avoir exercé une force de compression et une résistance accrue face à la dégradation enzymatique. Ce dernier paramètre est à prendre en compte car la concentration en lysozymes est 1000 fois supérieure au niveau du cartilage par rapport au sérum (145).

Au cours d'une seconde étude (146), ils ont encapsulé ces chondrocytes en présence d'acide hyaluronique (AH) afin d'introduire un milieu plus favorable à la prolifération de ces cellules. Par ailleurs, les charges opposées des fonctions amines du CGM et acides carboxyliques de l'AH ont renforcé la densité du gel ainsi que la stabilité mécanique et enzymatique grâce à la formation de liaisons ioniques. La viabilité post irradiation reste proche de 90 %, cependant, l'adhésion et la prolifération sont supérieures en présence d'AH. Les cellules formant des clusters conservent leurs propriétés phénotypiques et augmentent leur production de GAG, *in vitro* (146).

Lors de leurs travaux suivants, ils ont montré les capacités de cellules souches mésenchymateuses (CSM) à se différencier au sein d'un gel constitué de CGM et de collagène de type II photoréticulés (Figure 27). Ces cellules ont été utilisées car elles ont la capacité de se

différencier en chondrocytes et leur accès est plus facile (moelle osseuse, tissus adipeux, périoste, muscles squelettiques, liquide synovial). De plus, ces cellules indifférenciées restent viables au cours de leur encapsulation. Une fois différenciées notamment grâce à la présence du collagène II qui joue un rôle essentiel dans la chondrogenèse, elles prolifèrent et retrouvent la capacité de synthétiser des GAG, *in vitro* (147).

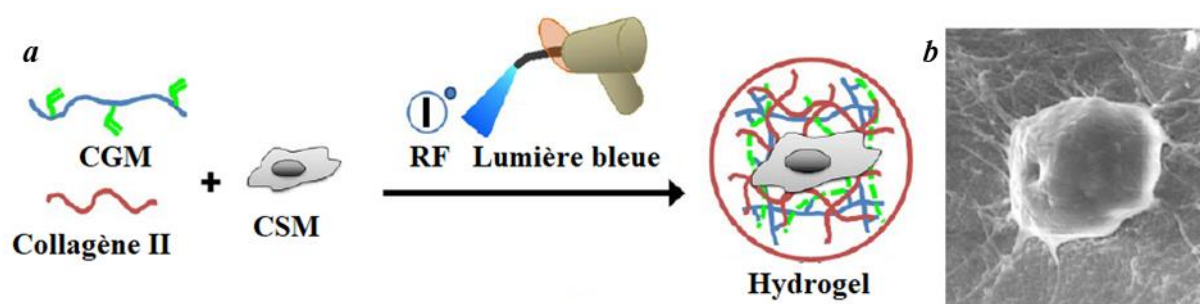


Figure 27 : a°) Encapsulation de chondrocytes dans un hydrogel photoréticulé ; b°) Image de microscopie électronique à balayage d'un chondrocyte encapsulé (147)

Cependant, la présence seule du collagène II limite le développement des chondrocytes. Une raison pour laquelle, par la suite, ils se sont intéressés à l'ajout d'un facteur de croissance, le TGF- β 1 impliqué physiologiquement dans ce processus. Les taux de viabilité des CSM après irradiation ont été évalués à 93 %. Dans ces conditions, les cellules ont proliféré, formé des agrégats et sécrété 4,5 fois plus de GAG, très importants pour la reconstitution de la MEC. Les premiers tests *in vivo*, se sont avérés encourageants, du fait de l'absence d'effets indésirables après une injection sous-cutanée du gel (148).

L'équipe de P.A. Torzilli (149) a lié chimiquement un hyaluronate de sodium et la tyramine. Cette molécule gélifie sous l'effet de la photoréticulation en présence de RF notamment grâce à la dimérisation des molécules de tyramine, en préservant les charges négatives. Le gel formé est stable, biocompatible et peu cytotoxique. Les hyaluronates permettent une captation des molécules d'eau et la photoréticulation diminue l'efflux d'eau. Les propriétés mécaniques sont améliorées et notamment la résistance aux forces de compression. Il est également possible que la dégradation enzymatique et l'adhésion des macrophages, impliqués dans des réactions inflammatoires, soient diminuées (149).

L'équipe de S. Hwang (150) s'est intéressée à la régénération du ménisque selon un procédé similaire. Ce cartilage est un fibrocartilage (Figure 28) qui permet la protection des cartilages, tibial

et fémoral, par absorption des chocs. Les lésions méniscales sont communes chez les sportifs. Elles provoquent le blocage du genou en demi-flexion avec impossibilité d'extension. Les fissurations ou ruptures du ménisque sont diagnostiquées *via* un examen clinique (manipulation articulaire), alors que les examens d'imagerie médicale (radiographie, IRM) permettent d'identifier la présence éventuelle de pathologies associées. Le traitement peut consister en une méniscectomie, car ce fibrocartilage ne cicatrise pas. Cependant, cela prédispose les patients à l'apparition d'arthrose (150,151). L'équipe de S. Hwang a donc mis au point un hydrogel composé de collagène de type I, de RF et d'AH, encapsulant des CSM. Ce gel photoréticulé sous l'action de la lumière, est exposé au TGF- β 1 et sert de matrice biocompatible afin de constituer un microenvironnement propice à la régénération du cartilage méniscal. Les résultats obtenus sont comparables à ceux de M. Lee et son équipe (148). Ils ont ainsi constaté une augmentation du module d'élasticité d'un facteur 5,5 après photoréticulation (150).

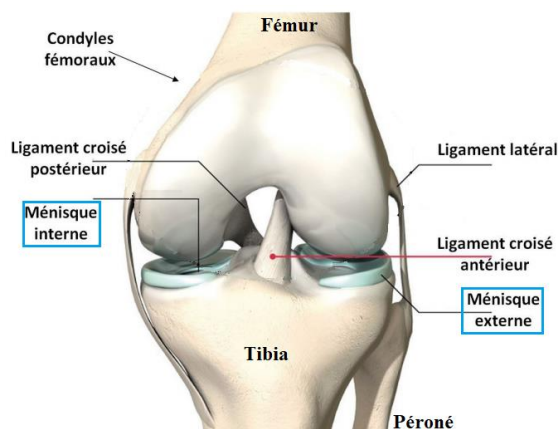


Figure 28 : Anatomie du genou (152)

Les équipes de L.J. Bonassar (153,154) et R. Härtl (155) ont travaillé sur les pathologies des disques intervertébraux. Les disques sont situés entre les vertèbres et ont un rôle dans l'amortissement et la distribution des pressions. Les disques ont une forme biconvexe. Ils sont composés d'un anneau fibro-cartilagineux périphérique : l'*annulus fibrosus* (AF), où les fibres sont organisées de manière concentrique autour du *nucleus pulposus* (NP) dont la consistance est molle et gélatineuse. La hernie discale est une discopathie qui atteint principalement la région lombaire. Le processus dégénératif débute par l'atteinte de l'AF. De ce fait, et au fil du temps, le NP migre vers le canal spinal et y comprime les voies nerveuses (Figure 29). Il en résulte l'apparition de douleurs neuropathiques handicapantes. Le traitement actuel consiste en la discectomie avec fusion

partielle ou complète des vertèbres adjacentes. Cependant, malgré l'ablation chirurgicale du disque, certains patients développent des formes de douleur chronique (154–156).

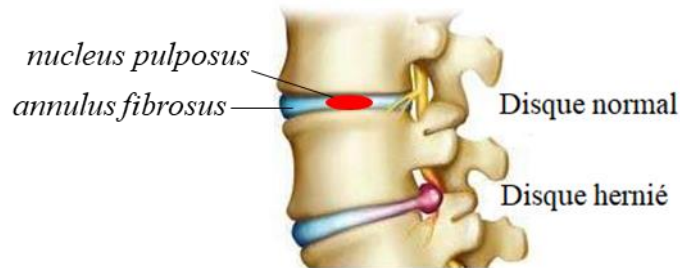


Figure 29 : Hernie discale (157)

C'est dans ce contexte que L.J. Bonassar et son équipe ont étudié la réparation de l'AF par injection de collagène de type I, photoréticulé en présence de RF. Ils ont montré sur des modèles *ex vivo*, que le gel formé, du fait de sa densité et de sa rétention des molécules d'eau améliorerait les propriétés du disque face aux contraintes mécaniques (153). Au cours d'une seconde étude, ils ont proposé une réparation du NP avec un AH modifié (HYADD4®). Le NP est stabilisé en réalisant un patch au niveau de l'AF avec du collagène photoréticulé en présence de RF. Ils ont montré que la résistance à la compression était essentiellement due au rétablissement de l'intégrité du NP suite à l'injection du dérivé d'AH. En revanche, le patch de collagène contribue à une meilleure rétention d'eau au sein du disque. La combinaison de ces deux approches semble prometteuse afin de rendre leur fonctionnalité aux disques intervertébraux herniés (154).

Härtl et son équipe (155) ont également photoréticulé du collagène au niveau discal, sous l'effet de la RF et de lumière bleue. Ils ont montré la capacité de fixation du gel au tissu discal afin de combler le tissu lésé, sa biocompatibilité traduite par une viabilité cellulaire afin de régénérer le disque. Ce procédé ralentit la dégradation et favorise la migration des fibroblastes du disque et leur infiltration au sein du gel photoréticulé. Ces cellules contribuent à la synthèse du tissu conjonctif fibreux et au remodelage du disque intervertébral.

2.2.2.3. En ostéologie

Des pathologies osseuses surviennent suite à des traumatismes, des opérations chirurgicales, des maladies congénitales ou dégénératives comme l'arthrose. Contrairement au tissu cartilagineux, l'os est vascularisé et innervé ce qui lui confère des propriétés de régénération. Cependant, la

régénération osseuse est limitée. Actuellement, les patients souffrant d'un défaut de cicatrisation osseuse sont traités par chirurgie en réalisant une greffe autologue osseuse.

L'équipe de M. Lee a adapté le protocole utilisé pour les traitements de tissus cartilagineux (décrit précédemment) pour la réparation de tissu osseux. Leur objectif consiste en la formulation d'un gel de CGM, photoréticulé à l'aide de RF, activée par une lumière bleue. Ce gel encapsule des CSM. Les cellules progénitrices se différencient, par la suite, en ostéocytes impliqués dans la régénération de l'os lésé. Afin de créer un environnement favorisant la prolifération et la différenciation, ils ont incorporé du collagène de type I dans le gel. Le collagène I a également la capacité d'introduire de l'encombrement qui réduit l'accès aux enzymes et ralentit la dégradation du gel. Les marqueurs de différenciation observés au cours de l'ostéogenèse sont l'augmentation des phosphatases alcalines (marqueur précoce) et le dépôt de calcium (marqueur plus tardif : impliqué dans la reminéralisation osseuse, responsable de l'opacification tissulaire). La prolifération a été contrôlée par dosage de l'ADN et ils ont constaté, visuellement la formation de couches multicellulaires (158).

Au cours de leur étude suivante, M. Lee et son équipe ont ajouté à la formulation précédente des lysozymes. Leur objectif était d'encapsuler ces enzymes afin qu'elles puissent contrôler la dégradation du polymère. Ainsi, ils ont pu vérifier qu'il se formait des pores qui facilitent la pénétration de molécules de la MEC capables d'interagir avec les CSM et d'induire leur prolifération et leur migration. Des essais *in vivo*, sur des souris ayant subi une craniotomie montrent que les *calvaria* des animaux traités avec le gel contenant les lysozymes favorisent une meilleure régénération osseuse que les témoins non traités ou seulement avec le gel de CGM (Figure 30). Du fait de l'activité antimicrobienne des lysozymes, capables de cliver les peptidoglycanes des bactéries Gram positives, ce système pourrait avoir une deuxième application pour diminuer les risques infectieux. L'encapsulation d'un principe actif capable d'induire l'angiogenèse figure parmi leurs perspectives afin d'induire la régénération vasculaire et tissulaire. En revanche, l'inconvénient de cette approche réside dans le manque de contrôle de l'activité enzymatique aboutissant en la formation de pores de tailles non homogènes. Cette importante variation de taille limite la diffusion de facteurs de croissance et conduit à une inégalité de prolifération et de différenciation des cellules dans le gel et constitue un objectif afin d'améliorer ce système (159).

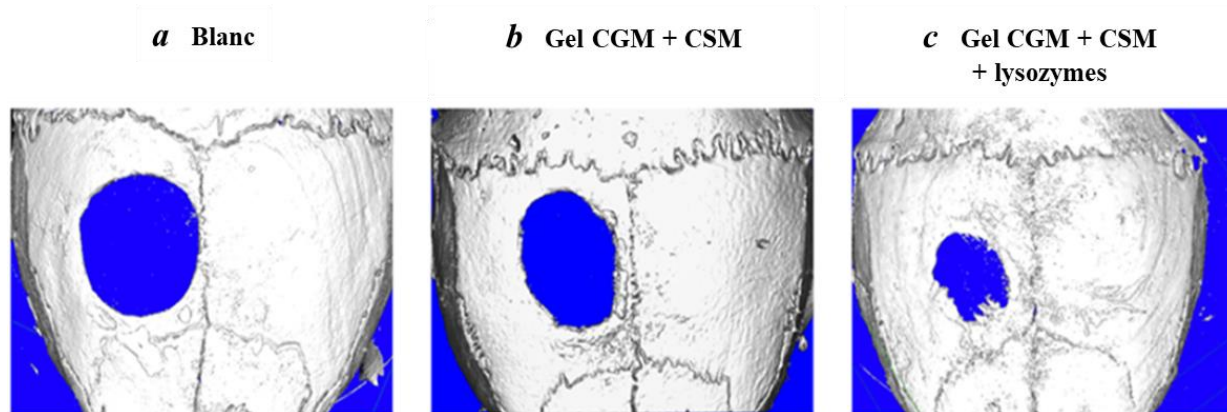


Figure 30 : Calvaria de souris : a°) Après craniotomie 3 mm, b°) après application gel CGM (témoin), c°) cicatrisation plus rapide avec le traitement gel CGM +CSM + lysozymes (159)

2.2.2.4. En cardiologie

Le cœur est un viscère situé dans la cage thoracique entre les poumons. Il s'agit d'un organe creux et contractile qui joue le rôle de pompe. En effet, la partie gauche du cœur, composée de l'oreillette gauche et du ventricule gauche séparés par la valve mitrale (Figure 31), irrigue l'ensemble des organes au travers de la grande circulation. Il régule le débit sanguin en fonction des besoins physiologiques et l'augmente, par exemple, au cours d'un effort physique. La partie droite du cœur (oreillette droite et ventricule droit séparés par la valve tricuspide) permet l'éjection du sang dans la petite circulation et son oxygénation au niveau des alvéoles pulmonaires (160).

D'un point de vue histologique, la paroi interne se compose de l'endocarde. Cet endothélium tapisse une tunique musculaire contractile : le myocarde. Une enveloppe protectrice appelée péricarde recouvre le myocarde. Le péricarde est formé de deux feuillets. Le péricarde séreux est en contact avec le myocarde et est séparé par la cavité péricardique du péricarde fibreux, plus superficiel. Au sein du tissu myocardique, dans la paroi de l'oreillette droite, se trouve le nœud sinusal (ou nœud de Keith et Flack) capable de donner l'impulsion électrique qui stimule et entretient les battements du cœur. Ce courant électrique se propage jusqu'au nœud atrioventriculaire (ou nœud d'Aschoff-Tawara) situé dans l'oreillette droite, au niveau de la paroi interatriale. Ce deuxième nœud régule l'impulsion électrique et la transmet au faisceau de His localisé dans la paroi interventriculaire. Ce faisceau se divise en deux branches, droite et gauche, dont les ramifications forment le réseau de Purkinje qui se distribue dans le myocarde ventriculaire et induit la contraction des ventricules (160).

La fréquence cardiaque est également influencée par son innervation parasymphatique permise par le nerf vague (X). Par ailleurs, le cœur est vascularisé par les artères coronaires. L'oblitération de l'une d'entre elles, mène à un infarctus du myocarde. Cette ischémie induit la nécrose des tissus non vascularisés. Au cours de la cicatrisation, les cardiomyocytes n'ayant pas la capacité de proliférer, le tissu nécrosé est remplacé par du tissu fibreux, non contractile (158).

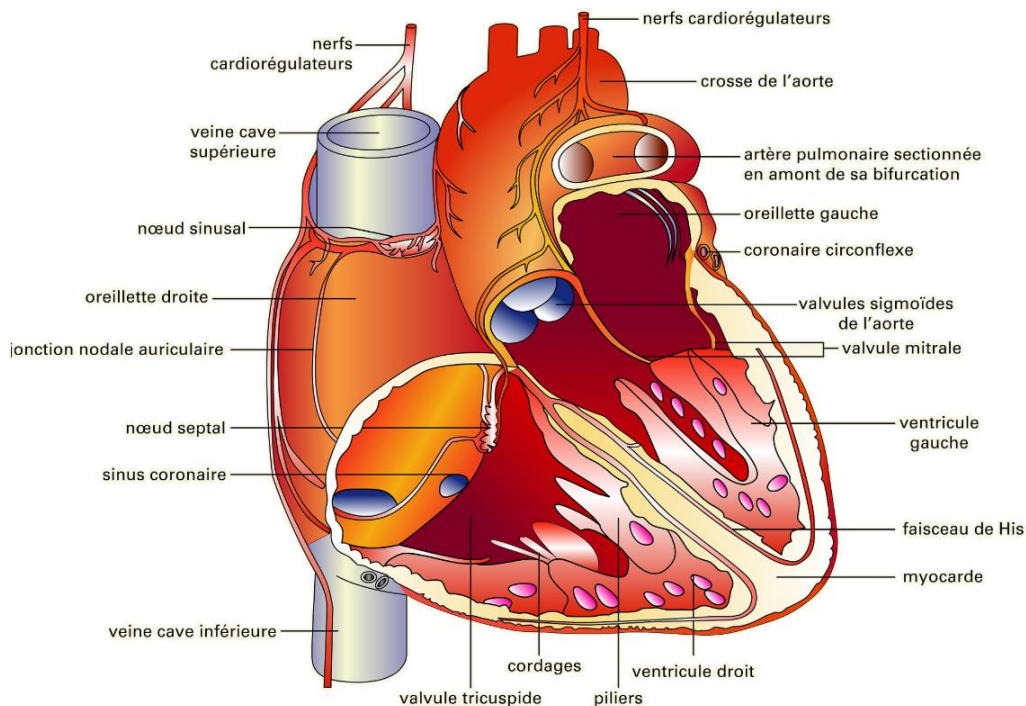


Figure 31 : Structure du cœur (160)

A. Heisterkamp et son équipe (161) ont mené une étude afin de réaliser de l'ingénierie tissulaire tridimensionnelle (3D) sur du tissu cardiaque, sans altérer les cardiomyocytes. Afin d'induire la photoréticulation de ce tissu, ils ont utilisé un laser femtoseconde dans le proche infrarouge. Le processus d'excitation est non-linéaire. En effet, deux photons de plus faible énergie mais plus pénétrants, sont absorbés dans un intervalle de temps de l'ordre de la femtoseconde. Ainsi, ils permettent la conversion ascendente en un photon d'énergie supérieure capable de photosensibiliser la RF et générer des espèces radicalaires. Ce procédé a permis de traiter efficacement le tissu bio-artificiel sur une hauteur de 520 μm , soit 65 % de la hauteur totale. Ils ont constaté l'augmentation des propriétés mécaniques (rigidité et élasticité) et le maintien de la viabilité des cellules (fibroblastes et cardiomyocytes) et de leur force de contraction. Cette

méthodologie permet un contrôle spatial de haute précision, en 3D, de la photoréticulation du collagène tissulaire (161).

M. Schulz-Siegmund et son équipe se sont intéressés à la mise au point d'un protocole de décontamination et de décellularisation du tissu provenant du péricarde. Ce tissu peut notamment être utilisé dans la reconstruction des valves cardiaques. Le protocole utilise notamment une solution de RF irradiée suivie d'une irradiation électronique de faible énergie afin d'inactiver des bactéries et les spores de ce tissu (162).

La bio-impression 3D est une technique récente qui est actuellement en développement. Cette approche est très intéressante car elle apporterait une solution face à la croissance de la demande de greffe et au manque de donneurs. La bio-impression 3D permettrait également une diminution du rejet d'organe suite à sa transplantation. Bien que le tissu cardiaque soit complexe (hétérogénéité cellulaire), l'équipe de D.-W. Cho (163) a étudié l'intérêt de compléter la bio-impression 3D de ce tissu par la photoréticulation, initiée par l'irradiation de la RF par des UV-A. Leur objectif est d'augmenter le module d'élasticité (à 10-15 kPa) et la rigidité (supérieure à 1 kPa) du tissu imprimé afin que ses propriétés se rapprochent de celles des tissus naturels. Le tissu cardiaque a été reconstitué à partir d'une MEC humaine décellularisée, de cardiomyocytes et de RF puis a subi une gélification en deux temps. Tout d'abord, une photoréticulation puis un changement conformationnel thermique des protéines, lors d'une étape d'incubation à 37°C (Figure 32). Ils ont tout d'abord observé que la RF augmentait légèrement la viscosité qui est un paramètre très important pour que le tissu imprimé conserve sa structure. Ils ont montré que les deux étapes de gélification permettent une augmentation du module d'élasticité à 15,74 kPa. Cependant l'étape de photoréticulation contribue principalement à cet effet et permet de conserver une viabilité de 95 % des cardiomyocytes. Lorsque la bio-impression 3D de tissu utilise des cellules progénitrices cardiaques, ces cellules prolifèrent et se différencient davantage après 7 jours, sur une matrice plus rigide notamment du fait de la production de facteur de transcription (163).

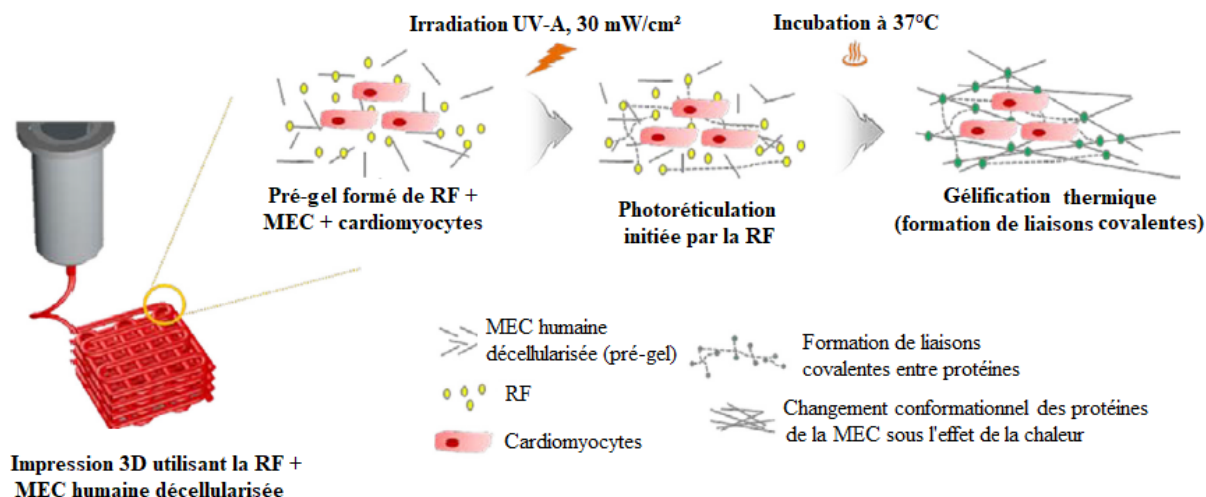


Figure 32 : Bioimpression 3D : gélification par photoréticulation et effet thermique (163)

K.K. Parker et son équipe (164) ont utilisé la bio-impression 3D afin de former des microstructures, contenant des cardiomyocytes. Les cellules cardiaques ont été insérées au sein d'une matrice en gélatine et photoréticulées (photosensibilisée par la FMN). Ce procédé est plus rapide et présente l'avantage d'être reproductible, avec peu de variabilité spatiale. Les microstructures formées sont anisotropes et ont un module d'élasticité, comparable au cœur humain. Cependant, de façon tout à fait remarquable, ces microstructures ont montré que les cellules étaient viables et surtout, capables de réponses contractiles spontanées et sous l'impulsion d'un signal électrique. Au cours des prochaines années, K.K. Parker et son équipe souhaitent réaliser des microstructures de cellules musculaires ainsi que de cerveau (en utilisant des neurones et cellules gliales) selon ce même modèle. A l'avenir, la bio-impression 3D de tissus photoréticulés pourrait être utilisée dans un but d'ingénierie tissulaire et connaître des champs d'application élargis (164).

2.3. Autres applications des flavines

2.3.1. Système nerveux central

2.3.1.1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une démence, dont les principaux symptômes sont la perte de mémoire, la désorientation spatiale et le ralentissement des capacités intellectuelles. La prévalence de cette pathologie est en augmentation du fait, qu'elle affecte, les personnes âgées et d'autre part, du fait du vieillissement de la population. D'un point de vue moléculaire, la MA se caractérise par une déficience des neurotransmissions cholinergiques, une réponse inflammatoire, l'augmentation des concentrations des protéines tau et amyloïde-béta ($A\beta$). Ces dernières s'assemblent et forment des fibrilles neurotoxiques, ayant une structure de feuillet- β . Il a également été remarqué une élévation excessive du stress oxydatif. Ce phénomène est causé par une augmentation des concentrations d'ERO. En effet, les quantités d'ERO produites dépassent les capacités des enzymes anti-oxydantes : catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GSH-Px). L'accumulation des ERO induit la peroxydation des lipides, des protéines et de l'ADN entraînant l'apoptose neuronale (165).

L'équipe de K. Zhao (165) a montré un effet protecteur de la RF, sur un modèle murin. Ils ont observé que la RF induit une augmentation significative de l'expression du facteur de transcription nucléaire Nrf2 (connu pour être impliqué dans les maladies cardiovasculaires, des systèmes nerveux et digestif). La forme cytoplasmique Nrf2 activée (non liée à la protéine inhibitrice Keap1), migre dans le noyau et favorise l'expression et l'activité des protéines anti-oxydantes CAT, SOD, GSH-Px. Ainsi, les souris traitées avec la RF ont des capacités cognitives (orientation spatiale, apprentissage, mémorisation) significativement améliorées (165).

R. Csuk et son équipe (166) ont synthétisé des molécules reliant deux molécules de RF acétylées ou deux isoalloxazines reliées par un espaceur pipérazine dialkylée (Schéma 11). Ces molécules sont dépourvues de fonctions alcools qui ont été acétylées ou supprimées. Ces modifications chimiques augmentent la lipophilie et le coefficient de partage de ces molécules, favorisant le passage de la barrière hémato-encéphalique. Ces deux composés hétérocycliques peuvent interagir par des liaisons de type π -stacking avec les résidus tyrosines des protéines $A\beta$ et perturber la formation des neurofibrilles cytotoxiques à des concentration de 4 μ M (166).

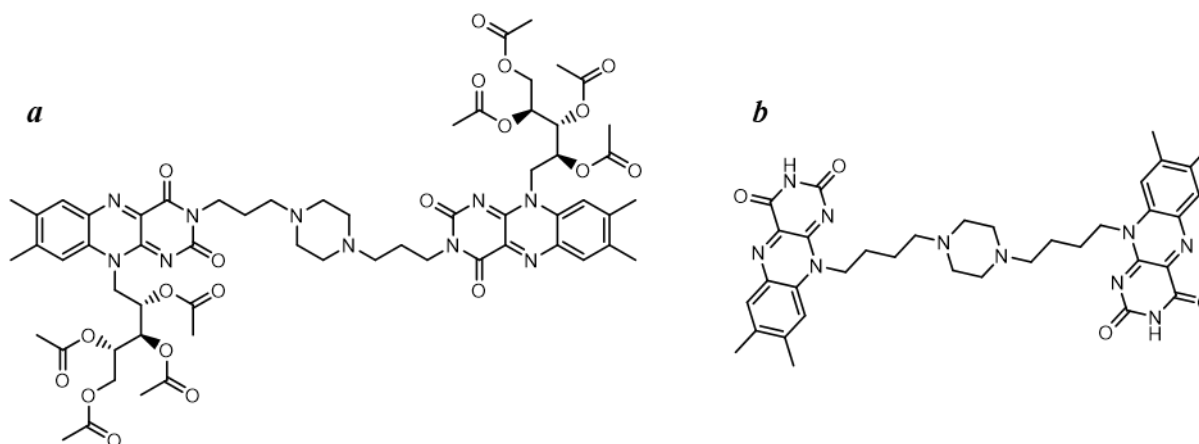


Schéma 11 : a°) bis-riboflavine ; b°) bis-isoalloxazine (166)

L'équipe de M. Kanai (167) et Y. Sohma (168) se sont intéressés au traitement de la protéine A β , *in vitro*, en présence de RF, irradiée par une lumière visible (500 nm). Ils ont remarqué que la photooxygénation permettait la modification des résidus tyrosines, histidines et méthionines, essentiellement localisés dans le premier tiers du peptide. La détérioration du peptide diminue considérablement l'agrégation sous forme de feuillet- β (Figure 33) et la cytotoxicité neuronale (167,168).

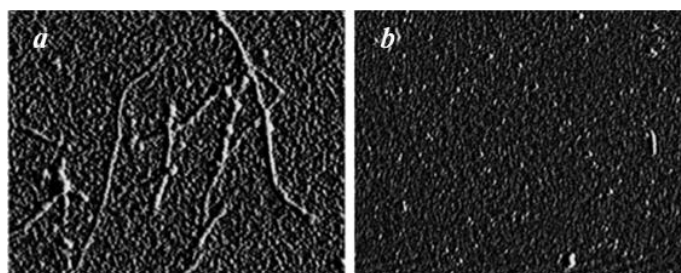


Figure 33 : Imagerie par microscopie à force atomique des fibrilles de peptide A β : a°) natives ; b°) après photooxygénation (167,168)

2.3.1.2. La sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot est une maladie neurodégénérative liée à la mort progressive des motoneurones. L'essentiel des cas diagnostiqués sont sporadiques (90 %). Le décès du patient survient dans les 5 années après le diagnostic (effectué entre 50 et 70 ans). La SLA se manifeste au début par une difficulté à déglutir et articuler, des raideurs musculaires et articulaires puis par une fonte musculaire jusqu'à l'atteinte des muscles respiratoires. Cette maladie multifactorielle est notamment caractérisée par un stress oxydatif important (anomalie SOD), une excitotoxicité du glutamate, une auto-immunité (169)...

L'équipe de S.A. Sadiq (169) a investigué la cible potentielle des anticorps monoclonaux produits. Cette étude a été menée sur les tissus d'un patient décédé. Ils ont découvert que les IgA produites sont dirigées contre la FAD synthétase responsable de l'adénylation de la FMN en FAD. Ils ont également observé une diminution significative de l'expression de cette enzyme mais aussi d'autres enzymes impliquées dans la respiration mitochondriale (riboflavine kinase, cytochrome C1, sous-unité B de la succinate déshydrogénase). De ce fait, la respiration mitochondriale qui est impliquée dans le transport d'électrons, est altérée et provoque un dysfonctionnement du métabolisme oxydatif puis cause la mort des motoneurones. Par ailleurs, cette IgA reconnaît également une autre protéine, la NFH (neurofilament protein), bien qu'elle n'ait pas d'homologie de séquence peptidique. Il est possible que la reconnaissance de l'épitope soit due à une conformation similaire (169).

J.J. Anders et son équipe (170) ont traité des modèles murins de la SLA soit avec de la RF seule ou accompagnée par une thérapie lumineuse infrarouge à 810 nm (activité anti oxydante et neuroprotectrice). Aucun des deux groupes n'a montré d'effet protecteur et d'allongement du temps de survie ou encore d'amélioration motrice (170). Cette inefficacité vis-à-vis de la RF semble cohérente avec les conclusions de l'équipe de S.A. Sadiq (169). Malgré l'apport du substrat, la FAD synthétase demeure en incapacité de produire la FAD et en incapacité de rétablir le métabolisme normal.

2.3.1.3. La migraine

La migraine est un trouble qui affecte 12 % de la population et préférentiellement les femmes (3 fois plus impactées que les hommes). Les crises ont un impact qui entraîne une détérioration de la qualité de vie, d'un point de vue social et des activités professionnelles. Les crises sont invalidantes car elles durent 4 à 72 heures et se manifestent par des maux de têtes chroniques unilatéraux et pulsatiles, des nausées, des vomissements, une photophobie et une phonophobie... Les crises sévères de migraine sont principalement traitées par des triptans (les patients ne répondant pas aux triptans sont traités par des dérivés ergotés) associés ou non à des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou des antalgiques. La précocité du traitement influence la sévérité et la durée de la crise (171).

Le deuxième enjeu du traitement de la migraine réside dans la prise d'un traitement de fond qui permet de diminuer la fréquence, l'intensité et la durée des crises. L'utilisation des traitements prophylactiques actuels s'appuie sur les mécanismes physiopathologiques multifactoriels de cette pathologie :

- l'excitabilité anormale des neurones hypothalamiques et corticaux entraînant leur dépolarisation.

- l'hyperexcitabilité du nerf trijumeau (V) prédispose aux migraines. En effet, certaines mutations de canaux ioniques calciques ont été décrites.

- ils déclenchent le relargage axonal de neuropeptides vasoactifs qui initient le phénomène inflammatoire au niveau de la dure mère.

- l'amplification de l'inflammation par activation des cellules endothéliales, des mastocytes et des plaquettes qui libèrent des substances pro-inflammatoires (cytokines, sérotonine, oxyde nitrique).

- la vasodilatation des vaisseaux de la région méningée. L'afflux sanguin entraîne une hypertension localisée et cause la douleur (171).

Les principaux principes actifs utilisés dans le cadre des traitements prophylactiques des crises de migraine sont l'amytriptiline, le propranolol, la flunarizine, l'acide valproïque et le topiramate. D'autres alternatives thérapeutiques existent (Tableau 4). Les différentes stratégies consistent à diminuer le débit sanguin, l'excitabilité neuronale principalement en diminuant la libération de neuromédiateurs activateurs ou l'inflammation (171).

Tableau 4 : Principes actifs utilisés dans la prophylaxie des crises de migraine (171,172)

Traitements	Classes thérapeutiques	Effets thérapeutiques	Principes actifs
Recommandés par la HAS (171,172)	Béta-bloquants	Vasoconstriction	Propranolol, métoprolol, timolol, aténolol, nadolol
	Antidépresseur	Inhibition de la recapture de noradrénaline et sérotonine	Amitriptyline
	Inhibiteur calcique	Diminue la libération d'histamine, dopamine, sérotonine, acétylcholine	Flunarizine
	Antiépileptiques	Libération de GABA augmenté et glutamate diminué	Topiramate, acide valproïque, gabapentine
	Antagonistes sérotoninergiques	Diminution de la libération de sérotonine	Pizotifène, méthysergide

	Autres antimigraineux	Diminue la libération d'histamine, sérotonine, effet antiémétique	Oxétorone, indoramine
En cours d'essais cliniques ou non utilisés mais ayant montré une activité (171)	Béta-bloquant	Vasoconstriction	Néбиволол
	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion	Baisse de la pression artérielle	Captopril, lisinopril
	Antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II	Baisse de la pression artérielle	Candesartan
	Antidépresseurs	Inhibition sélective de la recapture de la sérotonine	Fluoxétine, fluvoxamine, paroxétine, sertraline, citalopram
	Inhibiteurs calciques	Diminue la libération d'histamine, dopamine, sérotonine	Cinnarizine / cyclandelate
	Antipsychotique	Antagoniste sérotoninergique, dopaminergique et cholinergique	Olanzapine
	Antileukoïtriène	Anti-inflammatoire	Montélu kast
	Autres antimigraineux	Anti-inflammatoire	Mélatonine
	Autre antimigraineux	Myorelaxation	Toxine botulique

Une supplémentation nutritionnelle peut également avoir des effets intéressants : la camomille (contient de la mélatonine), les extraits de racine de pétasite (effet anti-inflammatoire), les acides gras polyinsaturés (effet anti-inflammatoire potentiel), le magnésium (cofacteur d'enzymatique, implication dans la neurotransmission sérotoninergique et la synthèse d'oxyde nitrique), la RF, le coenzyme Q10 et la niacine (cofacteurs enzymatiques impliqués dans la respiration mitochondriale). Plusieurs études ont montré l'efficacité de la RF à haute dose, dans le traitement de fond de la migraine chez l'adulte. Les mécanismes évoqués sont la stabilisation de la fonction neuronale, la restauration de l'homéostasie des phosphates (171). De plus, la diminution du métabolisme oxydatif mitochondrial perturbe l'excitabilité des neurones du cortex. G. Comi et son équipe ont montré que la RF contribue à la restauration des capacités de production énergétique mitochondriale et diminue l'hyperexcitabilité cérébrale (173).

L'utilisation de RF chez l'enfant (patients plus fragiles) a été étudiée afin de vérifier son efficacité car elle a l'avantage de ne pas présenter d'effets secondaires contrairement aux principes actifs prescrits pour les patients adultes. Plusieurs études réalisées en pédiatrie ont montré des résultats controversés. A. Parmeggiani et son équipe ont montré que la prise quotidienne de RF à forte dose (200 mg pendant 4 mois), réduisait significativement la fréquence et l'intensité des crises et plus particulièrement chez les garçons. En revanche, cette étude ne comporte pas un groupe de patients ayant reçu un placebo, évoquant des problèmes éthiques vis-à-vis de la population jeune étudiée (174). A l'opposé, les équipes de J. Anthony (175) et de W.-F. Arts (176) ont montré une

inefficacité de la RF dans la prophylaxie de la migraine chez les enfants. En effet, ils ont administré quotidiennement 200 mg (âge 5 à 15 ans, 3 mois de traitement) (175) et 50 mg (âge 6 à 13 ans, 4 mois de traitement) (176) respectivement, sans remarquer d'effet favorable. En effet, la fréquence, la durée et l'intensité des crises de migraine ne diminuent pas significativement (175,176).

2.3.1.4. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative qui affecte les neurones dopaminergiques de la substance noire. La MP se caractérise par un stress oxydant qui induit la dégradation de lipides, protéines et ADN neuronaux, notamment à cause de la diminution des concentrations de facteurs protecteurs comme le glutathion. La dopamine participe à ce stress oxydant et contribue à la vulnérabilité des neurones. En effet, son oxydation en intermédiaire quinone est suivie par sa cyclisation et conduit en la formation d'une espèce hautement réactive l'aminochrome. L'aminochrome est réduit en neuromélanine qui s'accumule dans la substance noire. Cette substance déclenche une réaction inflammatoire, amplifiée par les cellules microgliales, qui exacerbe la dégénération neuronale. Par ailleurs, la production d'ERO est également causée par une dysfonction mitochondriale qui favorise la peroxydation des phospholipides mitochondriaux et déclenche l'apoptose des neurones. L'apoptose est aussi causée par la formation de corps de Lewy suite à l'accumulation d'agrégats d' α -synucléine (177).

La MP atteint principalement les patients de plus de 65 ans. La MP se manifeste essentiellement par les symptômes suivants : une bradykinésie (mouvements lents) qui évolue vers une akinésie (absence de mouvements), une hypertonie musculaire (rigidité musculaire et articulaire) et des tremblements au repos (177).

La RF possède de multiples effets neuroprotecteurs, qui peuvent être utilisés dans le traitement de la MP et de la migraine, en diminuant :

- le stress oxydatif car la FAD est utilisée comme groupement prosthétique de la glutathion réductase qui convertit le glutathion oxydé en sa forme réduite active. Elle permet aussi, une élévation des taux de SOD et GSH-Px, qui sont des enzymes antioxydantes. La RF est impliquée dans la formation du phosphate de pyridoxal, forme active de la vitamine B₆. Par ailleurs, la forme réduite de la RF, la dihydroriboflavine possède également un effet antioxydant et désactive les peroxydes lipidiques (177).

- l'inflammation neuronale en inhibant la migration du NF- κ B, au niveau nucléaire et par conséquent, la transcription de gènes pro-inflammatoires (TNF- α , COX2, IL-1 β , production d'oxyde nitrique...). A l'inverse, la transcription de gènes anti-inflammatoires est favorisée (IL-10, MCP-a). La RF est aussi impliquée indirectement dans la biosynthèse de la vitamine D qui possède une activité inflammatoire indirecte (177).

- les dysfonctions mitochondriales, en augmentant la concentration de FAD, indispensable à la respiration mitochondriale (177).

- la concentration en homocystéine qui est neurotoxique. Sa métabolisation utilise la RF directement et indirectement via le phosphate de pyridoxal. La 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) est impliquée dans ce processus. La substitution de la cytosine 377 en thymine conduit au remplacement lors de la traduction d'une isoleucine par une valine. Ce génotype est associé à des taux d'homocystéine augmentés (177) (cf. 3.2.2.1 L'hypertension). De plus, lorsque des personnes sont homozygotes pour cette mutation, elles ont plus de risque de développer une schizophrénie ou des psychoses. La supplémentation en RF améliore les symptômes de ces patients (178).

- l'excitotoxicité glutamatergique en inhibant la libération neuronale de glutamate. De plus, la voie de la kynurénine intervient dans la métabolisation du tryptophane. Cette molécule est elle-même transformée en acide kynurénique (métabolite neuro-actif, antagoniste des récepteurs NMDA). Cette voie de synthèse fait intervenir la RF et le phosphate de pyridoxal (177).

Grâce à ses nombreuses propriétés neuroprotectives, la RF pourrait donc constituer un complément, aux principes actifs actuellement sur le marché (L-DOPA, les agonistes dopaminergiques et les inhibiteurs de monoamine oxydase) du fait de son action synergique sur de multiples cibles. De plus, la RF contribue aussi à l'augmentation de l'absorption de la L-DOPA (177).

2.3.2. Système cardiovasculaire

2.3.2.1. L'hypertension

L'hypertension est caractérisée par une pression artérielle systolique et diastolique respectivement supérieures ou égales à 140 / 90 mmHg. Les patients hypertendus ont un risque

augmenté de développer des maladies cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral (AVC)). Avant de débiter un traitement médicamenteux, des règles hygiéno-diététiques sont instaurées afin de modifier plusieurs facteurs de risque : diminution de la consommation de sel, perte de poids en cas d'obésité, pratiquer une activité sportive, diminution du tabagisme. Après réévaluation de la pression artérielle, un traitement médicamenteux peut être instauré afin d'abaisser la pression artérielle. Les principales familles d'antihypertenseur sont les bêtabloquants, les diurétiques, les inhibiteurs calciques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II. Ils sont utilisés seuls ou en association et plutôt à faible dose en début de traitement (179,180).

L'homocystéine est un acide aminé soufré non utilisé pour la synthèse protéique. L'homocystéine est le précurseur de la cystéine. Elle provient du catabolisme de la méthionine mais elle peut également être recyclée en méthionine (Figure 34). Cette réaction de méthylation est catalysée par la méthionine synthase à partir du 5-méthyltétrahydrofolate avec la vitamine B₁₂ comme cofacteur. Le tétrahydrofolate formé est converti grâce à la sérine hydroxyméthyltransférase en 5,10-méthylènetétrahydrofolate. Ce produit est le précurseur de la 5-méthyltétrahydrofolate. Il est obtenu grâce à une oxydoréductase la 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) (179,180).

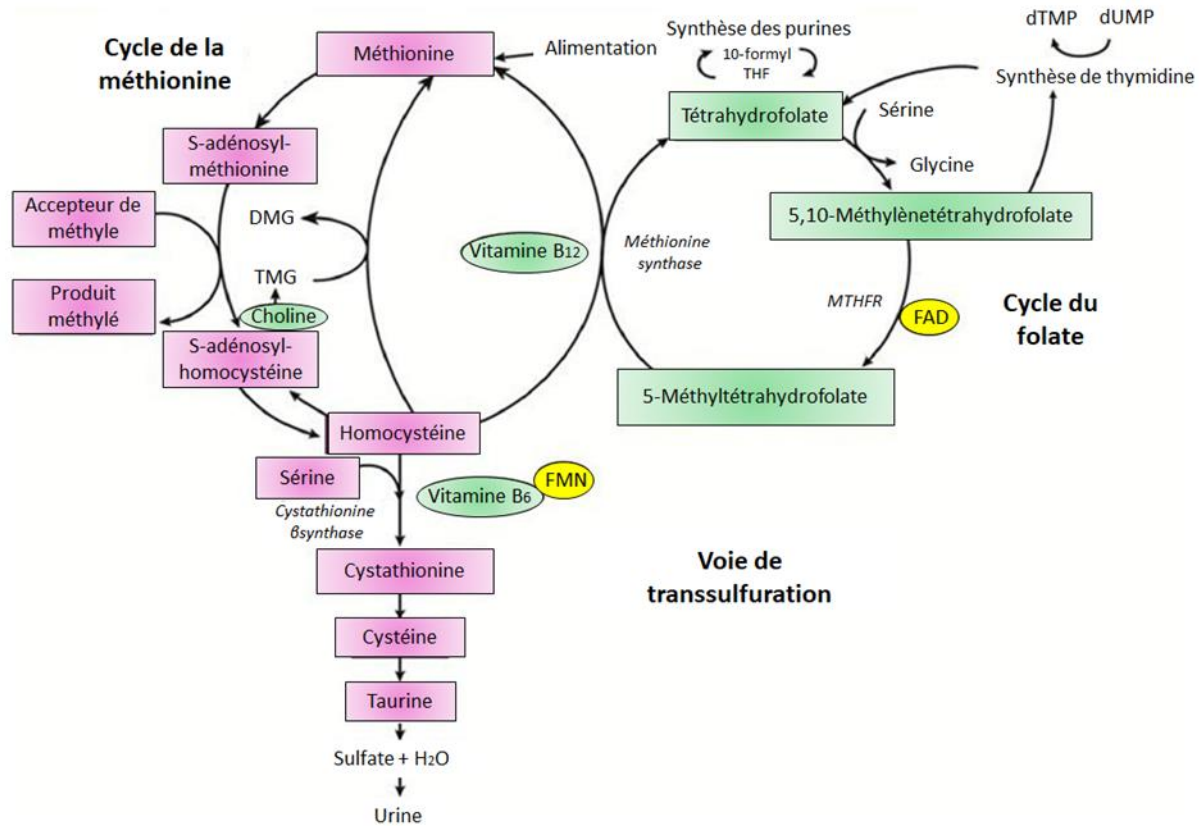


Figure 34 : Métabolisme de l'homocystéine (179)

Il a été observé que la mutation de la cytosine en 677 par une thymine conduit à la formation d'une enzyme thermolabile. Cela s'explique par un changement de conformation suite au changement d'une alanine par une valine, plus hydrophobe et entraînant une réduction de l'affinité pour la FAD. Les patients homozygotes pour cette mutation (677TT) ont par conséquent une augmentation des taux d'homocystéine, non reconvertis en méthionine du fait de la faible quantité de 5-méthyltetrahydrofolate produit. De plus, ce génotype est associé à une augmentation de la pression artérielle et une majoration du risque de développer des maladies cardiovasculaires (179–183). Cependant actuellement, on ne sait pas si l'homocystéine est un biomarqueur ou facteur de risque de ces maladies. En revanche, lors de tests *in vitro*, l'homocystéine favorise l'athérosclérose et les maladies athérothrombotiques en favorisant des réactions inflammatoires, pro-coagulantes. L'homocystéine entraîne également la formation d'ERO et de peroxy-nitrites des lipides et lipoprotéines athérogènes, présents dans l'intima ou encore une diminution de la production d'oxyde nitrique vasodilatateur (184).

Les équipes de J.M. Scott (181), T.F. Amaral (182), G.A. Wittert (183) se sont intéressées à la supplémentation en RF (1.6 mg / jour, pendant 16 semaines), chez des patients hypertendus. J.M. Scott et son équipe ont remarqué que la supplémentation en RF permettait de rétablir les stocks de 5-méthyltétrahydrofolate, d'augmenter la synthèse d'oxyde nitrique entraînant une baisse de la tension artérielle de plus 5 mmHg. Ainsi, cela pourrait diminuer le risque d'AVC de 20 % chez les patients possédant la mutation du gène de la MTHFR pour le génotype 677TT (181).

T.F. Amaral et son équipe avancent que des prises quotidiennes de RF (10 mg / jour, pendant 4 semaines) diminuent la concentration plasmatique en homocystéine de 1.31 mol/l, chez des personnes âgées (60 à 94 ans) sans affecter la concentration d'autres protéines plasmatiques (la ferritine, la protéine C réactive) ou d'acide urique. Ces suppléments paraissent d'autant plus justifiées que cette catégorie de la population a des apports en RF insuffisants. Il a été estimé que dans cette tranche d'âge, 30 à 55 % des hommes et 43 à 68 % des femmes avaient un déficit en RF. L'administration de RF permet de diminuer les risques de maladies cardiaques de 5 à 7 % et d'AVC de 8 à 11 % (182).

G.A. Wittert et son équipe ont étudié l'effet d'une alimentation enrichie en RF, pendant 5 années, sur la pression artérielle. Cette étude s'est intéressée à la population chinoise, dont environ 90 % aurait des apports en RF insuffisants. Ils ont observé des effets bénéfiques chez le groupe supplémenté en RF. Ils évoquent que l'effet antihypertenseur lié à la RF est dû à l'inhibition des canaux calciques et au blocage de la libération du glutamate (183).

Du fait de sa capacité d'action sur différentes cibles (baisse des taux d'homocystéine, augmentation des taux d'oxyde nitrique, inhibition des canaux calciques et blocage des canaux glutamatergiques), la RF pourrait être associée à un antihypertenseur, principalement chez les patients MTHFR muté, afin d'obtenir un effet synergique sur la diminution des pressions artérielles systolique et diastolique (179–183).

Par ailleurs, la revue publiée par l'équipe de M. Ward (180) rappelle un potentiel intérêt d'une supplémentation en RF chez les femmes enceintes. En effet, la grossesse peut causer une pré-éclampsie qui se caractérise par une augmentation de la tension artérielle. La pré-éclampsie est à l'origine de naissance de grands prématurés et peut causer la mort de la mère et/ou du nourrisson. La mutation de la MTHFR 677TT constitue un facteur de risque de développer une hypertension

gestationnelle. L'apport de RF, en plus des traitements antihypertenseurs, pourrait être intéressant afin de réduire la tension artérielle et les comorbidités associées (180).

2.3.2.2. La reperfusion d'organes

X. Liu et son équipe ont observé que la flavokinase (ou riboflavine kinase) qui convertit la RF en FMN, possédait un rôle protecteur vis-à-vis des AVC. Les modèles étudiés sont des rats SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive). Ces animaux ont notamment une sous-régulation de la flavokinase et présentent davantage de risques de développer une ischémie cérébrale. Lors de la survenue de l'AVC, ces animaux ont une obstruction des vaisseaux cérébraux significativement plus importante que les animaux témoins. Ainsi, le nombre de neurones qui entrent en apoptose dans les aires cérébrales touchées sont plus importants chez les rats SHRSP. Les animaux traités paraissent plus protégés et l'ischémie a des conséquences moins importantes en terme d'apoptose neuronale grâce à l'expression de facteur anti-apoptotique (185).

L'équipe de F. Campos (186) a montré l'intérêt d'administrer la RF en bolus sur des modèles animaux ayant subi un AVC afin de diminuer la concentration sanguine glutamatergique. L'aspartate aminotransférase (ASAT) est une enzyme qui catalyse la transformation de l'oxaloacétate et du glutamate en aspartate et α -cétoglutarate. La métabolisation du glutamate par l'ASAT nécessite l'utilisation du phosphate de pyridoxal et donc indirectement de la RF (nécessaire à la formation du phosphate de pyridoxal). La diminution de l'excitotoxicité glutamatergique a un effet neuroprotecteur et réduit les lésions dues à l'ischémie (186).

L'équipe de J. Ge (187) s'est intéressée aux bénéfices d'apport de la RF après la survenue d'un infarctus du myocarde. La lysine spécifique déméthylase 1 (LSD1) est une enzyme capable d'effectuer le clivage oxydatif d'un ou deux groupements méthyles sur l'histone H3, en présence de FAD. La déméthylation des histones est une modification épigénétique, dont la régulation par la LSD1 peut être médiée par une supplémentation en RF. Suite à un infarctus du myocarde, ces conditions ont un effet protecteur sur les cardiomyocytes non irrigués et en hypoxie. En effet, l'hypoxie inhibe l'activité de la LSD1 (Figure 35a). L'histone H3 diméthylée entraîne la surexpression aberrante de gènes comme Lpcat2 (lysophosphatidylcholine acyltransferase2), impliqués dans le métabolisme des phospholipides. La proportion de phospholipides oxydés (la 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine et la 1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-

glycéro-3-phosphocholine) augmente. Ils modifient la fluidité membranaire, contribuent à l'entrée en apoptose des cardiomyocytes et à la formation de lésions du tissu cardiaque. En revanche, l'apport de RF, augmente la concentration en FAD. Ce cofacteur est utilisé par la LSD1 afin de déméthyliser l'histone H3 et permet une régulation des gènes tels que Lpcat2. Ainsi, l'homéostasie phospholipidique est favorisée et la viabilité des cardiomyocytes est augmentée (187).

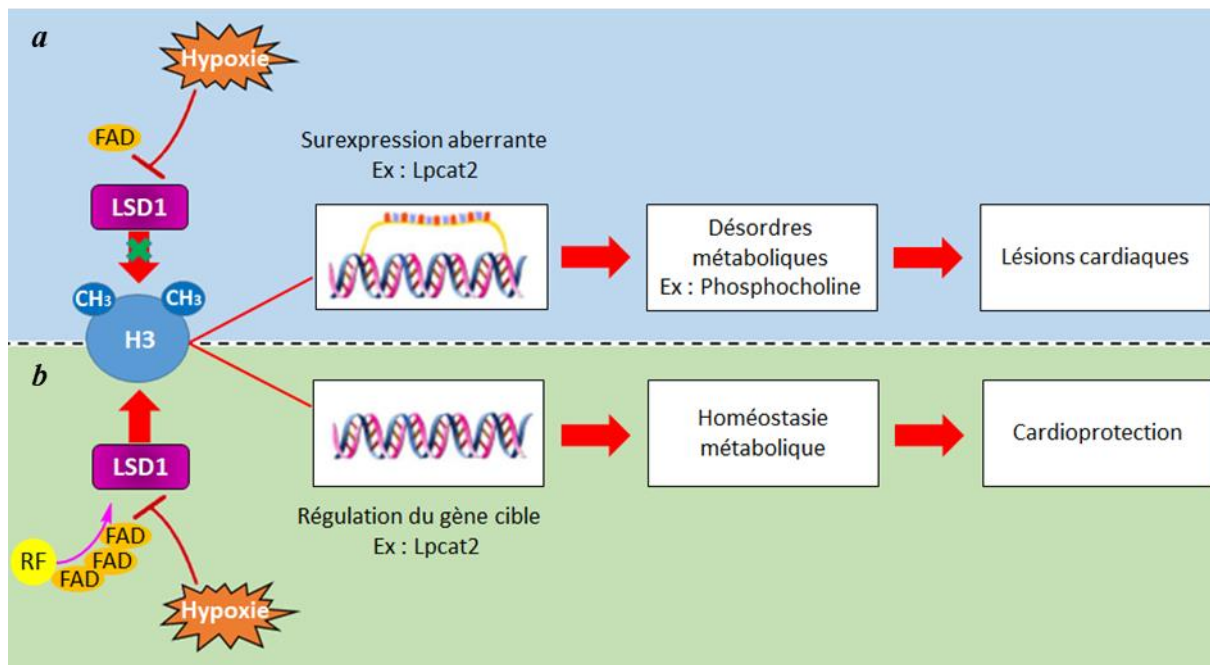


Figure 35 : a°) Effets délétères de l'hypoxie lors d'un infarctus du myocarde, b°) compensés par l'effet cardioprotecteur de la supplémentation en RF, inspiré de J Ge et son équipe (187)

D.J. Pinsky et son équipe (188) ont travaillé sur l'apport de RF après une greffe cardiaque. En effet, suite à une greffe, il existe un risque de rejet du greffon. Le rejet est déclenché par des facteurs immunologiques mais aussi non immunologiques comme la génération d'ERO et d'espèces réactives de l'azote (ERA). Les ERA sont issues d'une production excessive d'oxyde nitrique, par la NO synthase des leucocytes, qui réagit avec l'anion superoxyde et forme des peroxynitrites. D'une part, ces espèces radicalaires favorisent la réaction inflammatoire et induisent la transcription du NF- κ B qui sur régule la NO synthase. D'autre part, les ERO et ERA sont très toxiques et lèsent les composantes cellulaires du greffon (lipides, protéines, ADN) menant à l'apoptose de ces cellules (188).

D.J. Pinsky et son équipe évoquent que la RF peut agir *via* plusieurs mécanismes. Ils avancent que la RF peut être réduite en dihydroriboflavine par une flavine réductase. Cette molécule possède

des propriétés antioxydantes bénéfiques face au stress oxydant. La RF permet également d'augmenter l'activité de la SOD et diminue la concentration des différentes espèces radicalaires. De plus, la RF inhibe l'induction du NF- κ B, diminuant l'expression de cytokines inflammatoires et de NO synthase (exprimée par les macrophages). Ainsi, la génération d'ERA et le stress nitrosatif se trouvent amoindris. Il a aussi été constaté que les propriétés d'adhésion des cellules inflammatoires étaient inhibées. De plus, une suppression de l'envahissement cellulaire des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) au sein du tissu cardiaque greffé a été constatée. Ce phénomène s'explique par la diminution significative de l'expression d'interféron- γ (connu pour améliorer la présentation d'antigènes et l'immunité cellulaire). Ces données montrent bien que la RF contribue à moduler les réponses immunitaires cellulaire et humorale afin de préserver les cardiomyocytes face au stress oxydant. L'apoptose des cardiomyocytes est réduite selon plusieurs approches, favorisant la viabilité du greffon (188).

F.S. Ramalho et son équipe (189) ont mené une étude sur l'intérêt d'administrer la RF suite à l'ischémie hépatique succédant une greffe de foie. Ces ischémies sont susceptibles d'endommager les foies greffés. Les lésions proviennent notamment d'une réponse inflammatoire excessive suite à l'infiltration de neutrophiles qui libèrent des ERO et des ERA. L'administration de RF permet de diminuer les taux de transaminases (ALAT et ASAT) plasmatiques par rapport aux animaux témoins, indiquant une diminution de la cytolysé hépatique. Ils l'expliquent par l'action antioxydante combinée de la dihydroriboflavine, du glutathion dont la régénération est accélérée et par l'augmentation d'activité de la SOD. Cela permet de réduire les radicaux libres générés. Ainsi, le recrutement de neutrophiles est diminué, empêchant la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-6, interféron- γ) et d'oxyde nitrique. Par ailleurs, la production de protéases capables de dégrader les protéines cellulaires et de provoquer l'apoptose, telles que la chymotrypsine, la trypsine ou le protéasome sont également inhibés (189).

2.3.3. Maladies métaboliques

2.3.3.1. Déficit multiple en acyl-CoA déshydrogénases et syndromes de Brown-Vialletto-Van Laere et Fazio Londe

L'administration de RF a montré une amélioration des symptômes chez les patients atteints d'un déficit multiple en acyl-CoA déshydrogénases (DMAD) ou des syndromes de Brown-Vialletto-Van Laere (BVVL) et Fazio Londe (FL) (190–193).

Le DMAD est une maladie autosomique récessive liée à la mutation des gènes (ETFA, ETFB, ETFDH). Ces gènes codent pour les flavoprotéines impliquées dans le transport d'électrons (oxydoréductases de la respiration mitochondriale) ainsi que l'oxydation des acides gras (provoque l'accumulation de lipides au niveau des muscles squelettiques, cardiaques, du foie et des tubules rénaux). Le DMAD se caractérise par des troubles métaboliques comme une hypoglycémie, une acidose métabolique, une hyperammoniémie. Les principaux symptômes observés, chez les patients atteints de DMAD, sont des vomissements intermittents et des douleurs abdominales (stéatose hépatique, hépatomégalie et pancréatite), des faiblesses et douleurs musculaires, une perte de poids, une dysarthrie (trouble de la parole d'origine articulaire). Bien que le mécanisme ne soit actuellement pas encore compris, certains patients répondent favorablement suite à une administration de RF et voient leur symptômes régresser (190,191).

Le syndrome de BVVL est une maladie rare liée à la mutation du gène qui code pour la protéine de transport RFVT-2 empêchant ainsi l'absorption de la RF. Il existe également des formes de ces maladies où les mutations touchent les gènes codant pour les transporteurs RFVT-1 ou RFVT-3. Les symptômes qui caractérisent cette pathologie sont la surdité, l'atrophie optique, une paralysie bulbaire et du diaphragme (responsable du décès des patients), des retards mentaux ainsi que des problèmes psychiatriques... Le syndrome de FL reprend l'ensemble des symptômes du syndrome de BVVL, à l'exception de la surdité. Ces pathologies sont souvent fatales (192,193).

L'apport de RF par voie intraveineuse augmente l'espérance de vie des jeunes patients atteints de ces maladies. Des améliorations de la force musculaire, de l'audition, de la vision et de la respiration ont été notées. Certains patients ont même retrouvé l'ensemble de leurs capacités. Cependant, le mécanisme d'action de la RF n'est pas encore bien compris (192,193).

2.3.3.2. Le diabète

Les patients souffrant de diabète de type 2 ont une glycémie élevée, supérieure à 1,26 g/l à jeun. Peu à peu, les cellules de l'organisme perdent leur sensibilité à l'insuline et provoquent à terme une insulino-résistance (foie, muscle...) liée à une insuffisance sécrétoire de l'insuline. Ceci s'explique entre autre par une dysfonction des cellules β -pancréatiques. En effet, la production radicalaire génère un stress oxydant qui déborde les systèmes de régulation, provoquant l'apoptose de ces cellules (194).

L'équipe d'I. Naseem (194) a administré la RF chez des souris diabétiques. Ils ont observé une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la catalase et la glutathion réductase. Ce traitement diminue ainsi la formation d'espèces délétères comme les peroxydes lipidiques, les protéines carbonylées et les lésions oxydatives de l'ADN ; induisant la survie des cellules pancréatiques moins soumises au stress oxydant. Par ailleurs, il semblerait que les taux de calcium intracellulaire, participant à la sécrétion d'insuline soient augmentés, en présence de RF. Il apparaît également que les récepteurs au glucose GLUT4, au niveau des cellules musculaires squelettiques et des adipocytes, soient davantage exprimés et favorisent l'internalisation du glucose (194).

D'un point de vue histologique, ils ont constaté que les animaux traités avec la RF possèdent moins de lésions, aux niveaux du foie et des glomérules rénaux que ceux du groupe témoin. Ces résultats sont également corrélés à une amélioration des marqueurs de la fonction hépatique et rénale. I. Naseem et son équipe proposent donc que le traitement à base de RF puisse réduire les risques de complications, chez les patients diabétiques, par réduction du stress oxydant et du processus inflammatoire (194).

2.3.3.3. L'ostéoporose

Les os possèdent plusieurs fonctions :

- Mécanique : ils protègent plusieurs organes (au niveau du crâne et de la cage thoracique),
- De mouvement : ils permettent l'ancrage des muscles et sont reliés par des articulations afin de se mouvoir,
- Hématopoïétique : ils renferment la moelle osseuse où se déroulent l'érythro-, la leuco- et la thrombo-poïèse,
- Métabolique : ils constituent les réserves minérales notamment dans le métabolisme phospho-calcique.

Les os sont en perpétuel renouvellement. La résorption osseuse est assurée par les ostéoclastes tandis que la formation osseuse est permise par les ostéoblastes. Les ostéoclastes sont activés physiologiquement lorsque le ligand RANKL se lie à leurs récepteurs de surface RANK et par le facteur de stimulation M-CSF (macrophage-colony stimulating factor). Les ostéoblastes

contribuent au remodelage osseux car en proliférant, ils minéralisent la MEC environnante et se différencient en ostéocytes.

L'ostéoporose est une maladie métabolique où la balance résorption/formation osseuse penche en faveur de la résorption. Il se forme alors dans un premier temps une perte osseuse puis des dommages microstructuraux qui aboutissent à des fractures osseuses. L'ostéoporose est une pathologie liée à des déséquilibres hormonaux observés lors d'hyperparathyroïdies et lors d'une diminution des taux d'œstrogène, notamment chez les femmes ménopausées.

L'équipe de J. Xu (195) s'est intéressée à l'effet du lumichrome sur la résorption osseuse sur des modèles animaux ayant subi une ovariectomie. Ils ont mis en évidence que le lumichrome inhibe la voie de signalisation activée par RANKL. Ainsi, l'activité du NF- κ B et de la MAPK sont diminués. Par conséquent, la quantité du facteur de transcription NFATc1 est diminuée, à son tour, régulant l'expression de gènes ostéoclastes spécifiques, codant pour la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9), la cathepsine K (Ctsk), le récepteur à la calcitonine (Ctr) et l'intégrine β 3 (Itgb3). Par ailleurs, la signalisation calcique est également impactée et permet de rétablir significativement des libérations oscillatoires et d'éviter une libération continue. Cela permet de diminuer l'exocytose de protons qui favorise la déminéralisation osseuse et de diminuer la migration des ostéoclastes. De plus, le lumichrome favorise l'activité des ostéoblastes en activant les gènes de la phosphatase alcaline (Alp), de la différenciation des ostéoblastes (Runx2) et de la production du collagène de type I (Colla1). Ainsi, le traitement par le lumichrome permettrait de rétablir la balance résorption/formation osseuse (195).

2.3.3.4. Utilisation comme antidote

Un antidote est une substance capable de neutraliser les effets toxiques d'un poison (substances exogènes comme des médicaments, venins, toxines bactériennes ou virales...).

R.T. Peterson et son équipe (196) ont étudié l'efficacité de la RF dans l'intoxication au cyanure. L'exposition à cette substance a lieu au cours de l'inhalation de fumée, de la consommation d'aliments (amande amère, manioc...), de traitements médicamenteux (nitroprussiate de sodium...), d'accidents industriels. L'intoxication au cyanure se manifeste par des troubles cardiaques, neurologiques (convulsions, crises d'épilepsie) et des dysfonctions

métaboliques pouvant entraîner la mort. Le traitement actuel consiste en l'inhalation de nitrite d'amyle, puis l'injection de nitrite de sodium, thiosulfate de sodium et l'hydroxycobalamine (196).

L'équipe de R.T. Peterson a effectué un criblage à haut-débit sur des petites molécules. La RF s'est avérée être la molécule la plus efficace. Par la suite, ils ont mené des essais sur des poissons-zèbres (zébrafish) et ont observé une normalisation métabolique des animaux traités. Ils ont poursuivi ces travaux sur des lapins et ont observé une amélioration des symptômes cardiaques et neurologiques après administration de RF. Ensuite, ils ont administré un vasodilatateur puissant, le nitroprussiate de sodium (Schéma 12) chez 5 patients. Cette molécule libère du cyanure dans le sang. Ainsi, ils ont remarqué que les taux d'inosine étaient augmentés de la même façon que chez les poissons-zèbres et lapins lors de l'exposition au cyanure. Le traitement par la RF permettait une diminution des taux d'inosine sur les modèles animaux. Ils supposent donc que l'inosine pourrait servir de biomarqueur de cette intoxication. De plus, la RF pourrait constituer un traitement prophylactique en association à cet antihypertenseur, en servant d'antidote face aux intoxications au cyanure (196).

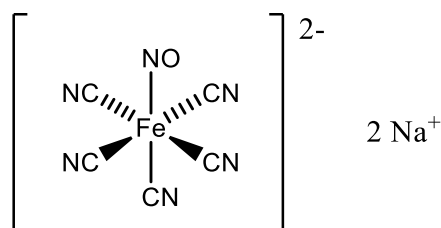


Schéma 12 : Nitroprussiate de sodium (196)

S.F. Ahmad et son équipe (197) se sont intéressés à l'effet de l'administration de RF après exposition de rats au tétrachlorométhane (CCl₄). Cette substance, source d'un stress radicalaire, est hépatotoxique. Le CCl₄ entraîne une nécrose des hépatocytes qui conduit à une cirrhose et est également responsable de pathologies cancéreuses (197).

Cette étude montre un effet hépatoprotecteur significatif dose-dépendant de la RF. Ainsi, les animaux traités ont vu leurs taux enzymatiques d'alanine et d'aspartate aminotransférases (ALAT et ASAT) et de phosphatases alcalines retrouver des valeurs normales. Les analyses plasmatiques indiquent également une augmentation de la concentration du glutathion (molécule antioxydante) et une diminution de celle du malone-dialdéhyde (marqueur du stress oxydant). D'un point de vue histologique, ils ont constaté une diminution de l'infiltration des monocytes au sein du foie et de la

stéatose hépatocytaire. Le phénomène inflammatoire est aussi réduit suite à la diminution des taux de TNF- α libérés par les leukocytes. Suite à ces résultats encourageants, ils suggèrent de mener des essais sur d'autres molécules hépatotoxiques (le paracétamol, les nitrosamines, les hydrocarbures aromatiques polycycliques par exemple) afin de vérifier l'effet hépatoprotecteur de la RF (197).

2.3.3.5. Formulations à libération prolongée lors de carence

Les carences en RF peuvent survenir chez les personnes souffrant de malnutrition et notamment chez les personnes âgées, plus vulnérables. Ces carences peuvent être secondaire à des pathologies telles que la séropositivité au VIH, les maladies inflammatoires de l'intestin, le diabète, les maladies cardiaques chroniques. Elles sont également associées à la prise de contraceptifs oraux et à des traitements anticancéreux (méthotrexate) (198).

Ces patients nécessitent donc des apports de RF. Cependant, cette supplémentation doit être quotidienne car la RF est très rapidement métabolisée et éliminée. Les équipes de J. Dong (198) et X. Tang (199) ont étudié la possibilité de synthétiser des formes à libération prolongée afin d'apporter de faibles concentrations de RF en continu et de garantir une meilleure observance des patients. Ils ont synthétisé une prodrogue : le laurate de RF (RFL) (Schéma 13a) où l'alcool primaire de la RF est estérifié par un acide en C₁₂. Ce composé amphiphile étant insoluble ou très faiblement soluble dans la plupart des solvants, il a été formulé sous forme de nanosuspension ou de nanocristaux. Ces particules, en dispersion colloïdale, ont été stabilisées par des surfactants (198,199).

J. Dong et son équipe ont utilisé le poloxamère P188 (Schéma 13b) qui est un copolymère à trois blocs. En effet, le bloc central, de polypropylène glycol (en rouge) est apolaire, au contraire des blocs de polyéthylène glycol aux extrémités qui sont hydrophiles (en bleu ciel). Le sigle P188 est un code utilisé : P pour poloxamère, les deux premiers chiffres multipliés par 100 indiquent la masse moléculaire du bloc central (1800 g/mol, dans cet exemple) tandis que le dernier chiffre multiplié par 10 indique le taux d'oxyde d'éthylène (80 %, dans cet exemple) (198).

Les molécules de laurate de RF et de poloxamère s'assemblent en bicouches et forment des nanostructures tubulaires de taille régulière, 518 nm de long en moyenne (Figures 36c, 36d). Les têtes flavines (en bleu foncé) sont positionnées à l'intérieur et à l'extérieur alors que les chaînes polyéthylène glycol restent à l'extérieur, en contact avec le milieu aqueux. Les chaînes laurates (en

jaune) et le propylène glycol (en rouge) constituent la partie hydrophobe. Ainsi, des estérases plasmatiques permettent une libération lente de RF après injection intramusculaire lors d'essais sur des rats. D'autres tests sur des rats traités par le méthotrexate et souffrant en conséquence de mucites, d'ulcères et d'une perte de poids, ont vu leurs symptômes et leur état général s'améliorer suite à l'administration de ces formulations de laurate de RF (198).

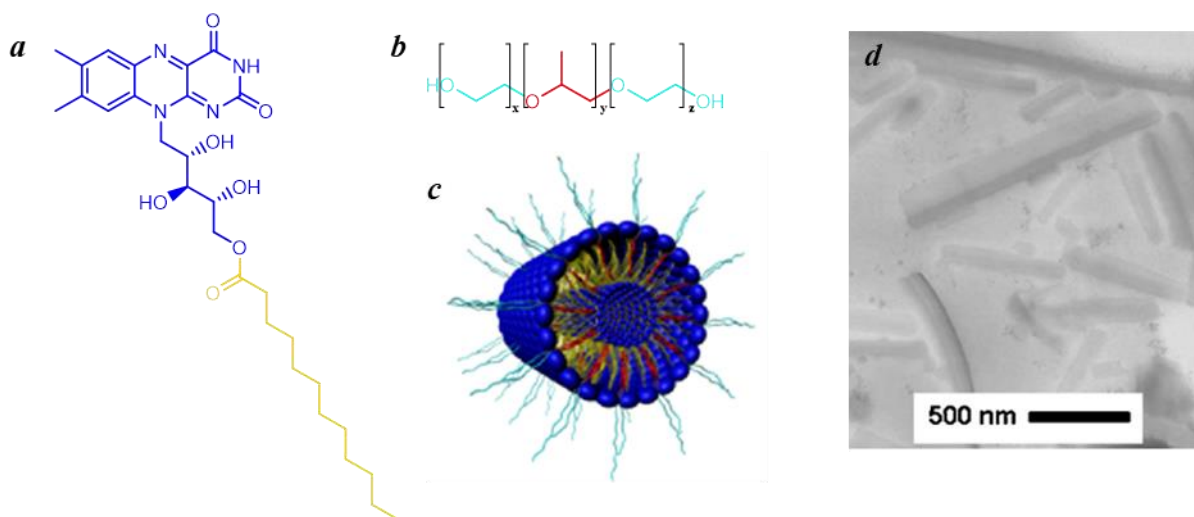


Schéma 13 : a°) Laurate de riboflavine ; b°) Structure des poloxamères ; Figure 36 : c°) Auto-organisation des nanocristaux ; d°) Imagerie en MET des nanocristaux (198)

L'équipe de X. Tang a travaillé sur la laurate de RF (RFL) et a étudié plusieurs tensioactifs. Il est intéressant de noter que l'ensemble des nanoparticules formulées sont de nouveau tubulaires à l'exception de la formulation composée à 75 % de RFL et de 25 % de D- α -tocophérol polyéthylène glycol 1000 succinate (TPEGS Schéma 14a) et de lécithine (Schéma 14b), selon un ratio 3 : 1. En effet, cette formulation permet de générer des nanotubes (Figure 37c2), ainsi que des nanosphères d'une taille inférieure à 100 nm (Figure 37d2) (199).

Ils expliquent ce phénomène (Figure 37 c1 et d1) d'une part, par la stabilisation des particules *via* l'interaction de la chaîne hydrophobe du TPEGS au sein de la couche grasse constituée des chaînes laurates des RFL. D'autre part, la partie PEG polaire du TPEGS se retrouve à l'extérieur dans le milieu aqueux, au même titre que la partie chargée la lécithine qui est un phospholipide zwitterionique (chargée positivement et négativement). Ceci aurait pour effet de diminuer la tension de surface de la solution aqueuse, augmentant ainsi la stabilité des particules sphériques (199).

Ces particules présentent l'avantage de pouvoir subir une filtration stérilisante sans être détériorées, au travers de filtre d'une taille de pore de 220 nm. De plus, elles conservent une excellente biocompatibilité chez le rat après injection intramusculaire. En effet, elles présentent des effets irritants réversibles contrairement aux nanotubes administrés (infiltration de cellules inflammatoires provoquant notamment une irritation musculaire) (199).

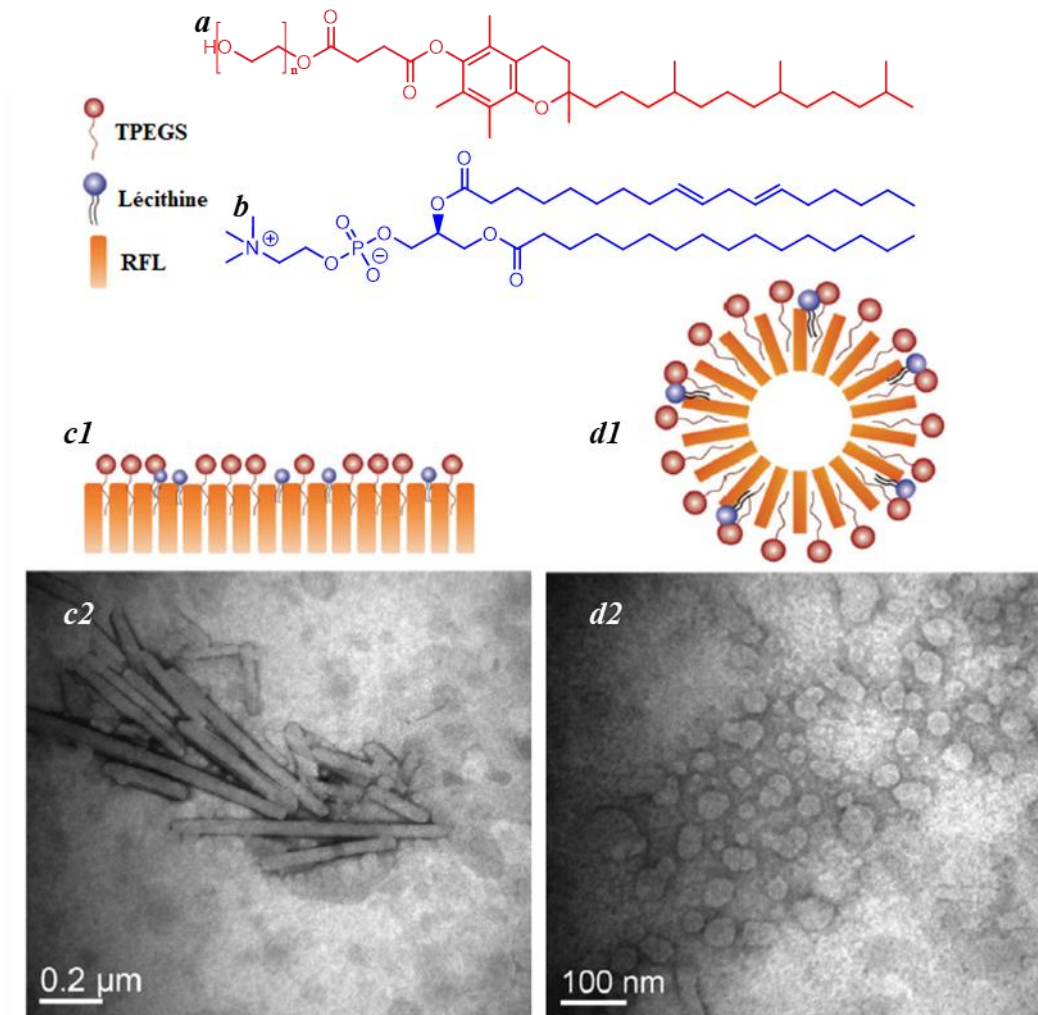


Schéma 14 : a°) *D-α-Tocophérol polyéthylène glycol 1000 succinate* ; b°) *Lécithine* ; Figure 37 :c1°) Représentation des nanotubes de RFL + TPEGS + Lécithine c2°) MET des nanotubes; d1°) Représentation des nanosphères de RFL + TPEGS + Lécithine ; d2°) MET des nanosphères (199)

2.3.4. Antibiothérapie

Au cours de ces dernières années, de nombreux micro-organismes ont développé des résistances aux antibiotiques (les pneumocoques à la pénicilline et aux macrolides, les

staphylocoques à la méticilline, les entérocoques à la vancomycine, *Mycobacterium tuberculosis* à plusieurs principes actifs...) (200).

La RF est une molécule indispensable au développement des bactéries car la FMN et la FAD sont utilisées comme cofacteurs par de nombreuses flavoprotéines. Certaines bactéries sont capables de synthétiser la RF à partir d'une molécule de GTP et de deux molécules de ribulose-5-phosphate. Ces enzymes représentent des cibles intéressantes car l'Homme ne possède pas ces enzymes diminuant le risque d'effet secondaire. De plus, la synthèse de la RF est régulée par un système : le riboswitch. Ce système est médié par des récepteurs constitués d'ARNm appelés aptamères (Figure 38a) (200–202).

Ces structures ARN sont situées en amont (extrémité 5') des séquences codantes pour les enzymes impliquées dans la synthèse de la RF. La FMN est un métabolite de la RF, capable de se lier à ces aptamères. La FMN est capable d'interagir avec les guanines de l'aptamère grâce la formation de liaisons hydrogènes, aux niveaux du motif uracile-like du noyau isoalloxazine, d'une des fonctions alcool de la chaîne ribityle et surtout du groupement phosphate (Figure 38b) (200–202).

En l'absence de FMN, l'aptamère change de conformation, sous l'action de complexes enzymatiques (dégradosome), favorisant la fixation des ribosomes. Ainsi, la traduction des enzymes impliquées dans la synthèse de la RF est assurée et permet d'augmenter les taux de RF intracellulaire (Figure 38c). En revanche, lorsque les concentrations en RF et par conséquent en FMN sont hautes, la FMN se lie à l'aptamère stabilisant sa structure et empêchant son changement de conformation. Ainsi, la fixation de ribosomes est inhibée, bloquant la traduction des enzymes capables de synthétiser la RF (200–203).

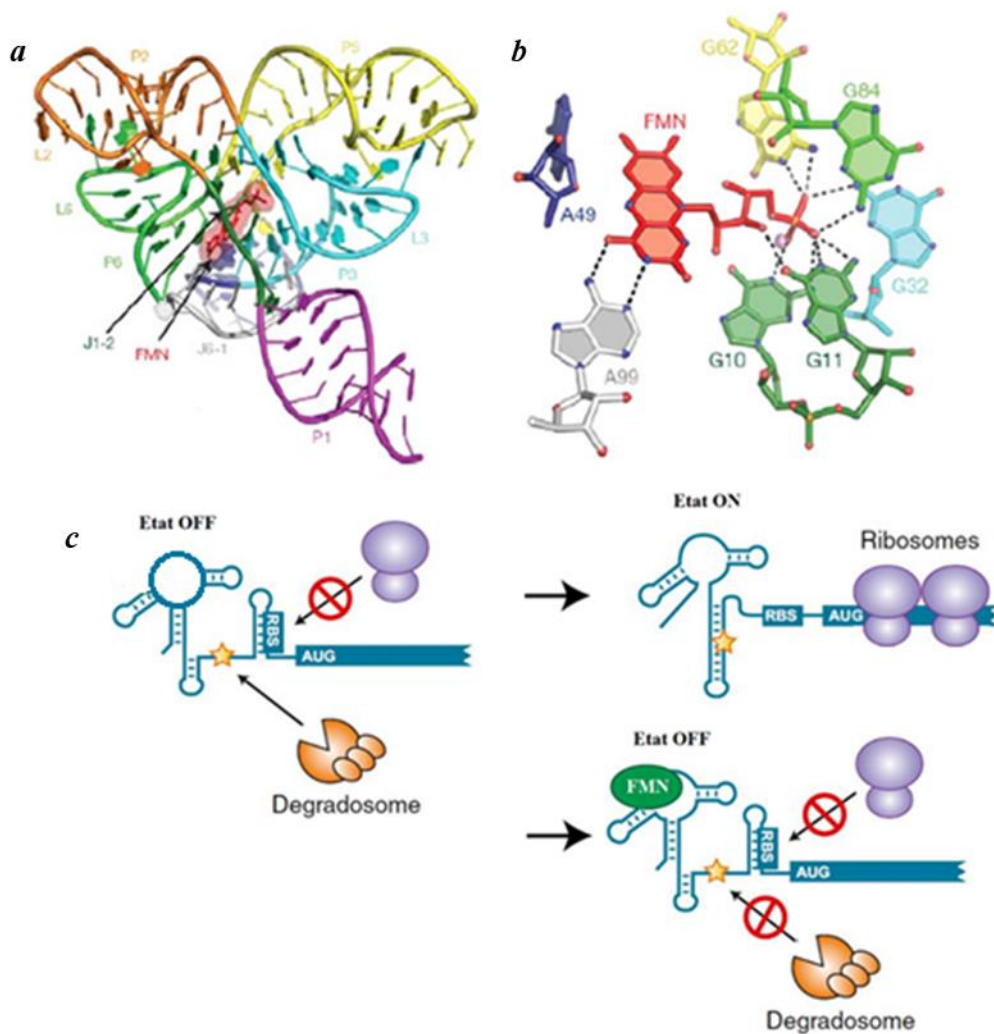


Figure 38 : a°) Représentation secondaire du riboswitch (202) ; b°) Détail des interactions hydrogènes entre l'aptamère et la FMN (200); c°) Mécanisme de régulation par le riboswitch inspiré de la Thèse de T. Esquerre (203)

La roséoflavine (Schéma 15a) est un analogue de la RF où le groupement méthyle en position 8a est substitué par un groupement diméthylamine. Cette molécule est naturellement synthétisée par des bactéries : *Streptomyces davawensis* et *Streptomyces cinnabarinus*. La roséoflavine est transportée dans les micro-organismes auxotrophes pour la RF, au travers de canaux qui permettent l'influx de la vitamine B₂. Ensuite, elle agit comme un « cheval de Troie » car elle est prise en charge par les mêmes enzymes que la RF et convertie en analogue de la FMN (RoFMN) puis de la FAD (RoFAD). La RoFMN est capable d'interagir avec les riboswitches, impliqués dans la régulation de la synthèse des canaux transmembranaires responsables de l'influx de RF (bactéries auxotrophes) ou les riboswitches impliqués dans la production d'enzymes indispensables à la

synthèse de la RF. La diminution de la traduction de ces protéines aboutit à la diminution des concentrations en RF intracellulaires. La RoFMN est plus affine que la FMN pour l'aptamère grâce à la flexibilité du récepteur. La RoFMN se lie donc plus étroitement au récepteur, non pas grâce à la formation de liaison hydrogène entre l'aptamère et à la fonction amine en position 8a mais grâce à la formation d'interactions supplémentaires au niveau de la chaîne ribityle. De plus, ces molécules inhibent également les flavoprotéines et notamment celles impliquées dans la synthèse de la RF, absentes chez l'Homme (200–202).

La roséoflavine possède une activité antibiotique du fait de sa toxicité pour les bactéries Gram positives et négatives. De nos jours, les espèces mutantes, dont les riboswitches ne se lient pas à la roséoflavine ou la FMN, sont utilisés pour synthétiser la RF par biotechnologie car elles sont incapables de réprimer la production des enzymes et surproduisent la RF (*Bacillus subtilis* ou *Lactococcus lactis*) (200–202).

La 8-amino-8-déméthyl-riboflavine (ARF) également produite par *Streptomyces davawensis*, est un analogue de la RF dont le groupement méthyle en position 8a est substitué par une amine primaire (Schéma 15b). Cette flavine agit de la même façon que la roséoflavine après phosphorylation et formation de l'AFMN. Plusieurs hypothèses ont été proposées et l'équipe de M. Mack suggère que les mécanismes puissent changer selon que la flavoprotéine soit inhibée par la RoFMN ou l'AFMN. Ces molécules possèdent un encombrement stérique comparable à celui de la FMN ou FAD. Cependant, l'AFMN avec sa fonction amine en 8a hydrophile, interagit moins bien avec la poche hydrophobe des récepteurs qui accueillent le diméthylbenzène de la FMN. Par ailleurs, la fonction amine de la RoFMN ou de l'AFMN semble diminuer l'activité catalytique de ces flavines en modifiant leur potentiel redox lorsqu'elles se lient aux flavoprotéines, entraînant leur inactivation. En effet, à titre d'exemple, l'azoréductase, une flavoprotéine présente chez *Escherichia coli*, possède un potentiel redox de -145 mV lorsqu'elle est liée à la RF et -223 mV lorsqu'elle est liée à la RoFMN. Cette inactivation pourrait être médiée par un environnement polaire où une seule et unique molécule d'eau, au sein de la flavoprotéine entraînerait la perte du pouvoir oxydant des isoalloxazines (Figure 39) (204,205).

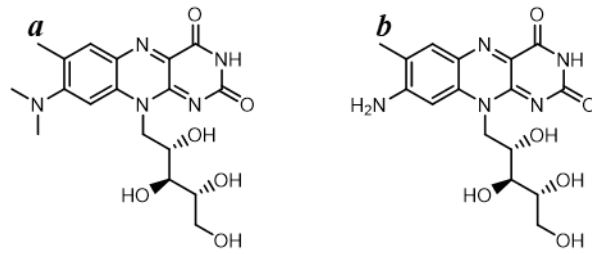


Schéma 15 : a°) roséoflavine ; b°) 8-déméthyl-8-amino-RF (204)

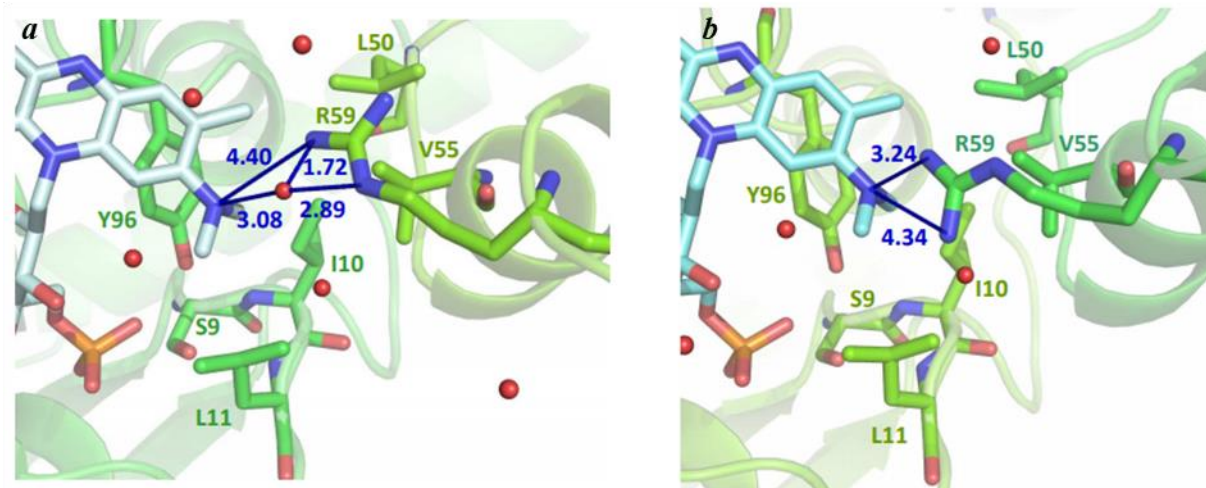


Figure 39 : Interaction de la RoFMN avec l'azoréductase a°) en présence d'une molécule d'eau au sein de la poche hydrophobe ; b°) sans molécule d'eau (distance en bleue en Ångström) (206)

L'équipe de M. Mack avance également que les cofacteurs actifs de la roséoflavine, RoFMN et RoFAD, interagissent de manière aspécifique avec 37 des 38 flavoprotéines de *Escherichia coli*, qui représentent jusqu'à 3 % de son protéome. Ainsi, ces protéines essentielles à la vie des bactéries deviennent inactives ou partiellement actives et causent leur mort. L'action de cette molécule sur un nombre de cibles aussi important réduit les probabilités de mutation et à fortiori d'antibiorésistance (204,205). Ils ont également montré la toxicité supérieure de la roséoflavine à celle de l'ARF sur *Listeria monocytogenes*, agent responsable de la listériose. Elles agissent comme évoqué précédemment, en ciblant le riboswitch et en inhibant les 34 flavoprotéines de cette bactérie. Il est probable que l'action moins importante de l'ARF, plus hydrophile, s'explique par une liaison moins affine de l'amine primaire au sein de la poche apolaire des flavoprotéines (207).

Par ailleurs, ils se sont également intéressés à la métabolisation de ces molécules par la flavokinase et la FAD synthétase humaines. Leurs travaux relèvent que la roséoflavine est un bon substrat pour chacune de ces deux enzymes alors que l'ARF est convertie en AFMN mais la forme

adénylée, l'AFAD, n'est pas synthétisée. Ainsi, ils suggèrent que l'ARF pourrait constituer un « hit » afin de développer une nouvelle famille d'antibiotiques moins toxique pour l'Homme que la roséoflavine. En effet, ils ont déterminé que la RoFAD était un cofacteur inactif perdant son activité catalytique oxydo-réductrice et pourrait affecter le métabolisme cellulaire humain (208).

M. Cushman et son équipe ont identifié une molécule antibiotique efficace sur *Mycobacterium tuberculosis*, agent infectieux de la tuberculose, et sur *Escherichia coli*, par un criblage à haut débit (Schéma 16). Cette molécule est un inhibiteur d'enzymes impliquées dans les dernières étapes de la biosynthèse de la RF : la riboflavine synthase et la lumazine synthase (209).

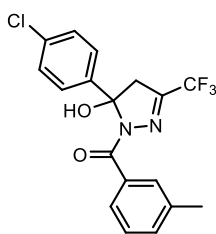


Schéma 16 : Molécule antituberculeuse testée par M. Cushman et son équipe (209)

Par ailleurs, de nombreuses bactéries comme *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* ainsi que des levures du genre *Candida* sont capables de synthétiser la RF au contraire des virus. De ce fait, la production de métabolites précurseurs est capable d'être reconnue comme étranger par le système immunitaire (210).

En effet, les lymphocytes MAIT (Mucosal-Associated Invariant T) sont des cellules immunitaires CD4+, découvertes, en 2003. Les lymphocytes MAIT sont impliqués dans l'immunité adaptative. Ils représentent jusqu'à 10 % des lymphocytes contenus dans le sang périphérique et peuvent atteindre 45 % des lymphocytes T, au niveau du foie. Les MAIT possèdent des récepteurs (TCR) particuliers. Les lymphocytes T sont capables de reconnaître les peptides ou lipides exogènes présentés au niveau des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Les CMH sont des protéines retrouvées au niveau des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques... Contrairement aux autres lymphocytes T, les cellules MAIT peuvent reconnaître *via* leur TCR des petites molécules exogènes présentées par des CPA, sur des CMH particuliers de type MR1 (Figure 40). En réponse à ce signal les cellules MAIT produisent d'une part, une réponse inflammatoire par libération d'interféron- γ , TNF- α , IL-

17. D'autre part, elles ont la capacité de libérer la granzyme B et perforine qui sont des protéases capables de tuer les cellules infectées ainsi que les pathogènes infectants. La réponse inflammatoire des lymphocytes MAIT peut également être activée indépendamment du MR1 car ces cellules sont sensibles à la production d'IL-12 et IL-18 par les CPA (210–213).

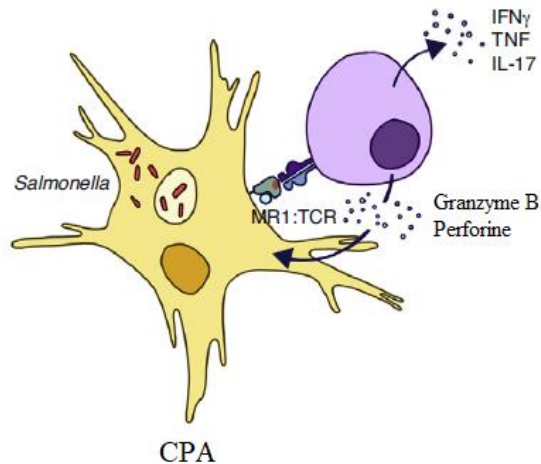


Figure 40 : Cellule infectée par des Salmonelles reconnue par un lymphocyte MAIT (211)

D'un point de vue mécanistique, les MR1 des CPA sont capables de présenter des molécules exogènes produites par les pathogènes. Il s'agit de pterines dérivées de l'acide folique (6-formylptérine et de acétyl-6-formylptérine) qui sont inhibitrices de l'activation des cellules MAIT. A l'opposé les lumazines ainsi que les adduits pyrimidines sont des composés activateurs des lymphocytes MAIT. Ces types de composés sont des dérivés de la biosynthèse de la RF produits par les pathogènes à partir du 5-amino-ribityl uracile (5-A-RU) (Schéma 17 en bleu). Les flèches vertes indiquent les réactions enzymatiques qui permettent la synthèse de la RF et de ses précurseurs la 7-hydroxy-6-méthyl-8-D-ribityllumazine (RL-6-Me-7-OH) et la 6,7-diméthyl-8-D-ribityllumazine (RL-6,7-diMe). Ces deux lumazines (RL-6-Me-7-OH et RL-6,7-diMe) sont reconnues par les MR1 mais sont très faiblement activatrices des lymphocytes MAIT. En revanche, lorsque le 5-A-RU réagit par condensation (de façon non enzymatique : flèches rouges) avec des petites molécules telles que le glyoxal ou le méthylglyoxal, issues du métabolisme de la cellule hôte ou du pathogène, il se produit respectivement du 5-(2-oxoéthylideneamino)-6-D-ribitylaminouracile (5-OE-RU) et du 5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylaminouracile (5-OP-RU). Ces molécules sont des adduits pyrimidines capables d'être stabilisés par les MR1 et d'activer

les cellules MAIT (agonistes mille fois plus puissants que RL-6-Me-7-OH et RL-6,7-diMe). Ces molécules deviennent moins actives lorsqu'elles se cyclisent et forment des dérivés lumazines (210–213).

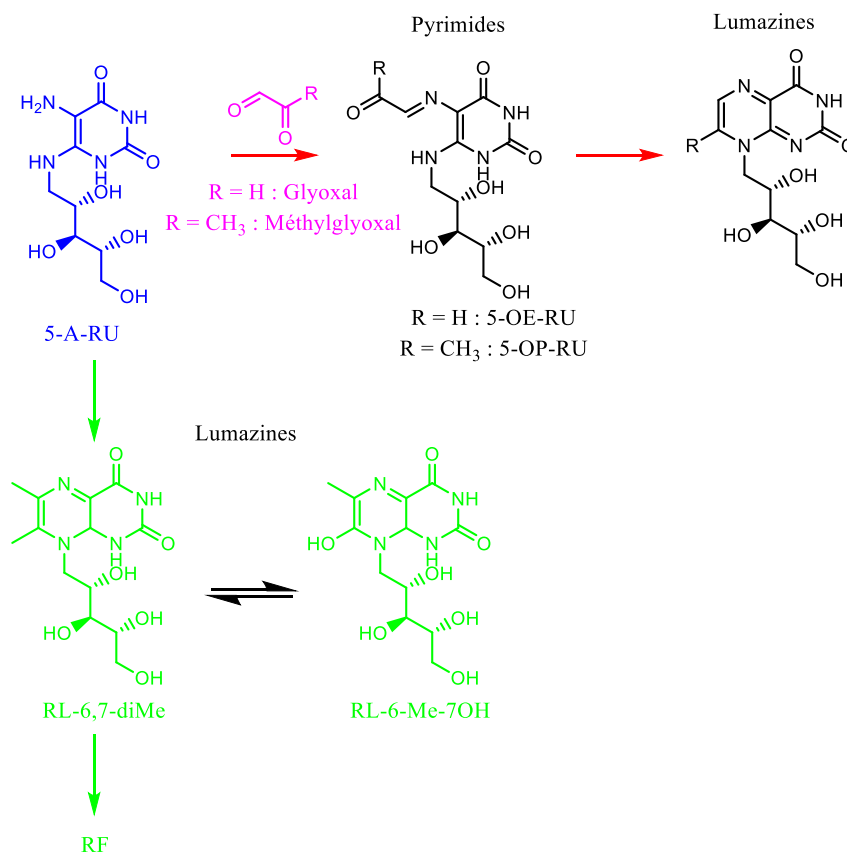


Schéma 17 : Formation des ligands des cellules MAIT (210,212)

Il a été observé que les cellules MAIT étaient impliqués dans de nombreuses pathologies (cancer, infections virales, asthme, bronchopneumopathie chronique obstructive, maladie de Crohn, colite, polyarthrites rhumatoïde, psoriasis, lupus, diabète). Leur rôle reste à définir afin de comprendre leur intervention (211).

3. Conclusion

Les principales propriétés des flavines mises à profit sont leur capacité d'émettre des ERO, leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que leurs propriétés biologiques et pharmacologiques (Tableau 5). D'une part, les ERO sont utilisées afin d'induire la mort de cellules lors du Mirasol system (cellules immunitaires et pathogènes), en thérapie photodynamique (pathologies cancéreuses), au cours de kératites infectieuses (pathogènes). D'autre part, les ERO émises par les flavines après irradiation sont utilisées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire afin de photoréticuler le collagène en préservant l'intégrité des cellules irradiées.

Cette dualité ne semble pas s'expliquer par la nature des flavines irradiées puisque les photosensibilisateurs utilisés sont essentiellement la RF ou la FMN. La puissance d'irradiation (correspond au produit du nombre de photons émis par seconde et de l'énergie lumineuse) semble être le paramètre essentiel. En effet, les puissances d'irradiation utilisées pour induire la mort de cellules sont 10 à 100 fois supérieures à celles administrées en ingénierie tissulaire. Les variations d'énergie appliquées (lumière bleue, UV-A, B, C) induisent l'absorption de photons plus ou moins énergétiques par les flavines mais sans en modifier leur rendement de conversion intersystème. Par ailleurs, les photons les plus énergétiques ont également des propriétés cellulicides. La comparaison des différents protocoles est extrêmement complexe du fait qu'ils ne sont pas uniformisés (par exemple, hétérogénéité des unités de puissance appliquées : Watt, Joules, Watt / unité de surface, Watt / unité de volume). Par ailleurs, le temps d'irradiation, lorsqu'il est augmenté permet d'accroître les ERO générées dans les limites de stabilité et de photodégradation des flavines. De plus, une concentration plus importante en flavines peut potentiellement favoriser une génération radicalaire accrue, jusqu'à atteindre une concentration maximale où les ERO sont quenchées.

D'autres propriétés physico-chimiques des flavines ont été exploitées comme leur planéité, leur caractère aromatique et la partie uracile-like qui les compose. Ces spécificités ont été mises à profit du fait que les flavines ont la capacité d'interagir avec l'ADN ou encore au sein de peptides contenant des cycles aromatiques par interactions de type π -stacking (peptide A β). Les flavines sont également capables d'émettre une lumière fluorescente après irradiation. Cependant du fait de son rendement quantique de fluorescence proche de 40 % et de sa plus faible intensité de

fluorescence (ou brillance), la RF est moins intéressante que des fluorophores de référence comme la fluorescéine qui émet également une lumière dans le jaune ($\lambda = 520 \text{ nm}$).

Les flavines sont surtout indispensables pour leurs propriétés biologiques. En plus d'être biocompatibles, les dérivés biologiquement actifs de la RF, la FMN et FAD ont un rôle capital en tant que cofacteur enzymatique pour les cellules eucaryotes et procaryotes. En effet, environ 80 flavoprotéines qui regroupent essentiellement des enzymes, sont présentes dans la plupart des cellules humaines. De ce fait, les flavines agissent de manière aspécifique sur plusieurs cibles. Cependant, étant donné leur très faible toxicité, l'action aspécifique des flavines pourrait s'avérer être positive.

Ces flavines sont très intéressantes d'un point de vue enzymatique grâce à leurs propriétés redox, utilisées pour le transport d'électrons. Des exemples attestent du caractère essentiel des flavines dans le métabolisme cellulaire : l'utilisation d'antagonistes en antibiothérapie induit la mort de bactérie. Par ailleurs, sans apport de RF, les patients atteints du syndrome BVVL décèdent très jeunes alors que l'administration de vitamine B₂, permet une amélioration des symptômes. Les flavines semblent également avoir un intérêt pharmacologique en interagissant indirectement sur des facteurs de transcription, empêchant la survie cellulaire et favorisant l'apoptose dans le cadre de pathologies cancéreuses, ou encore par inhibition de NFATc1, inhibant ainsi les ostéoclastes et ralentit la résorption osseuse dans l'ostéoporose. Les flavines ont aussi la capacité d'activer la transcription de certains gènes : en favorisant le développement de la MEC, en ingénierie tissulaire, ou encore Nrf2 qui permet la transcription d'enzymes antioxydantes et apporte un intérêt notamment dans les pathologies cardiovasculaires.

Le traitement du kératocône et le Mirasol system dont les études ont débuté, il y a plusieurs années, font aujourd'hui l'objet d'essais cliniques en France. En dehors de ces deux exemples, de nombreuses études en oncologie, en ingénierie tissulaire ou en pharmacologie vont nécessiter des travaux confirmant les données obtenues au cours de cette décennie. Ainsi, l'approfondissement de ces recherches pourrait permettre dans un premier temps, l'emploi de la RF en association avec des traitements existants dans des pathologies du système nerveux central (migraine, maladie de Parkinson), cardiovasculaires (hypertension artérielle, reperfusion d'organes...), métaboliques (syndrome de DMAD, de BVVL et de FL, diabète, ostéoporose, en tant qu'antidote...), en

oncologie (notamment pour les cancers de meilleurs pronostics lorsque les taux de RF sont normaux)... Si les bienfaits de la RF sur ces pathologies s'avèrent fondés, il est possible que cette molécule contribue à améliorer l'état de santé des patients traités.

L'utilisation de la RF dans de nombreuses applications pourrait être facilitée. En effet, cette vitamine possède un caractère essentiel et elle est peu toxique, notamment pour l'homme. Par exemple, au cours d'une administration par voie orale, seule les quantités nécessaires sont absorbées au niveau des entérocytes étant donné que les transporteurs RFVT-2 sont internalisés au fur et à mesure avant d'être recyclés. Par ailleurs, l'administration de RF par voie intraveineuse conduit rapidement en sa métabolisation afin de la rendre plus hydrophile et permettre son élimination rapide dans les urines. Du fait de ses moyens de régulations, la RF semble avoir une certaine innocuité et sécurité d'emploi qui pourraient être intéressantes. De plus, la RF présente également l'avantage d'être facilement accessible car sa synthèse se fait par biotechnologies. Par conséquent, son coût de production est relativement peu élevé.

La mise au point de nanoformulations afin d'exploiter son potentiel anticancéreux pourrait permettre de lutter contre certaines difficultés physico-chimiques et pharmacocinétiques. En effet, la solubilité de la RF à 25°C est proche de 80 mg/l. L'utilisation sous forme de suspensions colloïdales permettrait d'augmenter les quantités de flavines administrées. La pharmacocinétique de ces nanoparticules serait très intéressante car la métabolisation pourrait être ralentie et la clairance diminuée (protection du principe actif). Par ailleurs, la distribution serait également modifiée et pourrait permettre de profiter de l'effet EPR afin d'induire une accumulation localisée de nanoparticules au niveau de néovaisseaux angiogéniques, au sein du tissu tumoral. Ainsi, les flavines pourraient être utilisées en tant qu'agent de vectorisation, ciblant les récepteurs RFVT ou en tant que principe actif (génération d'ERO).

L'ensemble de ces éléments expliquent l'attrait de la communauté scientifique pour ces molécules, dotées de très nombreuses propriétés qui ont été détournées et sont destinées à être appliquées dans le traitement de nombreuses pathologies. Ainsi, l'intérêt croissant pour ces molécules s'est traduit par une très nette augmentation du nombre de publications, notamment depuis 2002 (Figure 1). Par ailleurs les propriétés des flavines leur valent d'être utilisées dans de très nombreuses autres aires de recherche (chimie, sciences biologiques...).

Tableau 5 : Récapitulatif des différentes applications des flavines dans la santé

Propriétés Applications	Photosensibilisatrice génération d'ERO	Physicochimiques	Pharmacologiques
Oncologie	<u>Photothérapie dynamique</u> Destruction de cellules cancéreuses (64,77–81,83– 87)	Fluorescence <u>Interaction avec l'ADN</u> G-quadruplexe (62) <u>Diagnostic</u> Nanoparticules fer superparamagnétique (74– 76) Planéité <u>Interaction avec l'ADN</u> Mésappariement (60) Site abasique (61) G-quadruplexe (60)60 Interaction avec l'ADN Grâce la partie uracile-like et interactions π -stacking (60–62)	<u>Vectorisation, Diagnostic</u> Ciblage récepteur RFVT (67–73) <u>Mort cellules cancéreuses</u> Inhibiteur de tyrosine kinase (88,89)
Anti-infectieux	<u>Sang</u> Mirasol system (96–101) <u>Œil</u> Kératite infectieuse (129,130)		
Ingénierie tissulaire	<u>Photoréticulation du collagène</u> : kératocône (121–128), cartilage (145– 149) (ménisque (150), disque intervertébraux (153–155)), os (158,159) et dent (136–141), cœur (161,162)(bioimpression 3D(163,164))		
Système nerveux central	<u>Maladie d'Alzheimer</u> Détérioration de la protéine A β (167,168)	Planéité <u>Maladie d'Alzheimer</u> Perturbation de la formation de neurofibrilles A β (166)	<u>Maladie d'Alzheimer et de Parkinson</u> Transcription d'enzymes antioxydantes (165,177) <u>Migraine et maladie de Parkinson</u> Normalisation excitabilité neuronale (171,173–177) <u>Maladie de Parkinson</u> Diminution inflammation (177)
Système cardiovasculaire			<u>Hypertension artérielle, AVC, infarctus du myocarde, pré-éclampsie</u> Activation NO synthèse, diminution des taux d'homocystéine (179–184) <u>Reperfusion d'organes</u> Diminution de l'inflammation et immunitaire (185–189)
Maladies métaboliques			<u>DMAD</u> (190,191), <u>Syndromes de BVVL et FL</u> (192,193) <u>Diabète</u>

			Augmentation de l'expression GLUT 4 (194) <u>Ostéoporose</u> Diminution de la résorption osseuse, activation ostéoblastes (195) <u>Antidote</u> Cyanure, CCl ₄ (196,197) <u>Ariboflavinose</u> Compensation de carences par des formulations à libération prolongée (198,199)
Antibiothérapie			<u>Effet bactéricide</u> Diminution de la synthèse ou l'apport de RF selon les organismes (200–209)

4. Contextualisation de cette thèse

J'ai effectué mon stage de Master 2 au sein de l'équipe du Professeur Isabelle Bestel en 2018. Par la suite, il m'a été donné l'opportunité de poursuivre ces travaux de recherche lors d'une Thèse en Chimie.

Les travaux antérieurs de l'équipe ont permis de développer des phospholipides synthétiques (le RfdiC14 Schéma 18). Cette molécule a été obtenue à partir de la RF native, liée à un glycérol diéthérifié par des chaînes grasses, selon la stratégie de synthèse des phosphoramidites. Le RfdiC14 a été introduit à hauteur de 1 % parmi d'autres phospholipides commerciaux et a permis la formulation de liposomes. *In vitro*, ces nanoparticules ont montré des propriétés intéressantes en tant qu'agent de vectorisation, sur des cellules de cancer de la prostate (qui surexpriment les récepteurs à la RF), du fait de l'augmentation de l'internalisation des liposomes vectorisés. Lors de l'ajout de PEG, ces liposomes ont montré leur furtivité *in vivo*, étant donné que leur élimination n'a pas été accélérée par rapport à des liposomes contrôles. De plus, les liposomes s'accumulent au sein du microenvironnement tumoral probablement grâce à l'effet EPR et facilite leur rétention, alors que la présence de RF permet l'internalisation au sein des cellules cancéreuses (72,214).

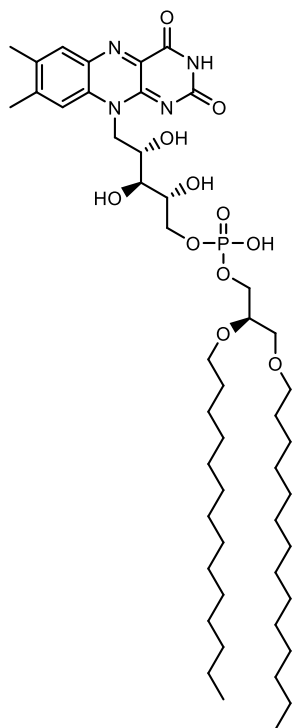


Schéma 18 : Molécule de RfdiC14 (72,214)

Par ailleurs, des tests d'auto-assemblage du RfdiC14 pur ont été réalisés. Il est intéressant de souligner que pour une concentration de 2 mg de RfdiC14 par ml d'une solution tamponnée, la cryo-microscopie électronique en transmission montre que le RfdiC14 s'auto-organise sous forme de couches phospholipidiques multilamellaires (Figure 41a). Lors de leur irradiation, ces auto-assemblages possèdent des propriétés de fluorescence et d'émission d'espèces radicalaires inhibées à cause du phénomène de quenching (214).

Des travaux de modélisation, effectués par l'équipe d'Isabelle Bestel (215), suggèrent que des interactions de type π -stacking favorisent cet agencement spatial. En effet, la modélisation en modèle gros grain, permet de représenter la molécule de RfdiC14 de manière simplifiée (Figure 41b). Chaque grain représente quatre atomes lourds sans prendre en compte les atomes d'hydrogène. Ainsi ces modèles permettent d'observer des phénomènes d'agrégation pour des systèmes très complexes dans un temps raisonnable, difficilement applicable au modèle tout atome. Ces études, appliquées aux molécules de RfdiC14, ont donc permis leur auto-assemblage sous forme de couches multilamellaires (Figure 41c). La visualisation au niveau atomique (Figure 41d) confirme l'existence d'interactions de type π -stacking entre les différentes têtes isoalloxazines.

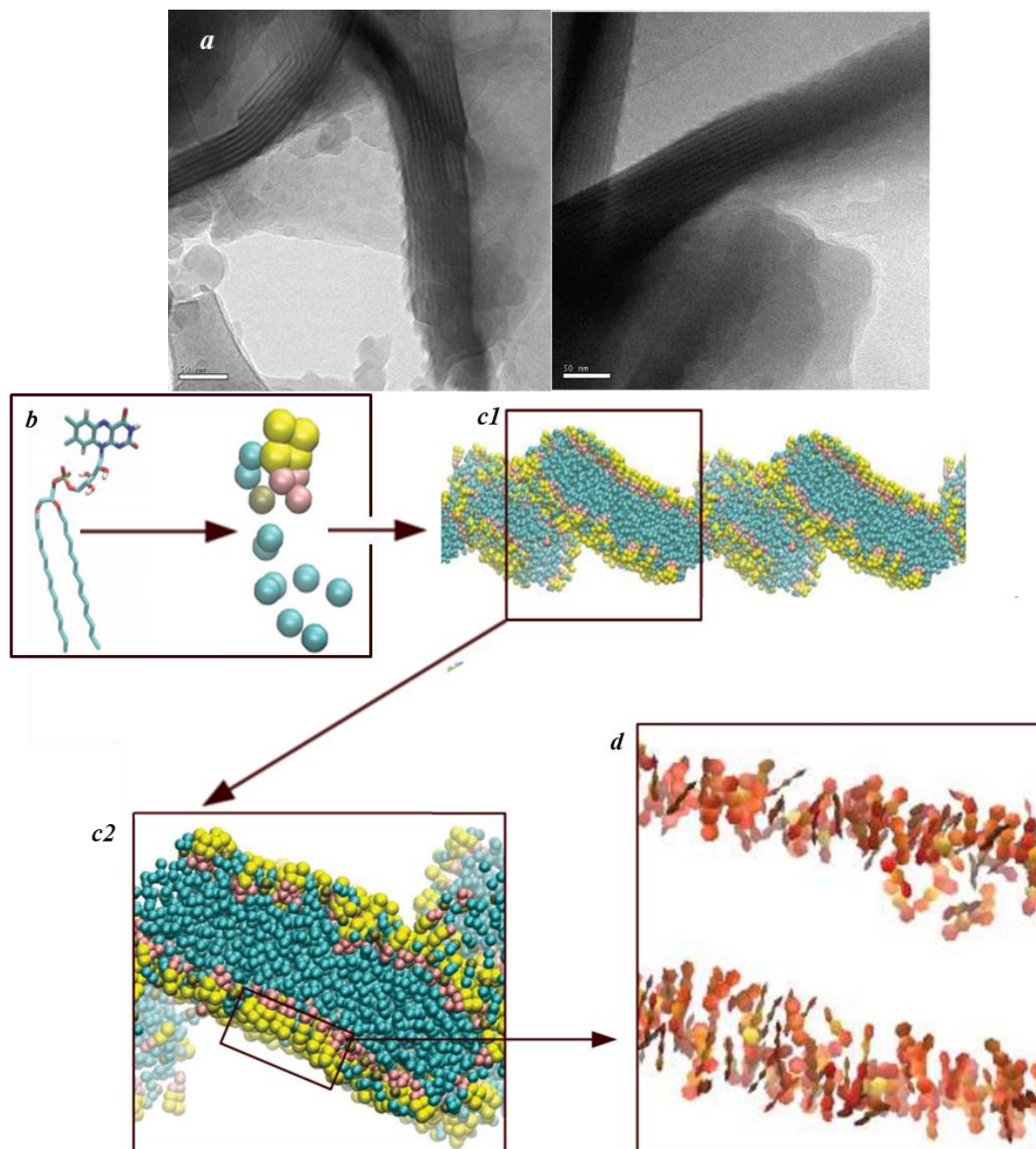


Figure 41 : a°) CryoTEMs des auto-assemblages de RfdiC14 ; b°) Modèle tout atome et gros grain du RfdiC14 ; c1°) Simulation par modélisation moléculaire : d'auto-assemblages multilamellaires du RfdiC14 ; c2°) Grossissement de c1 ; d°) Interactions des cycles isoalloxazines par π -stacking (215)

Désormais, l'équipe souhaite préparer des nanoparticules enrichies en RF, susceptibles de former des « nanobombes » de radicaux libres à visée antitumorale. Dans ce contexte, l'objectif de mon stage et de ma Thèse de Chimie, consiste en la synthèse d'une bibliothèque d'analogues de la RF possédant un groupement volumineux au niveau du cycle isoalloxazine. Notre hypothèse de

départ est que ce groupement permettrait d'une part, la déstabilisation des interactions π -stacking et des couches multilamellaires sous l'effet de l'encombrement stérique. Ainsi, cela favoriserait la formation d'auto-assemblages vésiculaires qui seraient idéalement composés de cent pour cent de nos molécules. Du fait de l'espacement entre les têtes isoalloxazines, causé par le groupement volumineux introduit, cela permettrait d'annihiler le phénomène de quenching et de retrouver les propriétés radicalaires de chaque flavine. Ainsi, nous pourrions générer des « nanobombes radicalaires » (Schéma 19).

Les analogues synthétisés doivent donc avoir un encombrement stérique plus important que les groupements méthyles en position 7a, 8a et 3 du cycle isoalloxazine de la RF. Par ailleurs, ces pharmacomodulations seraient susceptibles de modifier l'activité radicalaire afin de la potentialiser (216). En effet, le retour à l'état fondamental de la RF excitée se fait selon une balance entre la génération d'espèces radicalaires et l'émission de lumière fluorescente. Nous souhaiterions donc déséquilibrer cette balance en faveur de la génération de radicaux libres et au détriment de la fluorescence.

La synthèse de ces molécules est effectuée, selon la méthodologie publiée par F. Papadimitrakopoulos et son équipe en 2007 (217). Nous utiliserons des anilines commerciales, diversement substituées par différents groupements afin de générer une bibliothèque d'analogues de la RF. De plus, les analogues synthétisés, ne comportent pas d'alcools secondaires sur la chaîne pentacarbonée, contrairement à la RF, afin de s'affranchir des différentes étapes de protection préalables à l'insertion du groupement phosphoramidite.

La quantification des propriétés radicalaires, s'inspirera d'un test décrit par J.-Y. Liang et son équipe (218,219). L'irradiation de la RF, par une lumière bleue génère des ERO. Ces ERO permettent la réduction d'un indicateur coloré qui est un sel de tétrazolium. L'espèce réduite formée absorbe à 560 nm et permettra indirectement une quantification des ERO générées par spectrométrie UV-visible. Cette méthodologie sera adaptée pour pouvoir dégager une étude relation structure activité en fonction des substituants introduits sur le cycle isoalloxazine et afin de mesurer la quantité d'ERO générées par nos auto-assemblages. Ces formulations seront justement obtenues par une méthode classique de formulation de phospholipides par réhydratation d'un film lipidique puis extrusion (220).

Il est possible que l'encombrement stérique ajouté sur les têtes flavines permette de perturber les interactions π -stacking. Cependant, il est possible qu'après irradiation des auto-assemblages formulés, nous ne puissions pas observer la formation de radicaux libres. En effet, il est possible que l'état triplet ne se forme pas ou qu'il se forme mais soit stabilisé, en raison de l'auto-organisation de l'assemblage obtenu et de la proximité persistante entre les têtes flavines. La spectroscopie d'absorption transitoire pourrait constituer une technique de choix dans la compréhension de ce phénomène. Ces expériences pourraient être menées en collaboration avec l'équipe du Dr. Dario Bassani.

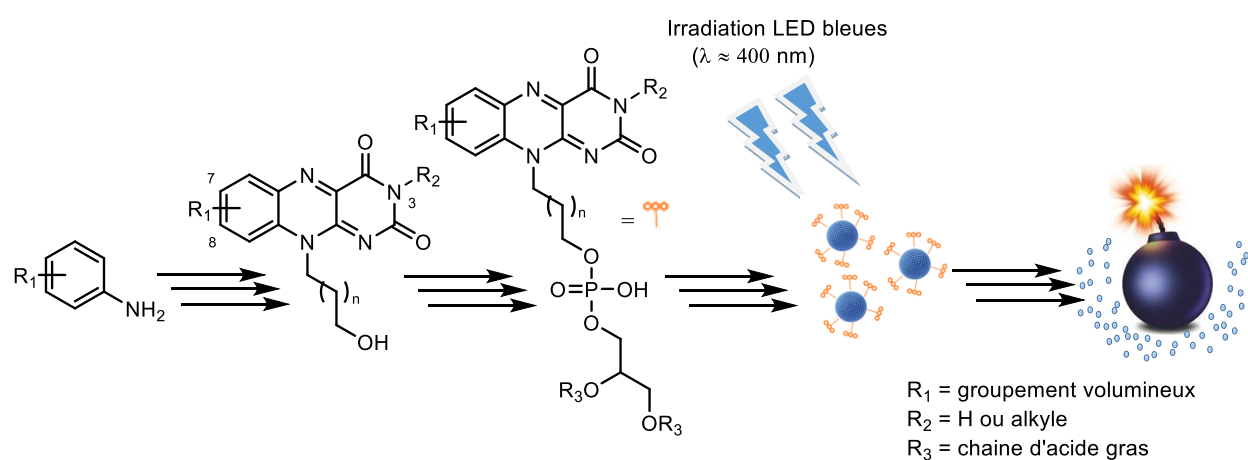


Schéma 19 : Représentation de la stratégie de synthèse et des objectifs de l'équipe

Ce projet a donc éveillé ma curiosité concernant l'utilisation récente des flavines et avait un double objectif. A titre individuel, cette Thèse d'exercice en Pharmacie m'a permis d'explorer la littérature et d'enrichir mes connaissances sur les flavines. Le deuxième objectif de cette étude consistait à recenser et expliquer un maximum d'utilisations récentes des flavines afin d'élargir le champ d'application de nos travaux. Ainsi, cela pourrait nous offrir de nouvelles perspectives de recherche afin de mieux exploiter nos résultats.

Bibliographie

1. Orphanet: Acidurie 2 hydroxyglutarique [Internet]. [cité 23 déc 2019]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=19
2. Orphanet: Glutaryl CoA oxidase deficiency [Internet]. [cité 24 déc 2019]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=10395&Disease\(s\)/group%20of%20diseases=Glutaryl-CoA-oxidase-deficiency&title=Glutaryl-CoA-oxidase-deficiency&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=10395&Disease(s)/group%20of%20diseases=Glutaryl-CoA-oxidase-deficiency&title=Glutaryl-CoA-oxidase-deficiency&search=Disease_Search_Simple)
3. Orphanet: Acidémie isovalérique [Internet]. [cité 24 déc 2019]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=33
4. Orphanet: Déficit en glutaryl CoA déshydrogénase [Internet]. [cité 24 déc 2019]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=25
5. Orphanet: Desmostérolose [Internet]. [cité 23 déc 2019]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=35107
6. Orphanet: Homocystinurie classique [Internet]. [cité 5 janv 2020]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=394
7. Orphanet: Maladie de Charcot Marie Tooth liée à l’X type 4 [Internet]. [cité 5 janv 2020]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=101078
8. Orphanet: Maladie du sirop d’érable [Internet]. [cité 5 janv 2020]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=511
9. Orphanet: Phéochromocytome paragangliome héréditaire [Internet]. [cité 24 déc 2019]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=29072&lng=FR
10. Orphanet: Porphyrie variegata [Internet]. [cité 23 déc 2019]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=79473&lng=FR
11. Orphanet: Sarcosinémie [Internet]. [cité 5 janv 2020]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=773&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Sarcosinemie&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Sarcosinemie&title=Sarcosin%20E9mie&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=773&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Sarcosinemie&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Sarcosinemie&title=Sarcosin%20E9mie&search=Disease_Search_Simple)
12. Orphanet: Syndrome d’Antley Bixler [Internet]. [cité 5 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.orpha.net/consor/www/cgi->

bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=1391&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Syndrome-d-Antley-Bixler-&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-d-Antley-Bixler&title=Syndrome%20d_Antley-Bixler&search=Disease_Search_Simple

13. Orphanet: Déficit en transporteur de riboflavine [Internet]. [cité 5 janv 2020]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=12856&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Syndrome-Brown-Vialetto-Van-Laere-&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Deficit-en-transporteur-de-riboflavine&title=D%E9ficit%20en%20transporteur%20de%20riboflavine&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=12856&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Syndrome-Brown-Vialetto-Van-Laere-&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Deficit-en-transporteur-de-riboflavine&title=D%E9ficit%20en%20transporteur%20de%20riboflavine&search=Disease_Search_Simple)
14. Orphanet: Déficit en monoamine oxydase A [Internet]. [cité 5 janv 2020]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=2747&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Syndrome-de-Brunner&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Deficit-en-monoamine-oxydase-A&title=D%E9ficit%20en%20monoamine%20oxydase%20A&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=2747&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Syndrome-de-Brunner&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Deficit-en-monoamine-oxydase-A&title=D%E9ficit%20en%20monoamine%20oxydase%20A&search=Disease_Search_Simple)
15. Orphanet: Syndrome de Leigh [Internet]. [cité 24 déc 2019]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=506
16. Orphanet: Syndrome de Guillain Barré [Internet]. [cité 24 déc 2019]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=2103
17. Orphanet: Xanthinurie type I [Internet]. [cité 23 déc 2019]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=93601
18. Orphanet: Xanthinurie type II [Internet]. [cité 5 janv 2020]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=12435&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Xanthinurie-type-II&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Xanthinurie-type-II&title=Xanthinurie%20type%20II&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=12435&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Xanthinurie-type-II&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Xanthinurie-type-II&title=Xanthinurie%20type%20II&search=Disease_Search_Simple)
19. Eggersdorfer M, Laudert D, Létinois U, McClymont T, Medlock J, Netscher T, et al. One Hundred Years of Vitamins-A Success Story of the Natural Sciences. *Angew Chem Int Ed.* 21 déc 2012;51(52):12960-90.
20. Northrop-Clewes CA, Thurnham DI. The Discovery and Characterization of Riboflavin. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(3):224-30.

21. Souganidis E. Nobel Laureates in the History of the Vitamins. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(3):265-9.
22. Beztsinna N, Solé M, Taib N, Bestel I. Bioengineered riboflavin in nanotechnology. *Biomaterials.* févr 2016;80:121-33.
23. Abbas CA, Sibirny AA. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1 juin 2011;75(2):321-60.
24. Sobrado P. Noncanonical Reactions of Flavoenzymes. *IJMS.* 5 nov 2012;13(12):14219-42.
25. Roslund J, Roth M, Guyon L, Boutou V, Courvoisier F, Wolf J-P, et al. Resolution of strongly competitive product channels with optimal dynamic discrimination: Application to flavins. *The Journal of Chemical Physics.* 21 janv 2011;134(3):034511.
26. Valle L, Morán Vieyra FE, Borsarelli CD. Hydrogen-bonding modulation of excited-state properties of flavins in a model of aqueous confined environment. *Photochem Photobiol Sci.* 2012;11(6):1051.
27. Insińska-Rak M, Sikorski M. Riboflavin Interactions with Oxygen-A Survey from the Photochemical Perspective. *Chem Eur J.* 17 nov 2014;20(47):15280-91.
28. Cardoso DR, Libardi SH, Skibsted LH. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. *Food Funct.* 2012;3(5):487.
29. Neti SS, Poulter CD. Site-Selective Synthesis of ¹⁵ N- and ¹³ C-Enriched Flavin Mononucleotide Coenzyme Isotopologues. *J Org Chem.* 17 juin 2016;81(12):5087-92.
30. Pinto JT, Zempleni J. Riboflavin. *Advances in Nutrition.* 1 sept 2016;7(5):973-5.
31. Lienhart W-D, Gudipati V, Macheroux P. The human flavoproteome. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* juill 2013;535(2):150-62.
32. Barile M, Giancaspero TA, Leone P, Galluccio M, Indiveri C. Riboflavin transport and metabolism in humans. *J Inherit Metab Dis.* juill 2016;39(4):545-57.
33. Buehler BA. Vitamin B₂: Riboflavin. *J Evid Based Complementary Altern Med.* avr 2011;16(2):88-90.
34. Yonezawa A, Inui K. Novel riboflavin transporter family RFVT/SLC52: Identification, nomenclature, functional characterization and genetic diseases of RFVT/SLC52. *Molecular Aspects of Medicine.* avr 2013;34(2-3):693-701.
35. Balasubramaniam S, Christodoulou J, Rahman S. Disorders of riboflavin metabolism. *J Inherit Metab Dis.* juill 2019;42(4):608-19.

36. OMS | Cancer [Internet]. WHO. [cité 31 déc 2019]. Disponible sur: <http://www.who.int/cancer/fr/>
37. Dysfonctionnement de la cellule - Qu'est-ce qu'un cancer ? [Internet]. Institut National du Cancer. [cité 2 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Dysfonctionnement-de-la-cellule>
38. Facteurs de risque - Qu'est-ce qu'un cancer ? [Internet]. Institut National du Cancer. [cité 2 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Facteurs-de-risque>
39. Division cellulaire - Qu'est-ce qu'un cancer ? [Internet]. Institut National du Cancer. [cité 2 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Division-cellulaire>
40. Wanert A. Les étapes de formation d'un cancer. - Manuel Web Belin [Internet]. [cité 2 janv 2020]. Disponible sur: https://manuelweb.belin.education/svt-premiere/topics/svt1-ch15-258-03_les-etapes-de-formation-d-un-cancer
41. Mécanisme de cancérisation - Qu'est-ce qu'un cancer ? [Internet]. Institut National du Cancer. 2016 [cité 2 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Mecanisme-de-cancerisation>
42. Types de cancers - Qu'est-ce qu'un cancer ? [Internet]. Institut National du Cancer. [cité 2 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Types-de-cancers>
43. Étapes et stades du cancer - Qu'est-ce qu'un cancer ? [Internet]. Institut National du Cancer. [cité 3 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Etapes-et-stades-du-cancer>
44. traitements-cancers-2011-06_0.pdf [Internet]. [cité 3 janv 2020]. Disponible sur: https://www.ligue-cancer.net/sites/default/files/brochures/traitements-cancers-2011-06_0.pdf
45. Cancers [Internet]. Santé Publique France. 2019 [cité 3 janv 2020]. Disponible sur: </maladies-et-traumatismes/cancers>
46. Cancers : les chiffres clés - Qu'est-ce qu'un cancer ? [Internet]. Institut National du Cancer. 2019 [cité 3 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Chiffres-cles>
47. Santé Publique France. 2019 [cité le 3 janv 2020]. Disponible sur : <rapport-estimations-regionales-departementales-incidence-mortalite-cancers-France-2007-2016-methodes.pdf>.
48. Bareford LM, Phelps MA, Foraker AB, Swaan PW. Intracellular Processing of Riboflavin in Human Breast Cancer Cells. *Mol Pharmaceutics*. 6 oct 2008;5(5):839-48.

49. Johnson T. Biochemical characterization of riboflavin carrier protein (RCP) in prostate cancer. *Front Biosci.* 2009;Volume(14):3634.
50. Ma J-Q, Kurban S, Zhao J-D, Li Q-Z, Hasimu A. Epigenetic Regulation of Human Riboflavin Transporter 2(hRFT2) in Cervical Cancers from Uighur Women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 30 mars 2014;15(6):2485-9.
51. Aili A, Hasim A, Kelimu A, Guo X, Mamtimin B, Abudula A, et al. Association of the Plasma and Tissue Riboflavin Levels with C20orf54 Expression in Cervical Lesions and Its Relationship to HPV16 Infection. *Hawkins SM, éditeur. PLoS ONE.* 18 nov 2013;8(11):e79937.
52. Li S-S, Xu Y-W, Wu J-Y, Tan H-Z, Wu Z-Y, Xue Y-J, et al. Plasma Riboflavin Level is Associated with Risk, Relapse, and Survival of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Nutrition and Cancer.* 2 janv 2017;69(1):21-8.
53. Long L, Pang X-X, Lei F, Zhang J-S, Wang W, Liao L-D, et al. SLC52A3 expression is activated by NF- κ B p65/Rel-B and serves as a prognostic biomarker in esophageal cancer. *Cell Mol Life Sci.* juill 2018;75(14):2643-61.
54. Jiang X-R, Yu X-Y, Fan J-H, Guo L, Zhu C, Jiang W, et al. RFT2 is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes tumorigenesis by sustaining cell proliferation and protecting against cell death. *Cancer Letters.* oct 2014;353(1):78-86.
55. Matnuri M, Zheng C, Sidik D, Bai G, Abdukerim M, Abdukadier A, et al. Correlation analysis of riboflavin, RFT2 and *Helicobacter pylori* in gastric carcinoma. :7.
56. Yang H, Chao P, Yin M. Riboflavin at High Doses Enhances Lung Cancer Cell Proliferation, Invasion, and Migration: High riboflavin promotes NSCLC *Journal of Food Science.* févr 2013;78(2):H343-9.
57. Fu T, Li Y, Wang Q, Wang Z, Sun Z, Di H, et al. Overexpression of riboflavin transporter 2 contributes toward progression and invasion of glioma: *NeuroReport.* oct 2016;27(15):1167-73.
58. Long L, He J-Z, Chen Y, Xu X-E, Liao L-D, Xie Y-M, et al. Riboflavin Depletion Promotes Tumorigenesis in HEK293T and NIH3T3 Cells by Sustaining Cell Proliferation and Regulating Cell Cycle-Related Gene Transcription. *The Journal of Nutrition.* 1 juin 2018;148(6):834-43.
59. Shen K, Huang X-E. Clinical Investigation in Effect of Riboflavin Sodium Phosphate on Prevention and Treatment for Patients with Radiotherapy Related Esophagitis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 9 mars 2015;16(4):1525-7.
60. Yuan Y, Zhao Y, Chen L, Wu J, Chen G, Li S, et al. Selective tumor cell death induced by irradiated riboflavin through recognizing DNA G-T mismatch. *Nucleic Acids Research.* 6 sept 2017;45(15):8676-83.

61. Sankaran NB, Sato Y, Sato F, Rajendar B, Morita K, Seino T, et al. Small-Molecule Binding at an Abasic Site of DNA: Strong Binding of Lumiflavin for Improved Recognition of Thymine-Related Single Nucleotide Polymorphisms. *J Phys Chem B*. 5 févr 2009;113(5):1522-9.
62. Xu L, Sun N, Zhou L, Chen X, Wang J, Wang Q, et al. A label-free fluorescence assay for potassium ions using riboflavin as a G-quadruplex ligand. *Analyst*. 2015;140(10):3352-5.
63. Yaku H, Fujimoto T, Murashima T, Miyoshi D, Sugimoto N. Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications. *Chem Commun*. 2012;48(50):6203.
64. Machado D, Shishido SM, Queiroz KCS, Oliveira DN, Faria ALC, Catharino RR, et al. Irradiated Riboflavin Diminishes the Aggressiveness of Melanoma In Vitro and In Vivo. *Facchiano A, éditeur. PLoS ONE*. 16 janv 2013;8(1):e54269.
65. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*. mars 2000;65(1-2):271-84.
66. Barreto JA, O'Malley W, Kubeil M, Graham B, Stephan H, Spiccia L. Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy. *Adv Mater*. 25 mars 2011;23(12):H18-40.
67. Tsvetkova Y, Beztsinna N, Baues M, Klein D, Rix A, Golombek SK, et al. Balancing Passive and Active Targeting to Different Tumor Compartments Using Riboflavin-Functionalized Polymeric Nanocarriers. *Nano Lett*. 9 août 2017;17(8):4665-74.
68. Marlin F, Simon P, Bonneau S, Alberti P, Cordier C, Boix C, et al. Flavin Conjugates for Delivery of Peptide Nucleic Acids. *ChemBioChem*. 26 nov 2012;13(17):2593-8.
69. Thomas TP, Choi SK, Li M-H, Kotlyar A, Baker JR. Design of riboflavin-presenting PAMAM dendrimers as a new nanoplatform for cancer-targeted delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. sept 2010;20(17):5191-4.
70. Guo D, Shi C, Wang X, Wang L, Zhang S, Luo J. Riboflavin-containing telodendrimer nanocarriers for efficient doxorubicin delivery: High loading capacity, increased stability, and improved anticancer efficacy. *Biomaterials*. oct 2017;141:161-75.
71. Witte AB, Timmer CM, Gam JJ, Choi SK, Banaszak Holl MM, Orr BG, et al. Biophysical Characterization of a Riboflavin-Conjugated Dendrimer Platform for Targeted Drug Delivery. *Biomacromolecules*. 13 févr 2012;13(2):507-16.
72. Beztsinna N, Tsvetkova Y, Bartneck M, Lammers T, Kiessling F, Bestel I. Amphiphilic Phospholipid-Based Riboflavin Derivatives for Tumor Targeting Nanomedicines. *Bioconjugate Chem*. 21 sept 2016;27(9):2048-61.

73. Beztsinna N, Tsvetkova Y, Jose J, Frih B, Al Rawashdeh W, Lammers T, et al. Photoacoustic imaging of tumor targeting with riboflavin-functionalized theranostic nanocarriers. *IJN*. mai 2017;Volume 12:3813-25.
74. Tsvetkova Y, Beztsinna N, Jayapaul J, Weiler M, Arns S, Shi Y, et al. Refinement of adsorptive coatings for fluorescent riboflavin-receptor-targeted iron oxide nanoparticles: Refining riboflavin-receptor targeted USPIO. *Contrast Media Mol Imaging*. janv 2016;11(1):47-54.
75. Jayapaul J, Arns S, Bunker M, Weiler M, Rutherford S, Comba P, et al. In vivo evaluation of riboflavin receptor targeted fluorescent USPIO in mice with prostate cancer xenografts. *Nano Res*. mai 2016;9(5):1319-33.
76. Jayapaul J, Hodenius M, Arns S, Lederle W, Lammers T, Comba P, et al. FMN-coated fluorescent iron oxide nanoparticles for RCP-mediated targeting and labeling of metabolically active cancer and endothelial cells. *Biomaterials*. sept 2011;32(25):5863-71.
77. Muñoz MA, Pacheco A, Becker MI, Silva E, Ebensperger R, Garcia AM, et al. Different cell death mechanisms are induced by a hydrophobic flavin in human tumor cells after visible light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. avr 2011;103(1):57-67.
78. Juarez AV, Sosa L del V, De Paul AL, Costa AP, Farina M, Leal RB, et al. Riboflavin acetate induces apoptosis in squamous carcinoma cells after photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. déc 2015;153:445-54.
79. Sau A, Sanyal S, Bera K, Sen S, Mitra AK, Pal U, et al. DNA Damage and Apoptosis Induction in Cancer Cells by Chemically Engineered Thiolated Riboflavin Gold Nanoassembly. *ACS Appl Mater Interfaces*. 7 févr 2018;10(5):4582-9.
80. Khaydukov EV, Mironova KE, Semchishen VA, Generalova AN, Nechaev AV, Khochenkov DA, et al. Riboflavin photoactivation by upconversion nanoparticles for cancer treatment. *Sci Rep*. déc 2016;6(1):35103.
81. Xu F, Li J, Zhu T, Yu S-S, Zuo C, Yao R, et al. A new trick (hydroxyl radical generation) of an old vitamin (B₂) for near-infrared-triggered photodynamic therapy. *RSC Adv*. 2016;6(104):102647-56.
82. Francolon N. Elaboration et caractérisation de nanoparticules luminescentes par upconversion pour l'imagerie médicale [Chimie, Science des Matériaux]. [Clermont-Ferrand]: Blaise Pascal; 2016.
83. Hassan I, Chibber S, Khan AA, Naseem I. Riboflavin Ameliorates Cisplatin Induced Toxicities under Photoillumination. *Mukhopadhyay P, éditeur. PLoS ONE*. 2 mai 2012;7(5):e36273.

84. Hassan I, Chibber S, Naseem I. Ameliorative effect of riboflavin on the cisplatin induced nephrotoxicity and hepatotoxicity under photoillumination. *Food and Chemical Toxicology*. août 2010;48(8-9):2052-8.
85. Alonso-de Castro S, Ruggiero E, Ruiz-de-Angulo A, Rezabal E, Mareque-Rivas JC, Lopez X, et al. Riboflavin as a bioorthogonal photocatalyst for the activation of a Pt^{IV} prodrug. *Chem Sci*. 2017;8(6):4619-25.
86. Alonso-de Castro S, Terenzi A, Hager S, Englinger B, Faraone A, Martínez JC, et al. Biological activity of PtIV prodrugs triggered by riboflavin-mediated bioorthogonal photocatalysis. *Sci Rep*. déc 2018;8(1):17198.
87. Zhang M, Wang W, Zhou N, Yuan P, Su Y, Shao M, et al. Near-infrared light triggered photo-therapy, in combination with chemotherapy using magnetofluorescent carbon quantum dots for effective cancer treating. *Carbon*. juill 2017;118:752-64.
88. Shrestha AR, Ali HI, Ashida N, Nagamatsu T. Antitumor studies. Part 5: Synthesis, antitumor activity, and molecular docking study of 5-(monosubstituted amino)-2-deoxo-2-phenyl-5-deazaflavins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. oct 2008;16(20):9161-70.
89. Malki WH, Gouda AM, Ali HEA, Al-Rousan R, Samaha D, Abdalla AN, et al. Structural-based design, synthesis, and antitumor activity of novel alloxazine analogues with potential selective kinase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry*. mai 2018;152:31-52.
90. COSSON A, ROUFFY J. SANG - Composition et propriétés. In *Encyclopædia Universalis*; [cité 6 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.universalis.edu.com/encyclopedia/sang-composition-et-proprietes/>
91. PDB 3hhb structure summary < Protein Data Bank in Europe (PDBe) < EMBL-EBI [Internet]. Structure hémoglobine. [cité 6 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3hhb/>
92. SOULIER J-P. TRANSFUSION SANGUINE. In *Encyclopædia Universalis*; [cité 6 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.universalis.edu.com/encyclopedia/transfusion-sanguine/>
93. Les besoins en sang - Etablissement français du sang | Etablissement français du sang [Internet]. [cité 6 mars 2020]. Disponible sur: <https://dondesang.efs.sante.fr/comprendre-quoi-servent-les-dons-de-sang/les-besoins-au-quotidien>
94. La mise en place universelle de l'inactivation des agents pathogènes dans les produits sanguins labiles est une étape majeure de l'amélioration de la sécurité en transfusion [Internet]. Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps. 2010 [cité 6 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.academie-medecine.fr/la-mise-en-place-universelle-de-linactivation-des-agents-pathogenes-dans-les-produits-sanguins-labiles-est-une-etape-majeure-de-lamelioration-de-la-securite-en-transfusion/>

95. Le parcours de la poche de sang - Etablissement français du sang | Etablissement français du sang [Internet]. [cité 6 mars 2020]. Disponible sur: <https://dondesang.efs.sante.fr/comprendre-que-devient-la-poche-de-sang/le-parcours-de-la-poche-de-sang>
96. Marschner S, Fast LD, Baldwin III WM, Slichter SJ, Goodrich RP. White blood cell inactivation after treatment with riboflavin and ultraviolet light: EFFECTS OF PRT TREATMENT ON WBC FUNCTION. *Transfusion*. nov 2010;50(11):2489-98.
97. Fast LD, Nevola M, Tavares J, Reddy HL, Goodrich RP, Marschner S. Treatment of whole blood with riboflavin plus ultraviolet light, an alternative to gamma irradiation in the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease?: RIBOFLAVIN/UV LIGHT-TREATED FRESH BLOOD. *Transfusion*. févr 2013;53(2):373-81.
98. Prowse CV. Component pathogen inactivation: a critical review: Component pathogen inactivation. *Vox Sanguinis*. avr 2013;104(3):183-99.
99. Solheim BG. Pathogen reduction of blood components. *Transfusion and Apheresis Science*. août 2008;39(1):75-82.
100. Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP. Toxicity Testing of a Novel Riboflavin-Based Technology for Pathogen Reduction and White Blood Cell Inactivation. *Transfusion Medicine Reviews*. avr 2008;22(2):133-53.
101. Marschner S, Goodrich R. Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light. *Transfus Med Hemother*. 2011;38(1):8-18.
102. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzger PS, Gregory KR, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion*. 2009;49(s2):1S-29S.
103. Rock G. A comparison of methods of pathogen inactivation of FFP: Pathogen-inactivated plasmas. *Vox Sanguinis*. févr 2011;100(2):169-78.
104. aabb. 2015; prt-systems-in-use-country-listing.pdf [Internet]. [cité 25 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.aabb.org/tm/eid/Documents/prt-systems-in-use-country-listing.pdf>
105. Courteix C, Sion B. Physiologie de l'œil et principes généraux de la vision. *Actualités Pharmaceutiques*. mai 2018;57(576):20-4.
106. Jean-Antoine BERNARD, Guy OFFRET. ŒIL HUMAIN - Universalis.edu [Internet]. Universalis. [cité 27 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.universalis-edu.com.docelec.u-bordeaux.fr/encyclopedie/oeil-humain/>

107. Jonas U, Kort, V.W.J, Lycklama, A.A.B. Les Yeux et les reins. Glarus], Suisse: Éditions Christophe Colomb; 1985.
108. Touboul D. Apport de l'élastographie par imagerie des ondes de cisaillement pour l'évaluation de la photo-polymérisation du collagène cornéen [Biologie cellulaire et physiopathologie]. [Bordeaux]: Bordeaux;
109. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. *In vivo* confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. janv 2009;37(1):100-17.
110. Définition - Association kératocône [Internet]. [cité 5 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.keratocone.net/definition.html>
111. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: Long-term results: *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. mai 2008;34(5):796-801.
112. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T. Long-term Results of Riboflavin Ultraviolet A Corneal Collagen Cross-linking for Keratoconus in Italy: The Siena Eye Cross Study. *American Journal of Ophthalmology*. avr 2010;149(4):585-93.
113. O'Brart DPS. Corneal collagen cross-linking: A review. *Journal of Optometry*. juill 2014;7(3):113-24.
114. Examens - Association kératocône [Internet]. [cité 9 avr 2020]. Disponible sur: https://www.keratocone.net/definition_examens.html
115. Traitements - Association kératocône - Le site des cornées KC ... [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.keratocone.net/traitements.htm>
116. Anneaux intracornéens - Association kératocône - Le site des cornées KC ... [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: https://www.keratocone.net/traitements_anneaux.html
117. Greffe de cornée - Association kératocône - Le site des cornées KC ... [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: https://www.keratocone.net/traitements_greffes.html
118. Crosslinking - CXL - Association kératocône - Le site des cornées KC ... [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: https://www.keratocone.net/traitements_cxl.html
119. Alicia A, Michèle, MORIN-SURROCA, Marc GUERRIER. Crosslinking du collagène cornéen et anneaux intra-cornéens dans le traitement des ectasies cornéennes. 2015;127.
120. Greffe de cornée - Association kératocône - Le site des cornées KC ... [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: https://www.keratocone.net/traitements_scleraux.html
121. Ashwin PT, McDonnell PJ. Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research. *British Journal of Ophthalmology*. 1 août 2010;94(8):965-70.

122. Snibson GR. Collagen cross-linking: a new treatment paradigm in corneal disease - a review: Corneal collagen cross-linking. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 20 mars 2010;38(2):141-53.
123. O'Brart DPS. Corneal collagen cross-linking: A review. *Journal of Optometry*. juill 2014;7(3):113-24.
124. Dahl BJ, Spotts E, Truong JQ. Corneal collagen cross-linking: An introduction and literature review. *Optometry - Journal of the American Optometric Association*. janv 2012;83(1):33-42.
125. Meek KM, Hayes S. Corneal cross-linking - a review. *Ophthalmic Physiol Opt*. mars 2013;33(2):78-93.
126. Chan E, Snibson GR. Current status of corneal collagen cross-linking for keratoconus: a review: Cross-linking and keratoconus. *Clin Exp Optom*. mars 2013;96(2):155-64.
127. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi O, Bovone C, Sparano MC, et al. Corneal Healing After Riboflavin Ultraviolet-A Collagen Cross-Linking Determined by Confocal Laser Scanning Microscopy In Vivo: Early and Late Modifications. *American Journal of Ophthalmology*. oct 2008;146(4):527-533.e1.
128. McCall AS, Kraft S, Edelhauser HF, Kidder GW, Lundquist RR, Bradshaw HE, et al. Mechanisms of Corneal Tissue Cross-linking in Response to Treatment with Topical Riboflavin and Long-Wavelength Ultraviolet Radiation (UVA). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 janv 2010;51(1):129.
129. Martins SAR, Combs JC, Noguera G, Camacho W, Wittmann P, Walther R, et al. Antimicrobial Efficacy of Riboflavin/UVA Combination (365 nm) In Vitro for Bacterial and Fungal Isolates: A Potential New Treatment for Infectious Keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 août 2008;49(8):3402.
130. Sauer A, Letscher-Bru V, Speeg-Schatz C, Touboul D, Colin J, Candolfi E, et al. In Vitro Efficacy of Antifungal Treatment Using Riboflavin/UV-A (365 nm) Combination and Amphotericin B. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 août 2010;51(8):3950.
131. Métais L. Adhésion et photopolymérisation: données actuelles et évaluation des pratiques dans un échantillon de praticiens du Finistère [en odontologie]. [Brest]: Brest;
132. Guetrot A. Optimisation du collage à l'émail et dentine [en odontologie]. [Toulouse]: Toulouse;
133. Faivre E. Anatomie de la dent [Internet]. Futura. [cité 21 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/dents-dents-sante-buccodentaire-1287/page/3/>

134. Buxeraud J. Prévention de la carie dentaire. *Actualités Pharmaceutiques*. sept 2017;56(568):51-4.
135. Ruhin B., Bertrand J-C. Lésions dentaires et gingivales. *La Revue du Praticien* 2002;52,1947-56 [Internet]. [cité 16 avr 2020]. Disponible sur: http://solr.gmsante.fr/RDP/2002/17/RDP_2002_17_1947.pdf
136. Cova A, Breschi L, Nato F, Ruggeri A, Carrilho M, Tjäderhane L, et al. Effect of UVA-activated Riboflavin on Dentin Bonding. *J Dent Res*. déc 2011;90(12):1439-45.
137. Chiang Y-S, Chen Y-L, Chuang S-F, Wu C-M, Wei P-J, Han C-F, et al. Riboflavin-ultraviolet-A-induced collagen cross-linking treatments in improving dentin bonding. *Dental Materials*. juin 2013;29(6):682-92.
138. Fawzy AS, Nitisusanta LI, Iqbal K, Daood U, Neo J. Riboflavin as a dentin crosslinking agent: Ultraviolet A versus blue light. *Dental Materials*. déc 2012;28(12):1284-91.
139. Fawzy A, Nitisusanta L, Iqbal K, Daood U, Beng LT, Neo J. Characterization of Riboflavin-modified Dentin Collagen Matrix. *J Dent Res*. nov 2012;91(11):1049-54.
140. Daood U, Iqbal K, Nitisusanta LI, Fawzy AS. Effect of chitosan/riboflavin modification on resin/dentin interface: Spectroscopic and microscopic investigations. *J Biomed Mater Res*. juill 2013;101A(7):1846-56.
141. Daood U, Swee Heng C, Neo Chiew Lian J, Fawzy AS. In vitro analysis of riboflavin-modified, experimental, two-step etch-and-rinse dentin adhesive: Fourier transform infrared spectroscopy and micro-Raman studies. *Int J Oral Sci*. juin 2015;7(2):110-24.
142. Portron S. Modulation de la différenciation chondrogénique : Application en ingénierie tissulaire du cartilage [Biologie cellulaire et moléculaire]. [Nantes]: Nantes; 2013.
143. LAVERGNE D. CARTILAGE. In *Encyclopædia Universalis*; [cité 26 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.universalis.edu.com/encyclopedie/cartilage/>
144. PELTIER A-P. RHUMATOLOGIE. In *Encyclopædia Universalis*; [cité 26 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.universalis.edu.com/encyclopedie/rhumatologie/>
145. Hu J, Hou Y, Park H, Choi B, Hou S, Chung A, et al. Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. mai 2012;8(5):1730-8.
146. Park H, Choi B, Hu J, Lee M. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. janv 2013;9(1):4779-86.
147. Choi B, Kim S, Lin B, Wu BM, Lee M. Cartilaginous Extracellular Matrix-Modified Chitosan Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 26 nov 2014;6(22):20110-21.

148. Choi B, Kim S, Lin B, Li K, Bezouglaia O, Kim J, et al. Visible-light-initiated hydrogels preserving cartilage extracellular signaling for inducing chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*. janv 2015;12:30-41.
149. Grenier S, Donnelly PE, Gittens J, Torzilli PA. Resurfacing damaged articular cartilage to restore compressive properties. *Journal of Biomechanics*. janv 2015;48(1):122-9.
150. Koh RH, Jin Y, Kang B-J, Hwang NS. Chondrogenically primed tonsil-derived mesenchymal stem cells encapsulated in riboflavin-induced photocrosslinking collagen-hyaluronic acid hydrogel for meniscus tissue repairs. *Acta Biomaterialia*. avr 2017;53:318-28.
151. GILLOT C. GENOU. In *Encyclopædia Universalis*; [cité 29 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.universalis.edu.com/encyclopedia/genou/>
152. Dib Z. Chirurgie orthopédique assistée par ordinateur: application au traitement de l'arthrose du genou. [Brest]: Bretagne Occidentale; 2017.
153. Borde B, Grunert P, Härtl R, Bonassar LJ. Injectable, high-density collagen gels for annulus fibrosus repair: An *in vitro* rat tail model: INJECTABLE COLLAGEN GELS FOR AF REPAIR. *J Biomed Mater Res*. août 2015;103(8):2571-81.
154. Sloan SR, Galessio D, Secchieri C, Berlin C, Hartl R, Bonassar LJ. Initial investigation of individual and combined annulus fibrosus and nucleus pulposus repair ex vivo. *Acta Biomaterialia*. sept 2017;59:192-9.
155. Grunert P, Borde BH, Towne SB, Moriguchi Y, Hudson KD, Bonassar LJ, et al. Riboflavin crosslinked high-density collagen gel for the repair of annular defects in intervertebral discs: An *in vivo* study. *Acta Biomaterialia*. oct 2015;26:215-24.
156. FRANÇOIS Y, GILLOT C. VERTÈBRES ET RACHIS. In *Encyclopædia Universalis*; [cité 3 mai 2020]. Disponible sur: <http://www.universalis.edu.com/encyclopedia/vertébres-et-rachis/>
157. Hernie discale | Neurochirurgie Lariboisière [Internet]. [cité 3 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.neurochirurgie-lariboisiere.com/hernie-discale/>
158. Arakawa C, Ng R, Tan S, Kim S, Wu B, Lee M. Photopolymerizable chitosan-collagen hydrogels for bone tissue engineering: Photopolymerizable chitosan-collagen hydrogels. *J Tissue Eng Regen Med*. janv 2017;11(1):164-74.
159. Kim S, Cui Z-K, Koo B, Zheng J, Aghaloo T, Lee M. Chitosan–Lysozyme Conjugates for Enzyme-Triggered Hydrogel Degradation in Tissue Engineering Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 5 déc 2018;10(48):41138-45.

160. GILLOT C. CŒUR - Anatomie du cœur humain. In *Encyclopædia Universalis*; [cité 6 mai 2020]. Disponible sur: <http://www.universalis.edu.com/encyclopedie/coeur-anatomie-du-coeur-humain/>
161. Kuetemeyer K, Kensah G, Heidrich M, Meyer H, Martin U, Gruh I, et al. Two-photon induced collagen cross-linking in bioartificial cardiac tissue. *Opt Express*. 15 août 2011;19(17):15996.
162. Walker S, Schönfelder J, Tugtekin S-M, Wetzel C, Hacker MC, Schulz-Siegmund M. Stabilization and Sterilization of Pericardial Scaffolds by Ultraviolet and Low-Energy Electron Irradiation. *Tissue Engineering Part C: Methods*. déc 2018;24(12):717-29.
163. Jang J, Kim TG, Kim BS, Kim S-W, Kwon S-M, Cho D-W. Tailoring mechanical properties of decellularized extracellular matrix bioink by vitamin B2-induced photo-crosslinking. *Acta Biomaterialia*. mars 2016;33:88-95.
164. Nawroth JC, Scudder LL, Halvorson RT, Tresback J, Ferrier JP, Sheehy SP, et al. Automated fabrication of photopatterned gelatin hydrogels for organ-on-chips applications. *Biofabrication*. 16 janv 2018;10(2):025004.
165. Zhao R, Wang H, Qiao C, Zhao K. Vitamin B2 blocks development of Alzheimer's disease in APP/PS1 transgenic mice via anti-oxidative mechanism. *Trop J Pharm Res*. 13 juill 2018;17(6):1049.
166. Barthel A, Trieschmann L, Ströhl D, Kluge R, Böhm G, Csuk R. Synthesis of Dimeric Quinazolin-2-one, 1,4-Benzodiazepin-2-one, and Isoalloxazine Compounds as Inhibitors of Amyloid Peptides Association. *Arch Pharm Chem Life Sci*. août 2009;342(8):445-52.
167. Taniguchi A, Sasaki D, Shiohara A, Iwatsubo T, Tomita T, Sohma Y, et al. Attenuation of the Aggregation and Neurotoxicity of Amyloid- β Peptides by Catalytic Photooxygenation. *Angew Chem Int Ed*. 27 janv 2014;53(5):1382-5.
168. Sohma Y. Medicinal Chemistry Focusing on Aggregation of Amyloid- β . *Chem Pharm Bull*. 2016;64(1):1-7.
169. Lin J, Diamanduros A, Chowdhury SA, Scelsa S, Latov N, Sadiq SA. Specific electron transport chain abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. mai 2009;256(5):774-82.
170. Moges H, Vasconcelos OM, Campbell WW, Borke RC, McCoy JA, Kaczmarczyk L, et al. Light therapy and supplementary riboflavin in the SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Lasers Surg Med*. janv 2009;41(1):52-9.
171. Galletti F, Cupini LM, Corbelli I, Calabresi P, Sarchielli P. Pathophysiological basis of migraine prophylaxis. *Progress in Neurobiology*. oct 2009;89(2):176-92.

172. Mignon M-C, Préaubert N, Geraud G, Lanteri-Minet M, Valade D. Prise en charge diagnostique et thérapeutique de la migraine chez l'adulte et chez l'enfant : aspects cliniques et économiques. 2002 p. 21.
173. Colombo B, Saraceno L, Comi G. Riboflavin and migraine: the bridge over troubled mitochondria. *Neurol Sci.* mai 2014;35(S1):141-4.
174. Condò M, Posar A, Arbizzani A, Parmeggiani A. Riboflavin prophylaxis in pediatric and adolescent migraine. *J Headache Pain.* oct 2009;10(5):361-5.
175. MacLennan, SC, Wade FM, Forrest KML, Ratanayake PD, Fagan E, Antony J. High-Dose Riboflavin for Migraine Prophylaxis in Children: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J Child Neurol.* nov 2008;23(11):1300-4.
176. Bruijn J, Duivenvoorden H, Passchier J, Locher H, Dijkstra N, Arts W-F. Medium-dose riboflavin as a prophylactic agent in children with migraine: A preliminary placebo-controlled, randomised, double-blind, cross-over trial. *Cephalalgia.* déc 2010;30(12):1426-34.
177. Marashly ET, Bohlega SA. Riboflavin Has Neuroprotective Potential: Focus on Parkinson's Disease and Migraine. *Front Neurol.* 20 juill 2017;8:333.
178. Fryar-Williams S. Fundamental Role of Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 C → T Genotype and Flavin Compounds in Biochemical Phenotypes for Schizophrenia and Schizoaffective Psychosis. *Front Psychiatry* [Internet]. 9 nov 2016 [cité 18 mai 2020];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2016.00172/full>
179. McMahon A, McNulty H, Hughes C, Strain J, Ward M. Novel Approaches to Investigate One-Carbon Metabolism and Related B-Vitamins in Blood Pressure. *Nutrients.* 11 nov 2016;8(11):720.
180. McNulty H, Strain JJ, Hughes CF, Ward M. Riboflavin, MTHFR genotype and blood pressure: A personalized approach to prevention and treatment of hypertension. *Molecular Aspects of Medicine.* févr 2017;53:2-9.
181. Wilson CP, McNulty H, Ward M, Strain JJ, Trouton TG, Hoelt BA, et al. Blood Pressure in Treated Hypertensive Individuals With the *MTHFR* 677TT Genotype Is Responsive to Intervention With Riboflavin: Findings of a Targeted Randomized Trial. *Hypertension.* juin 2013;61(6):1302-8.
182. Tavares NR, Moreira PA, Amaral TF. Riboflavin supplementation and biomarkers of cardiovascular disease in the elderly. *J Nutr Health Aging.* mai 2009;13(5):441-6.
183. Shi Z, Yuan B, Taylor AW, Zhen S, Zuo H, Dai Y, et al. Riboflavin Intake and 5-Year Blood Pressure Change in Chinese Adults: Interaction with Hypertensive Medication. *Food Nutr Bull.* mars 2014;35(1):33-42.

184. De Jaeger C, Fraoucene N, Voronska E, Cherin P. Rôle de l'homocystéine en pathologie. *Médecine & Longévité*. juin 2010;2(2):73-86.
185. Zou Y-X, Zhang X-H, Su F-Y, Liu X. Importance of Riboflavin Kinase in the Pathogenesis of Stroke. *CNS Neurosci Ther*. oct 2012;18(10):834-40.
186. Da Silva-Candal A, Pérez-Díaz A, Santamaría M, Correa-Paz C, Rodríguez-Yáñez M, Ardá A, et al. Clinical validation of blood/brain glutamate grabbing in acute ischemic stroke: Blood/Brain Glutamate Grabbing. *Ann Neurol*. août 2018;84(2):260-73.
187. Wang P, Fan F, Li X, Sun X, Ma L, Wu J, et al. Riboflavin attenuates myocardial injury via LSD1-mediated crosstalk between phospholipid metabolism and histone methylation in mice with experimental myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. févr 2018;115:115-29.
188. Hasegawa T, Iwanaga K, Hultquist DE, Liao H, Visovatti SH, Pinsky DJ. Suppression of nitrosative and oxidative stress to reduce cardiac allograft vasculopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. avr 2009;296(4):H1007-16.
189. Sanches SC, Ramalho LNZ, Mendes-Braz M, Terra VA, Cecchini R, Augusto MJ, et al. Riboflavin (vitamin B-2) reduces hepatocellular injury following liver ischaemia and reperfusion in mice. *Food and Chemical Toxicology*. mai 2014;67:65-71.
190. Touat M, Michaud M, Alamowitch S, Maisonobe T, Acquaviva-Bourdain C, Laforêt P. Encephalopathy associated with a reversible splenic lesion in riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Revue Neurologique*. déc 2018;174(10):747-50.
191. Ishii K, Komaki H, Ohkuma A, Nishino I, Nonaka I, Sasaki M. Central nervous system and muscle involvement in an adolescent patient with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Brain and Development*. sept 2010;32(8):669-72.
192. Haack TB, Makowski C, Yao Y, Graf E, Hempel M, Wieland T, et al. Impaired riboflavin transport due to missense mutations in SLC52A2 causes Brown-Vialetto-Van Laere syndrome. *J Inherit Metab Dis*. nov 2012;35(6):943-8.
193. Bosch AM, Stroek K, Abeling NG, Waterham HR, IJlst L, Wanders RJ. The Brown-Vialetto-Van Laere and Fazio Londe syndrome revisited: natural history, genetics, treatment and future perspectives. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7(1):83.
194. Alam MdM, Iqbal S, Naseem I. Ameliorative effect of riboflavin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in type-2 diabetic mice: Mechanistic and therapeutic strategies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. oct 2015;584:10-9.
195. Liu C, Cao Z, Zhang W, Tickner J, Qiu H, Wang C, et al. Lumichrome inhibits osteoclastogenesis and bone resorption through suppressing RANKL-induced NFAT activation and calcium signaling: LIU ET AL. *J Cell Physiol*. nov 2018;233(11):8971-83.

196. Nath AK, Roberts LD, Liu Y, Mahon SB, Kim S, Ryu JH, et al. Chemical and metabolomic screens identify novel biomarkers and antidotes for cyanide exposure. *FASEB j.* mai 2013;27(5):1928-38.
197. Al-Harbi NO, Imam F, Nadeem A, Al-Harbi MM, Iqbal M, Ahmad SF. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat is reversed by treatment with riboflavin. *International Immunopharmacology.* août 2014;21(2):383-8.
198. Du L, Li G, Jin Y, Wang L, Xu Q, Dong J. Riboflavin laurate nanosuspensions as an intramuscular injection for long-term riboflavin supplementation. *International Journal of Pharmaceutics.* juin 2013;450(1-2):338-44.
199. Hu X, Lin X, Gu Y, Liu Z, Tang Y, Zhang Y, et al. Biocompatible riboflavin laurate long-acting injectable nanosuspensions allowing sterile filtration. *Drug Delivery.* août 2014;21(5):351-61.
200. Long Q, Ji L, Wang H, Xie J. Riboflavin Biosynthetic and Regulatory Factors as Potential Novel Anti-Infective Drug Targets. *Chemical Biology & Drug Design.* avr 2010;75(4):339-47.
201. Lee ER, Blount KF, Breaker RR. Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression. *RNA Biology.* avr 2009;6(2):187-94.
202. Ott E, Stolz J, Mack M. The RFN riboswitch of *Bacillus subtilis* is a target for the antibiotic roseoflavin produced by *Streptomyces davawensis*. *RNA Biology.* juill 2009;6(3):276-80.
203. Esquerre T. Rôle des régulations de la stabilité des ARN messagers dans l'adaptation d'*Escherichia coli* à son environnement. [Toulouse]: Toulouse; 2014.
204. Langer S, Nakanishi S, Mathes T, Knaus T, Binter A, Macheroux P, et al. The Flavoenzyme Azobenzene Reductase AzoR from *Escherichia coli* Binds Roseoflavin Mononucleotide (RoFMN) with High Affinity and Is Less Active in Its RoFMN Form. *Biochemistry.* 25 juin 2013;52(25):4288-95.
205. Langer S, Hashimoto M, Hobl B, Mathes T, Mack M. Flavoproteins Are Potential Targets for the Antibiotic Roseoflavin in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 15 sept 2013;195(18):4037-45.
206. Langer S, Nakanishi S, Mathes T, Knaus T, Binter A, Macheroux P, et al. The Flavoenzyme Azobenzene Reductase AzoR from *Escherichia coli* Binds Roseoflavin Mononucleotide (RoFMN) with High Affinity and Is Less Active in Its RoFMN Form. *Biochemistry.* 25 juin 2013;52(25):4288-95.
207. Matern A, Pedrolli D, Großhennig S, Johansson J, Mack M. Uptake and Metabolism of Antibiotics Roseoflavin and 8-Demethyl-8-Aminoriboflavin in Riboflavin-Auxotrophic *Listeria monocytogenes*. Henkin TM, éditeur. *J Bacteriol.* 1 déc 2016;198(23):3233-43.

208. Pedrolli DB, Nakanishi S, Barile M, Mansurova M, Carmona EC, Lux A, et al. The antibiotics roseoflavin and 8-demethyl-8-amino-riboflavin from *Streptomyces davawensis* are metabolized by human flavokinase and human FAD synthetase. *Biochemical Pharmacology*. déc 2011;82(12):1853-9.
209. Zhao Y, Bacher A, Illarionov B, Fischer M, Georg G, Ye Q-Z, et al. Discovery and Development of the Covalent Hydrates of Trifluoromethylated Pyrazoles as Riboflavin Synthase Inhibitors with Antibiotic Activity Against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Org Chem*. 7 août 2009;74(15):5297-303.
210. McWilliam HE, Birkinshaw RW, Villadangos JA, McCluskey J, Rossjohn J. MR1 presentation of vitamin B-based metabolite ligands. *Current Opinion in Immunology*. juin 2015;34:28-34.
211. Keller AN, Corbett AJ, Wubben JM, McCluskey J, Rossjohn J. MAIT cells and MR1-antigen recognition. *Current Opinion in Immunology*. juin 2017;46:66-74.
212. Franciszkiewicz K, Salou M, Legoux F, Zhou Q, Cui Y, Bessoles S, et al. MHC class I-related molecule, MR1, and mucosal-associated invariant T cells. *Immunol Rev*. juill 2016;272(1):120-38.
213. Birkinshaw RW, Kjer-Nielsen L, Eckle SB, McCluskey J, Rossjohn J. MAITs, MR1 and vitamin B metabolites. *Current Opinion in Immunology*. févr 2014;26:7-13.
214. Beztsinna NS. Riboflavin-based amphiphiles for tumour-targeted nanosystems [Sciences de la Vie et de la Santé, Interface Chimie Biologie]. [Bordeaux]: Bordeaux; 2015.
215. Ribes J, Beztsinna N, Bailly R, Castano S, Rascol E, Taib-Maamar N, et al. Flavin-Conjugated Nanobombs: Key Structural Requirements Governing Their Self-Assemblies' Morphologies. *Bioconjugate Chem*. 23 févr 2021;acs.bioconjchem.1c00028.
216. Fritz BJ, Kasai S, Matsui K. PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF FLAVIN DERIVATIVES. *Photochem Photobiol*. janv 1987;45(1):113-7.
217. Ju S-Y, Papadimitrakopoulos F. Synthesis and Redox Behavior of Flavin Mononucleotide-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes. *J Am Chem Soc*. janv 2008;130(2):655-64.
218. Cheng C, Chen L, Chou C, Liang J. Investigations of riboflavin photolysis via coloured light in the nitro blue tetrazolium assay for superoxide dismutase activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. juill 2015;148:262-7.
219. Liang J-Y, Yuann J-MP, Cheng C-W, Jian H-L, Lin C-C, Chen L-Y. Blue light induced free radicals from riboflavin on *E. coli* DNA damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. févr 2013;119:60-4.

220. Legrand P, Benoit J-P, Briançon S, Fattal E, Fessi H, Passirani C. Sphéroïdes et formes vectorisées. In: Maloine, éditeur. Pharmacie Galénique: Formulation et Technologie pharmaceutique [Internet]. Maloine; 2007 [cité 11 juill 2020]. p. 221-50. Disponible sur: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00385473>

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

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

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

PERSPECTIVES D'UTILISATION DES FLAVINES EN THÉRAPEUTIQUE

Résumé

La Riboflavine ou vitamine B₂ est une molécule indispensable à la vie cellulaire. En effet, cette molécule et ses dérivés biologiquement actifs, la flavine mononucléotide et la flavine adénine dinucléotide permettent le fonctionnement d'environ 80 flavoprotéines, principalement des enzymes. Ces protéines sont notamment impliquées dans la croissance et le bon fonctionnement du métabolisme cellulaire des organismes.

Depuis sa découverte en 1933, le nombre de publications concernant les flavines n'a cessé d'augmenter, avec une progression importante depuis 2008. Quelles sont les raisons pour lesquelles, la riboflavine et les flavines, suscitent-elles un tel intérêt ?

Au regard de leurs propriétés physico-chimiques (émission de lumière fluorescente et génération d'espèces radicalaires après irradiation), biologiques (propriétés oxydo-réductrices permettant le transport d'électron) et leur biocompatibilité, les flavines apparaissent comme un espoir thérapeutique dans différents domaines. En effet, de nombreux travaux montrent que les flavines sont utilisées, sous leur forme naturelle ou au sein de nanoformulations, pour leurs propriétés pharmacologiques mais aussi en tant que photosensibilisateur ou comme agent de vectorisation. Ainsi, l'emploi des flavines s'avère très prometteur dans des applications variées, allant du traitement antitumoral, antiviral, antibiotique, des maladies neurodégénératives et cardiovasculaires à la régénération tissulaire.

Mots clés : Flavines, Riboflavine, Applications Médicales, Cancer, Nanoformulations, Ingénierie Tissulaire, Espèces Radicalaires

PROSPECTS FOR THE USE OF FLAVINS IN THERAPY

Abstract

Riboflavin or vitamin B₂ is an essential molecule for cell life. This molecule and its biologically active derivatives, the flavin mononucleotide and the flavin adenine dinucleotide are the support of about 80 flavoproteins, mainly enzymes. These proteins are involved in cell growth and proper functioning of the cellular metabolism of organisms.

Since its discovery in 1933, the number of publications on flavins has regularly increased with a significant progress since 2008. Why riboflavin and the other flavins are attracting so much interest?

Thanks to physico-chemical properties (emission of fluorescence and generation of radical species upon irradiation), biological (redox properties allowing electron transport) and biocompatibility, flavins are emerging as a therapeutic hope in various fields. Many studies show that flavins could be used, either in their natural form or in nanoformulations, for their pharmacological activities as well as a photosensitizing or vectorization properties. The exploitation of flavins thus seem very promising for a variety of applications, ranging from anti-tumour, antiviral, antibiotic treatment to neurodegenerative and cardiovascular diseases therapies and tissue regeneration.

Keywords: Flavins, Riboflavin, Medical Applications, Cancer, Nanoformulations, Tissue Engineering, Radical Species

Discipline : Pharmacie

Intitulé et adresse du laboratoire : Molecular Modelling for Biomolecular Engineering,

UMR 5248 CBMN, University of Bordeaux,

1 Allée Geoffroy Saint-Hilaire, 33600 Pessac